



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA  
IM. STANISŁAWA STASZICA  
W KRAKOWIE



Prof. dr hab. Květoslava Burda

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej  
30-059 Kraków, ul. Reymonta 19

### **Recenzja pracy doktorskiej pana mgr. Radosława Szlązaka**

Pan mgr Radosław Szlązak wykonał pracę doktorską zatytułowaną „*Spektroskopowe badania oddziaływania nanostruktur metalicznych z cząsteczkami o znaczeniu biologicznym*” w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej pod kierunkiem prof. dr. hab. Wiesława I. Gruszeckiego. Promotorem pomocniczym był dr hab. Rafał Luchowski. Praca była prowadzona w ramach projektu „Molecular Spectroscopy for BioMedical Studies” realizowanego w ramach programu TEAM, finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej przy wsparciu Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego ze środków Unii Europejskiej.

Doktorant zajmował się wytwarzaniem nanocząstek metalicznych, które wykazywały efekty plazmonowe w różnych środowiskach i konfiguracjach. Za zadanie postawił sobie dopracowanie prostych procedur uzyskiwania dobrze sprecyzowanych, co do wielkości i kształtu, nanocząstek plazmonicznych. Do badania ich struktury i organizacji oraz zdolności do stymulowania synergii absorpcji bądź fluorescencji w zakresie długości fal elektromagnetycznych od ultrafioletu do podczerwieni wykorzystywał odpowiednio mikroskopię elektronową (TME) i mikroskop sił atomowych (AFM) oraz spektroskopie: absorpcyjną UV-VIS i IR, fluorescencyjną i ramanowską. Spośród pierwiastków metalicznych wybrał miedź, pallad, srebro i złoto. Wytworzone nanocząstki złota i srebra były testowane jako platformy plazmoniczne. W szczególności hetero-układy zawierające srebro były sprawdzane jako potencjalne podkłady do wzmacniania sygnałów absorpcji w podczerwieni (metoda SEIRA – *Surface Enhanced Infrared Absorption*) oraz sygnałów ramanowskich (metoda SERS – *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*). Powierzchnie szklane z wyspami srebrnymi (SIF – *Silver Island Film*) oraz spieki tlenku tytanu i nanocząstek srebra albo złota, jako podkłady wzmacniające fluorescencję (SEF – *Surface Enhanced Fluorescence*) zostały przetestowane dla izolowanych ze szpinaku kompleksów antenowych LHCII. W układach koloidalnych nanocząstki złota lub srebra były otaczane lipidami w celu wytwarzania matrycy dla biologicznie czynnych cząstek. Badane były ich własności absorpcyjne w zależności od długości lipidu. Skracanie czasów życia fluorescencji było sprawdzane dla koloidów nanocząstek srebra pokrytych izolowanymi kompleksami antenowymi LHCII, a także dla

znakowanego fluorescencyjnie fosfolipidu DPPE - NBD nakładanego wraz z hydrofobowymi nanocząstkami srebra Ag-DT (funkcjonalizowanych dodekanetiolem) na powierzchnię szkła metodą Langmuir'a – Blodgett'a oraz dla optycznie czynnego związku organicznego, ertytrazyny B (ErB) pokrywającej suche platformy utworzone z wysp nanocząstek srebra. Doktorant przedstawił również sposób przygotowania powierzchni szklanych funkcjonalizowanych APTES-em (3-aminopropylotrietoksylanem) oraz widma absorpcyjne i wygląd powierzchni po nałożeniu na nie nanocząstek złota (Au-cytrynian) lub srebra (Ag-seeds). Oryginalna metoda redukcji srebra w procedurze wytwarzania nanocząstek przy użyciu amfoterycyny B jako reduktora, opracowana w ramach niniejszej pracy, pozwoliła na uzyskanie rdzenia srebra pokrytego antybiotykiem. Nanocząstki te były sprawdzane pod kątem własności antygrzybiczych dla trzech różnych szczepów.

Praca liczy 114 stron. Została podzielona na dziesięć rozdziałów. Pierwszy rozdział jest „Wstępem” ostatni spisem literatury. Całość poprzedza spis publikacji, w których współautorem jest p. Radosław Szlęzak (6 pozycji), streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis większości skrótów i symboli użytych w doktoracie. „Bibliografia” zawiera 97 pozycji literaturowych, wśród których znajdują się publikacje zarówno z ostatnich lat, jak i pierwsze doniesienia dotyczące prekursorskich badań związanych z tematyką poruszaną przez Doktoranta. Rozprawa zawiera łącznie 38 rysunków, przedstawiających schematy, zdjęcia i wykresy oraz 9 tabeli. We „Wstępie” zostały przedstawione najważniejsze przesłanki podjętej przez Doktoranta tematyki badań związanych zarówno z rozwojem wiedzy na temat oddziaływań nanocząstek metalicznych z promieniowaniem elektromagnetycznym, a konkretnie efektem plazmonowym, jego podstawami fizycznymi, potencjalnymi zastosowaniami we wszystkich dziedzinach nowych nanotechnologii oraz rozwojem technik spektroskopowych. W rozdziale drugim przedstawiona została teoria opisująca rozchodzenie się fal elektromagnetycznych w próżni i oddziaływania ich z ośrodkami metalicznymi i na ich granicy oraz jak zależą te oddziaływania od rozmiaru tych ośrodków. Trzeci rozdział jest poświęcony zjawisku plazmonowemu z przedstawieniem warunku rezonansu dla plazmonów objętościowych, powierzchniowych i tzw. zlokalizowanych powierzchniowo, gdy rozmiary ośrodka, w którym wzbudzone są oscylacje ładunków, są mniejsze od długości fali elektromagnetycznej je wzbudzającej. Poza tym, w rozdziale tym przedstawiony jest opis teoretyczny wyznaczania momentu dipolowego wytworzonego w nanocząsteczce metalicznej oraz zastosowania wzbudzeń plazmonowych w procesach absorpcyjnych, fluorescencyjnych i rozproszeniowych w układach złożonych z połączenia ich z różnymi molekułami, w tym aktywnymi optycznie (np. fluoroforami). Kolejny rozdział zawiera ogólne informacje na temat technik wytwarzania nanocząstek, poświęcając więcej miejsca idei chemicznej redukcji soli metali w roztworach wodnych. Cel pracy przedstawiony jest w rozdziale piątym, a mianowicie, wytworzenie różnych podkładów plazmonowych w możliwie prosty sposób, zbadanie ich oddziaływań z wybranymi molekułami. Najważniejszym założeniem było wykorzystanie amfoterycyny B (antybiotyku) w procesie redukcji przy produkcji nanocząstek srebra w celu uzyskania preparatu o wzmocnionym działaniu antygrzybiczym. W „Materiałach i metodach badawczych”, w rozdziale szóstym został wymieniony sprzęt laboratoryjny, odczynniki chemiczne oraz metody pomiarowe wykorzystane w badaniach, a także oprogramowanie użyte do opracowywania uzyskanych danych eksperymentalnych. Ostatnie dwa podrozdziały zawierają opis procedury izolacji kompleksów antenowych ze szpinaku oraz oczyszczania kupnej amfoterycyny B. Rozdział siódmy składa się z pięciu podrozdziałów, z których cztery pierwsze poświęcone są kolejno: (i) syntezie nanocząstek srebra, złota przy stosowaniu różnych reduktorów, nanocząstek miedzi i palladu oraz ich charakterystyce (pomiarowi ich widm absorpcyjnych, oszacowaniu ich średnicy metodą rozpraszania przy założeniu ich sferycznego



kształtu oraz średniej liczby atomów w określonej nanocząstce przy założeniu, że tworzące je atomy tworzą struktury powierzchniowo centrowane; (ii) wpływowi lipidów nasyconych o różnych długościach na spektralne własności nanocząstek AgCyt i AuCyt; (iii) modyfikacji fluorescencji: izolowanych kompleksów antenowych LHCII w wyniku oddziaływania z nanocząstkami AgCyt; erytrozyny B zdeponowanej na suchej powierzchni szklanej pokrytej nanocząstkami srebra (AgCyt); fluoroforu DPPE-NBD naniesionego na powierzchnię szkła wraz z nanocząstkami srebra AgDT metodą Langmuir'a-Blodgett'a; komoleków LHCII zaadsorbowanych na porowatym spieku  $\text{TiO}_2$  i nanocząstek AgCyt, a także ocenie jednorodności powierzchni szklanych, funkcjonalizowanych ATPES-em i pokrytych nanocząstkami Au bądź Ag oraz ich własnościom absorpcyjnym i wreszcie efektom wzmocnienia fluorescencji pochodzącej od LHCII położonego na platformy plazmonowe pokryte agregatami nanocząstek srebra; (iv) zademonstrowaniu przydatności nanocząstek AuCTAB do uzyskania efektu SEIRA na przykładzie widm absorpcyjnych w podczerwieni LHCII i izolowanego chlorofilu b. Piąty podrozdział rozdziału siódmego poświęcony jest procedurze wytwarzania nanocząstek srebra pokrytych amfoteryciną B, charakterystyce ich własności absorpcyjnych, rozmiarowi w zależności od stężenia antybiotyku oraz sprawdzeniu zachowania struktury AmB w tych warunkach przy użyciu spektroskopii FTIR i ramanowskiej, a przy okazji obserwacji efektów odpowiednio SEIRA i SERS. Ostatnia część tego podrozdziału zawiera wyniki eksperymentów, w których były testowane antygrzybiczne własności nanocząstek srebra (NPs) pokrytych amfoteryciną B w porównaniu z powszechnie stosowanym preparatem Fungizonem dla trzech wybranych szczepów grzybów (*Aspegillus niger*, *Fusarium culmorum* i *Candida albicans*) i dwóch różnych proporcji AmB : NPs (1: 50 i 1:11). Badania były przeprowadzone dla dwóch różnych wyjściowych gęstości zarodków (ok.  $10^6$  i  $10^3$  komórek/ml). Rozdział ósmy jest zwięzłym podsumowaniem uzyskanych wyników, a dziesiąty przedstawia dalsze perspektywy rozwojowe rozpoczętych badań.

Bez wątpienia Doktorant osiągnął postawione cele. Korzystając ze znanych już technik, stworzył proste układy hybrydowe, z których jedne wykazywały efekty wzmocnienia fluorescencji, a inne jej gaszenia. Pokazał, że potrafi wytworzyć układy wykazujące własności plazmonowe zarówno w postaci nanocząstek w środowisku ciekłym, jak i naniesionych różnymi technikami na powierzchniach szklanych suchych platform zawierających nanocząstki metaliczne. Synergetyzm tak przygotowanych substratów w postaci koloidów bądź nanopowierzchni złota lub srebra testował z wybranymi cząstkami biologicznie czynnymi, głównie fluoroforami (m.in. izolowanymi kompleksami antenowymi LHCII, oczyszczonym chlorofilem b, czy erytrozyną B). Metody stosowane do produkcji układów nano-metalicznych sprawdził również dla nanocząstek palladu i miedzi. Dla nanocząstek złota opisał także sposób uzyskania podłużnych struktur przy zastosowaniu bromku heksadecyotrimetyloamoniowego, wykazujących przesunięcie widma absorpcyjnego w kierunku dłuższych fal prawie o 300 nm w porównaniu ze sferycznymi. Zademonstrował uproszczone metody szacowania liczby atomów w powstałych nanoukładach, ich gęstości, rozmiaru cząstek, długości komórki elementarnej oraz promienia kowalencyjnego. Pokazał, że im dłuższy lipid otacza nanocząstkę Ag lub Au, tym ich maksimum absorpcji bardziej przesunięte jest w kierunku dłuższych fal i linia absorpcyjna poszerza się. Wytworzył platformę z wysepkami nanocząstek srebra pokrytymi erytrazyną B (ErB). W tym układzie zaobserwował znaczące skrócenie czasów życia fluorescencji ErB, co może mieć potencjalne zastosowanie w wyznaczaniu funkcji odpowiedzi instrumentalnej (IRF – Instrument Response) wysokiej wydajności fotodetektorów czułych na długość padającej fali. Jednakże największym osiągnięciem Doktoranta było zaproponowanie nowej metody syntezy nanocząstek srebra otoczonych amfoteryciną B, dla których



zaobserwował zarówno efekt wzmocnienia sygnału w podczerwieni (SEIRA), jak i ramanowskiego (SERS). Co więcej, te układy hybrydowe wykazywały własności przeciwwgrzybicze zbliżone do tych, które posiada obecnie dostępny komercyjnie lek Fungizon. O wartości uzyskanych wyników mogą świadczyć publikacje, powstałe w oparciu o rezultaty otrzymane w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Z całą pewnością badania zaprezentowane w pracy doktorskiej pana mgr. Radosława Szlązaka wpisują się w jeden z najważniejszych nurtów rozwoju nowych kierunków bionanotechnologicznych, co potwierdzają zawarte w niej wyniki.

Praca napisana jest starannie i przejrzysto, Część teoretyczna ma także walory dydaktyczne. Jednakże Doktorant nie ustrzegł się przed drobnymi błędami językowymi. Z innych błędów chciałam tylko wspomnieć, że na stronie 80, użyte w doświadczeniu nanocząstki srebra były syntezowane według procedury opisanej w rozdziale 7.1.1, a nie 4.1.1., a na rys. 7.4.1., w legendzie do górnego wykresu oznaczenie AUCTAB-10ul-LHCII -10ul powinno być linią niebieską i na str. 83 w linijce 9 od góry powinno być „.. równie dobrym zanikiem co ...”, w przeciwnym razie zdanie jest niezrozumiałe. Są to drobne uwagi, o których musiałam wspomnieć z racji obowiązku recenzenta.

Ponieważ praca dotyczy bardzo interesującego zjawiska plazmonowego, które w zależności od układów może dawać różne efekty, chciałabym, aby Doktorant uzupełnił niektóre stwierdzenia lub obserwacje dodatkowymi komentarzami na poniższej przedstawione zagadnienia:

- a) Na str.45 pracy pojawia się w punkcie drugim stwierdzenie, iż wraz ze skróceniem czasu życia stanu wzbudzonego zwiększa się wydajność kwantowa i wiąże się to ze zwiększoną stabilnością cząstki, co obserwuje się, gdy fluorofor znajduje się w ściśle określonej odległości od nanocząstki, a mianowicie 20-100 nm.  
Natomiast w trzecim punkcie jest napisane, że dodatkowy bezpromienisty przekaz energii wzbudzonej molekule do nanocząstki metalicznej powoduje gaszenie fluorescencji. Ponieważ dodatkowy bezpromienisty przekaz energii powoduje dalsze skrócenie czasu życia fluorescencji, to w myśl punktu drugiego powinniśmy zaobserwować jeszcze większe wzmocnienie fluorescencji. Zawarte w tych punktach stwierdzenia są prawdziwe, ale punkt trzeci wymaga uzupełnienia komentarzem, doprecyzowania.
- b) Na rys. 7.5.2 przedstawiającym rozkład wielkości nanocząstek srebra otoczonych amfoteryciną B można zaobserwować, że zwiększenie stężenia AmB powoduje zmianę rozkładu dyspersji wielkości nanocząstek, są one bardziej jednorodne. Z obrazka uzyskanego z mikroskopu elektronowego dla układu zawierającego ok. 5 razy mniej AmB wyraźnie można wywnioskować, że dyspersja wielkości ziaren jest znacząca, co widać też na zamieszczonym obok histogramie. Wobec tego przedstawiona w pracy analiza tych danych przy użyciu funkcji Gaussa nie jest poprawna, ponieważ funkcja gaussowska nie jest w tym przypadku odpowiednią funkcją. W oparciu o jaką funkcję należałoby przeprowadzić analizę w tym przypadku?
- c) W przypadku efektu SERS obserwowanego dla AmBAgNPs widoczny jest zanik niektórych linii ramanowskich widocznych dla czystej AmB (rys. 7.5.1.1, np. dla liczby falowej ok. 900 i 1450  $\text{cm}^{-1}$ ). Z jakimi efektami może się to wiązać?
- d) Co było przesłanką do wybrania konkretnych szczepów grzybów w przeprowadzonych badaniach?
- e) W oparciu o przedstawione na rys. 7.5.2.1 i 7.5.2.2 wyniki eksperymentu trudno jest zobaczyć zmiany, bądź brak zmian wpływu poszczególnych związków użytych w badaniach na procent redukcji mikroorganizmów opisywany w tab. 7.5.2.2 i 7.5.2.3. Prosiłabym o ich omówienie.

- f) Jakie mogą być przyczyny braku korelacji średnicy strefy zahamowania wzrostu przedstawionych dla poszczególnych układów doświadczalnych z danymi zahamowania wzrostu mikroorganizmów zamieszczonych w tab. 7.5.2.2 i 7.5.2.3?
- g) Chciałabym zapytać czy były również przeprowadzone podobne testy procentu redukcji wybranych szczepów grzybów pod wpływem samych nanocząstek srebra (AgCyt, AgDT czy też AgSeeds), ponieważ obserwowana inhibicja wzrostu *Fusarium culmorum* (F37) i *Candida albicans* dla Fungizonu w obecności AgCyt, w porównaniu z samym Fungizonem, może sugerować przede wszystkim toksyczne działanie nanocząstek srebra na te mikroorganizmy. Również nanocząstki AmBAGNPs o mniejszym powierzchniowym stężeniu AmB (1 : 50) wykazują większą skuteczność zahamowania wzrostu *Fusarium culmorum* i *Aspergillus Niger* w prównaniu z nanocząstkami AmBAGNPs, w których jest większe stężenie AmB (1 : 11). Jakie czynniki mogą mieć na to wpływ?

Pracę pana mgr. Radosława Szlązaka uważam za interesującą i dostarczającą wielu ciekawych inspiracji. Choć układy hybrydowe, np. z kompleksem LHCII i nanocząstkami złota czy srebra nie są czymś nowym, to jednak zestawienie ich własności dla różnych platform plazmonowych jest bardzo ciekawe. Na szczególną uwagę, jak już wcześniej wspominałam, zasługuje pomysł stosowania materiału biologicznie czynnego do redukcji metali przy syntezie nanocząstek, co zademonstrował Doktorant na przykładzie amfoterycyny B. Z całą pewnością tego typu układy, a w szczególności AmBAGNPs, mogą znaleźć zastosowanie w farmakologii i medycynie. Ten wkład badań Doktoranta zasługuje moim zdaniem na wyróżnienie.

Praca spełnia wszystkie kryteria rozprawy doktorskiej i dlatego wnioskuję niniejszym o dopuszczenie pana mgr. Radosława Szlązaka do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. Květoslava Burda