

Prof. Dr hab. inż. Artur Podhorodecki
Zespół Nanostruktur Koloidalnych, Katedra Fizyki Doświadczalnej,
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wrocławska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Borodziuk pt. "Właściwości up-konwertujących nanocząstek i ich zastosowanie w terapii fotodynamicznej"

Niniejsza praca doktorska poświęcona jest badaniom w dwóch obszarach. Pierwszy obszar działań to synteza nanokryształów konwertujących energię w górę tj. $\text{NaYF}_4:(\text{Er}^{3+}:2\%, \text{Yb}^{3+}:20\%)$ oraz ich wszechstronne badania optyczne uwzględniające badania emisji, wzbudzenia emisji, zaników emisji, emisji w polu magnetycznym oraz badania optyczne nanokryształów w bliskiej obecności nanostruktur metalicznych (nanodrutów srebra o średnicy w zakresie 100 – 300 nm i długości od kilku do kilkunastu mikrometrów). Badane nanokryształy miały rozmiary z zakresu od 20 do 40 nm i w większości przypadków posiadały heksagonalną strukturę krystalograficzną. Nanodruły wykonane zostały na *Uniwersytecie w Toruniu na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej*, natomiast nanokryształy UCNPs zostały wykonane na podstawie protokołów wypracowanych w *Instytucie Fizyki PAN w Warszawie*. Drugi zakres badań zawartych w pracy obejmuje prace mające na celu zmodyfikowanie nanokryształów UCNPs tj. pokrycie ich warstwą SiO_2 , jej funkcjonalizację grupami $-\text{NH}_2$ oraz dołączenie do nich cząsteczek RB (różu bengalskiego) poprzez wytworzenie wiązania amidowego między azotem z grupy aminowej $-\text{NH}_2$ nanocząstek i węglem z grupy karboksylowej $-\text{COOH}$ w RB. Celem wytworzenia takich układów hybrydowych było sprawdzenie ich przydatności w terapii fotodynamicznej, wykorzystując do tego celu mysie komórki nowotworu piersi 4T1-Luc2 (ATCC-CRL2539). Drugą część pracy uważam za najbardziej kreatywną część rozprawy i mimo swoich uwag krytycznych za najbardziej wartościową.

Praca ta ma wysoce interdyscyplinarny charakter i zawiera wyniki badań z zakresu fizyki, chemii, inżynierii materiałów, biologii oraz medycyny. Praca jest napisana w bardzo staranny sposób, zawiera bardzo obszerną bibliografię, a przedstawiana dyskusja jest na wysokim poziomie merytorycznym. Praca zawiera rzetelne opisy prowadzonych eksperymentów, świadcząc o dobrym przygotowaniu metodologicznym autorki do prowadzonych badań. Dane eksperymentalne w większości przedstawione są w profesjonalny i rzetelny sposób, w wielu przypadkach poprzedzone są one pomiarami kontrolnymi i zawierają własne procedury preparatyki materiałów. Wszystko to, co powyżej świadczy o tym, że Pani Anna Borodziuk w zadawalającym stopniu opanowała warsztat eksperymentalny oraz zapoznała się i dobrze zrozumiała zagadnienia fizyko-chemiczne związane z nanokryształami konwertującymi energię w górę. W mojej opinii, czyni ją to osobą kompetentną w tej dziedzinie i daje podstawy do wytyczania w tej dziedzinie własnego kierunku badań w przyszłości.

Praca ta składa się z 5 rozdziałów: *Wprowadzenie, Charakterystyka strukturalna i właściwości optyczne nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$, Wpływ wysokiego pola magnetycznego na intensywność luminescencji nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$, Wpływ bliskości nanodrutów srebra na ścieżki wzbudzenia*

UCL w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, Uproszczenie metody przyłączenia RB do powierzchni nanocząstek a skuteczność terapii fotodynamicznej.

Poniżej odniosę się do każdego z rozdziałów z osobna, starając się wskazać w każdym rozdziale mocne i słabe strony oraz zadać pytania wynikające bądź z mojej ciekawości, bądź to z wątpliwości jakie nasuwały się w trakcie czytania poszczególnych rozdziałów. Jakakolwiek jednak krytyka zawarta w mojej recenzji nie ma wpływu na moją pozytywną opinię nt. pracy oraz nt. mojego przekonania o wysokich kompetencjach Pani Anny Borodziuk oraz jej predyspozycjach do pracy naukowca.

Ocena tematyki podjętych badań

Podjęmowana przez autorkę tematyka nie jest tematyką szczególnie nową, jednak jest to tematyka bardzo ciekawa, obszerna oraz wielodzielna, przez co tematyka dość złożona i trudna w realizacji ze względu na trudności w interpretacji otrzymywanych wyników i poszukiwanie w nich relacji przyczynowo-skutkowych. Osobiście uważam, że tematyka układów jonów ziem rzadkich w nanokryształach jest szczególnie trudna, gdy z wyników pomiarów zamierza się wyciągać subtelne wnioski nt. oddziaływań pomiędzy jonami, nt. mechanizmów wzbudzenia czy dyssypacji energii w takich układach. Badanie tego rodzaju zagadnień jest wystarczająco trudne nawet w litych kryształach. Jest to szczególnie trudne, gdy badania prowadzimy na makroskopowych zespołach nanokryształów i nie posiadamy do dyspozycji serii próbek, specjalnie wykonanych aby potwierdzić lub uzupełnić wykonany eksperyment.

Z jakiegoś powodu, nie od końca dla recenzenta jasnego, autorka podkreśla w temacie swojej pracy znaczenie otrzymanych wyników dla zastosowań w **terapii** fotodynamicznej. Tematyka ta jest zawarta jedynie w jednym z trzech rozdziałów, z których każdy zawiera równie wartościowe wyniki, i które to rozdziały nie są ze sobą w żaden sposób połączone przyczynowo-skutkowo. Dlaczego akurat ten rozdział zasłużył aby pojawić się w tytule rozprawy? Jeżeli już jednak autorka zdecydowała się na taki temat, oczekiwałbym znacznie większej argumentacji (danych) za realną możliwością wykorzystania takich materiałów w terapii fotodynamicznej. Jaki jest obecny stan rozwoju tej dziedziny? Jakie są najlepsze rozwiązania, rekordowe parametry komercyjnych rozwiązań? I jak na tle tych danych ma szansę wypaść wykorzystanie nanokryształów konwertujących energię w górę? Aby dokonać wiarygodnego porównania, dla samych nanokryształów oczekiwałbym także większej ilości dowodów - zarówno eksperymentalnych jak i referencji do badań klinicznych, że mają one potencjał być wykorzystane w praktyce klinicznej. Z tego co rozumiem, tego rodzaju materiał wprowadzony ma być do organizmu na dość znaczne głębokości, aby po wzbudzeniu światłem 980 nm generować aktywne formy tlenu w komórkach i tym samym je niszczyć. Z drugiej strony, materiały tego rodzaju charakteryzują się jedną z najgorszych wydajności kwantowych emisji wśród nanomateriałów – zazwyczaj poniżej 1%. W przypadku fototerapii, ta znikoma część energii ma zostać przetransferowana do związku (z pewnym prawdopodobieństwem, w pracy oszacowano optymistycznie ok. 30%) generującego tlen (z pewnym prawdopodobieństwem, w pracy wskazano 76%), niszcząc komórki (także z pewnym prawdopodobieństwem). Z powyższych powodów, oczekiwałbym bardziej przekonującej argumentacji za tym, że wymieniona niska wydajność procesu zostanie zrekompensowana zaletami światła podczerwonego, gdy oddziałuje ono z układami biologicznymi. W pracy pokazano, że zaobserwowany efekt występuje przy mocy naświetlania $2\text{W}/\text{cm}^2$. Jaka moc musiałaby zostać użyta w terapii aby taką moc otrzymały komórki np. w tkance mięśniowej, kilka centymetrów pod skórą? Czy stosowanie laserów tak dużej mocy ma szansę uczynić z tego metodę terapeutyczną? Czy taka moc nie spowoduje poparzeń skóry? Jakie stężenie wyjściowe UCPNs musiałaby zostać zastosowane aby komórki nowotworowe w organizmie mogły wchłonać stężenie 250

$\mu\text{g/ml}$? Czy takie ilości nieorganicznego, nie biodegradowalnego materiału do spożycia mają szansę być dopuszczone do zastosowań klinicznych?

Recenzent nie kojarzy pozwoleń wydanych przez FDA (*ang. Food and Drug Administration*) do stosowania tego rodzaju nanomateriałów mimo, że pierwsze tego rodzaju nanomateriały otrzymywane były niemal 20 lat temu. Dlaczego miałyby się to teraz zmienić? W pracy o tak zdefiniowanym tytule warto by taką dyskusję zawrzeć aby przekonać czytelnika, że takie badania mają sens inny niż czysto poznawczy.

Ocena celu pracy

Autorka postawiła sobie za cel udzielenie odpowiedzi na dwa złożone pytania:

- Jak pole magnetyczne wpływa na proces UC i intensywność UCL?
- W jaki sposób oddziaływanie UCNPs z plazmonami powstałymi w nanostrukturze hybrydowej AgNW-UCNPs wpływa na właściwości optyczne UCNPs?

oraz wykazanie skuteczności zastosowania UCNPs w przeciwnowotworowej terapii fotodynamicznej.

Trudno jednak ocenić czy pierwsze dwa cele pracy zostały w pełni zrealizowane ponieważ cele te są bardzo ogólnie zdefiniowane. Brak tutaj wyraźnej naukowej tezy, którą autorka mogłaby potwierdzić lub obalić. Przedstawione jednak wyniki w ramach realizacji tych celów dostarczają bardzo ciekawych danych eksperymentalnych, dających kontekst do dyskusji nt. oddziaływania UCNPs z nanodrutami metalicznymi czy zachowania UCNPs w polu magnetycznym.

W pracy nie znalazłem potwierdzenia skuteczności zastosowania UCNPs w terapii fotodynamicznej. W mojej ocenie, autorka dowiodła istnienia zjawiska generacji reaktywnego tlenu przy użyciu UCNPs w komórkach, powodującego obniżenie ich przeżywalności. Daleko jednak od takiego wyniku eksperymentalnego do stwierdzenia, że UCNPs mogą być zastosowane w terapii.

Przedstawione cele odnoszą się do bardzo ciekawych zagadnień fizycznych. Cele te są w zupełności na tyle ambitne, że sama próba ich realizacji stanowić może podstawę do powstania wartościowej rozprawy doktorskiej, za jaką uważam pracę Pani Anny Borodziuk.

Ocena merytoryczna wykonanej pracy

Wprowadzenie

Do tej części mam pytania głównie natury technicznej oraz kilka komentarzy, które mam nadzieję będą wartościowe dla autorki i pozwolą jej spojrzeć na pewne aspekty jej pracy w szerszym kontekście.

1. Jakie są jednostki dla wzoru 1.5 i 1.6? Jak się ma ten uproszczony opis dla układu dwupoziomowego w przybliżeniu dipola elektrycznego względem układu wieloelektronowego jakim są jony lantanowców z powłoką ekranującą 5d? W rozprawie jest prowadzonych wiele dyskusji starających się tłumaczyć subtelne zjawiska zachodzące pomiędzy jonami lantanowców, również w przypadku umieszczania lantanowców w polu magnetycznym. Dlatego dziwi mnie fakt braku przytoczenia w pracy (i skorzystania z) formalizmu Judda-Ofelta czy modeli kinetycznych stosowanych powszechnie dla lantanowców jak np. Inokuti-Hirayama, Burshtein, Pollnau czy Luxbacher.

2. W wielu miejscach pracy, autorka porównuje stosunki intensywności pasm emisji z zakresu czerwonego z emisją w zakresie zielonym. Pytanie czy otrzymywane widma emisji były każdorazowo korygowane o czułość spektralną użytego układu detekcji? Z opisu układów eksperymentalnych wynika, że układy pomiarowe różniły się układami detekcji. Z tego wniosek, że przy braku takiej korekcji stosunki pasm czerwonego do zielonego będą miały inne wartości (trend powinien być jednakowy).
3. Do pomiarów widm wzbudzenia zastosowano gęstość mocy promieniowania lasera 4.2 Wcm^{-2} . Czy to jest wielkość otrzymywana dla każdej długości fali pobudzania? Z Rys. 2.3 wynika, że nie. Czy korekta różnych mocy dla różnych energii pobudzania była dokonana eksperymentalnie (korekta mocy dla każdej długości fali) czy jako numeryczna korekta widma wzbudzenia poprzez uwzględnienie charakterystyki spektralnej lasera? To szczególnie istotne ponieważ autorka wyciąga i łączy wnioski z pomiarów widm wzbudzenia z pomiarami emisji w funkcji mocy. Pomiar wzbudzenia, bez korekcji eksperymentalnej mocy, może generować dwa zjawiska jednocześnie – różna długość fali pobudzania oraz różna gęstość mocy dla różnej długości fali pobudzania. Jeżeli nie było korekcji eksperymentu proszę o przedstawienie charakterystyki spektralnej mocy zastosowanego lasera aby pokazać jak bardzo różniła się moc lasera w zakresie skanowania widma wzbudzenia.
4. W pomiarach wzbudzenia stosowany był laser impulsowy i to o bardzo krótkim impulsie tj. 300 fs. Czy ma to jakieś znaczenie podczas porównywania tak otrzymanych wyników, z innymi pomiarami emisji mierzonej w trybie ciągłego pobudzania? Czy ma tutaj jakieś znaczenie fakt, że mamy do czynienia z jonami ziem rzadkich o bardzo długich czasach populacji i depopulacji?
5. Mierzone przez autorkę widma wzbudzenia są widmami dyskretnymi. Sugerowałbym więc zmianę linii ciągłej na wszystkich rysunkach na punkty, połączone krzywą 'dla oka', z zaznaczeniem błędu pomiarowego. We wstępie możemy przeczytać, że rozdzielczość układu eksperymentalnego daje dokładność jedynie 100 cm^{-1} . Nie wiadomo ile jest punktów na wykresie objętym dopasowaniem, który rozciąga się na skali ok. 1000 cm^{-1} . Ze skokowego kształtu widma wywnioskować można, że punktów nie ma wiele – co zgodne jest z podaną rozdzielczością układu. Zakładam, że otrzymane widma wzbudzenia (punkty) są wynikiem zmierzenia kilkakrotnego map emisji i ich uśrednienia?
Co więcej, każdy punkt na tym wykresie jest wynikiem całkowania pasma emisji tj. uśredniania po pakietach poziomów związanych z danym przejściem, które to pakiety są uśrednieniem po jonach w różnych polach krystalicznych. Podsumowując, prezentowane widmo jest mocno uśrednione i wykonane przy niskiej rozdzielczości. Moje doświadczenie mówi mi, że dopasowując takie rozrzedzone dane krzywą Voigta z kilkoma parametrami swobodnymi pozwala na otrzymanie parametrów krzywej z dość dużą dowolnością. Z dopasowania krzywymi analitycznymi tych widm, wyciągane są bardzo istotne wnioski nt. zjawisk fizycznych. Dlatego proszę o komentarz nt. szczegółów wykonania tych pomiarów i analizy numerycznej otrzymanych danych. Mając takie zestawy danych, byłbym bardzo ostrożny w konkludowaniu, że widma różnią się między sobą, a na pewno byłbym bardzo ostrożny z dopatrywaniem się w widmach wzbudzenia struktury subtelnej.
Ponadto nie do końca jest prawdą co autorka pisze, że otrzymane widmo reprezentuje widmo absorpcji jonów Yb^{3+} (jako splot z widmem lasera wzbudzającego). Tak by było, gdyby autorka zmierzyła widmo wzbudzenia przy 980 nm. Autorka mierzy widmo emisji jonów Er^{3+} . Rejestrowany sygnał to zatem:
Prawdopodobieństwo wzbudzenia jonów Yb^{3+} x Prawdopodobieństwo transferu energii z Yb^{3+} do Er^{3+} x Prawdopodobieństwo relaksacji w jonie Er^{3+} x Prawdopodobieństwo emisji z jonu Er^{3+}

Ciekawym dodatkiem do prowadzonej dyskusji byłoby zatem zmierzenie widma wzbudzenia jonów Yb^{3+} i widma wzbudzenia Er^{3+} zdefiniowanego jak wyżej aby wyciągnąć wnioski nt. transferu energii.

6. Na stronie 72 autorka pisze: *Zaobserwowane poszerzenie rezonansu absorpcyjnego jonu Yb^{3+} wraz z malejącym rozmiarem nanocząstek, czyli zmniejszenie wrażliwości na odstroięnie lasera, można zinterpretować jako zmniejszenie wydajności wzbudzenia w sposób trzyfotonowy. Może być to spowodowane tym, że wraz z malejącym rozmiarem UCNP's rośnie względna liczba jonów Yb^{3+} i Er^{3+} , które znajdują się na powierzchni nanocząstek. Jony powierzchniowe są wyeksponowane na wpływ wysokoenergetycznych fononów pochodzących z podłoża krzemowego lub z cząsteczek wody zaadsorbowanych na powierzchni próbki.* Jakie są typowe poszerzenia niejednorodne pasm absorpcji dla jonów Yb^{3+} spowodowane sprzężeniem z fononami? Czy nie ważniejszym efektem będzie to, że jony wewnątrz objętości i na powierzchni mają inne pole krystaliczne (symetrię i wartość)?
7. Analizując dane z Rys. 3.4 B autorka wyciąga wniosek, że uzyskana wartość współczynnika kierunkowego $n = 2.58$ sugeruje, iż wzbudzanie w jonach Er^{3+} zachodzi w procesie dwu i trzyfotonowym. To bardzo poważny wniosek, do którego autorka odwołuje się potem w pracy kilkakrotnie. Nasuwają się tutaj pytania na ile jest to wynik reprezentatywny? Czy autorka może wskazać zakres stosowalności wzoru (założenia do jego wyprowadzenia) na zależność intensywności od mocy? Ilość punktów na wykresie jest też bardzo niewielka. Takie dopasowanie powinno być wykonane w znacznie szerszym zakresie mocy aby liczby otrzymane z dopasowania były wiarygodne. Ten ważny wniosek wyciągnięto także na podstawie pomiaru jedynie jednej próbki.
8. Podczas wykonywania Rys. 3.4B jak liczona była moc zaprezentowana na osi? Czy jest to moc wysłana do układu, moc dostarczona do układu, czy moc zaabsorbowana przez układ? W mojej opinii, aby móc porównywać wyniki eksperymentalne wykonane na różnych układach eksperymentalnych dla UCNP's pomiary powinny być wykonywane przy podobnych warunkach pomiarowych – szczególnie gdy do pomiarów używamy laserów impulsowych i pracy ciągłej. Aby to zapewnić należy podawać do opisu każdego eksperymentu ilość fotonów na jednostkę czasu na jednostkę powierzchni liczoną wykorzystując wartość mocy zaabsorbowaną przez próbkę.
9. We wstępie eksperymentalnym autorka pisze, że do oceny czystości roztworu nanokryształów stosowała pomiary SEM. Do dość nietypowa procedura do oceny obecności organiki w roztworze i ilościowej oceny jej zawartości. Prośba o przytoczenie procedury i wyników takiego procesu czyszczenia.

I. Wpływ wysokiego pola magnetycznego na intensywność luminescencji nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$

Mocne punkty rozdziału:

- Za bardzo wartościowe w tym rozdziale uważam przedstawienie wyników pomiarów emisji UCNPs w wysokim polu magnetycznym. Z punktu widzenia fizyki, wynik takich pomiarów jest raczej znany. Jednak dostęp do tak wysokich pól magnetycznych jest mocno ograniczony dlatego dostarczenie potwierdzenia eksperymentalnego takich przewidywań teoretycznych można uznać za bardzo wartościowe. Autorka porównuje także otrzymane wyniki z prostym modelem teoretycznym. Mimo prostoty modelu, w bardzo przejrzysty sposób potwierdza on obserwowane wyniki. Uważam, że wyniki te mają bardzo dużą wartość dydaktyczną, nie tylko dla autorki ale również dla osób chcących zapoznać się z tematyką badań UCNPs.

Słabe punkty rozdziału:

- Jako motywację do tych badań autorka przytacza rozbieżności w literaturze dt. różnic w zależności zmian intensywność emisji z jonów z polem magnetycznym. Argumentując tą motywację autorka przytacza wyniki grup badawczych, które obserwowały **spadek intensywności ze wzrostem pola** i które efekt ten wyjaśniały wpływem pola magnetycznego na zwiększenie obsadzenia nieaktywnych optycznie poziomów energetycznych, zmianą absorpcji wzbudzającego promieniowania laserowego, zniekształceniem symetrii kryształu NaYF_4 lub przyspieszeniem szybkości relaksacji krzyżowych. W przeciwieństwie do tych wyników, autorka przytacza wyniki grup badawczych, które obserwowały **wzrost intensywności emisji** nanocząstek wraz ze wzrostem pola magnetycznego. Efekt ten wyjaśniano wzrostem wydajności transferu energii z jonów Yb^{3+} do jonów Er^{3+} . Po pierwsze, niewielka ilość przytoczonych cytowań sugeruje, że jest to problem marginalny w środowisku i zapewne jego rozstrzygnięcie nie wnosi wiele do rozwoju tego obszaru badań. Po drugie, szybka analiza cytowanych prac wskazuje, że materiały studiowane we wszystkich niemal pracach były różne, w niektórych istotnie różne ($\text{Er}^{3+}:\text{YVO}_4$; $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+},\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$; $\text{Eu}:\text{NaYF}_4$; $\text{NaNbO}_3:\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$). Główna, ale bardzo istotna różnica pomiędzy tymi wynikami polegać może na istotnych różnicach w symetriach pola krystalicznego, ale także w różnicach w rodzaju matrycy pod kątem drgań sieci. Mając to na uwadze, za zbyt ogólną uważam konkluzję, że istnieją jakieś istotne rozbieżności w literaturze, które należy rozstrzygnąć.
- Za kolejny słaby punkt przeprowadzonej w tym rozdziale analizy uważam, pominięcie w analizie faktu, że ze zmianą pola magnetycznego również poziomy Er^{3+} podlegają efektowi Zeemana. Przeprowadzona analiza skupia się głównie na odstrajaniu się poziomów Yb^{3+} . Czy są ku temu jakieś podstawy?

Pytania:

1. Autorka pisze: *Aby zapewnić wysoki stosunek sygnału do szumu, intensywność UCL nanocząstek musiała być odpowiednio wysoka. Z tego względu pomiary przeprowadzono w temperaturze 100 K, ponieważ w tej temperaturze obserwowana jest największa intensywność UCL nanocząstek.* Jest to na tyle ważna decyzja z punktu widzenia planowania eksperymentu, że oczekiwałbym tutaj więcej wyjaśnień. Dlaczego w 100K intensywność dla UCNPs jest najwyższa?

2. Prośba o podanie informacji jaka jest względna zmiana wartości intensywności emisji przy zmianie pola magnetycznego zaprezentowana na Rys.4.2? Inaczej, na ile jest to istotny efekt?
3. Recenzent nie rozumie do końca argumentacji dt. braku wpływu pola magnetycznego na proces transferu energii oraz wydajność emisji. W ogólności pole magnetyczne powinno wpłynąć na reguły wyboru i w jakimś stopniu mieć wpływ, co najmniej na wydajność emisji. Prośba o dokładniejsze wyjaśnienie genezy tego wniosku.

II. Wpływ bliskości nanodrutów srebra na ścieżki wzbudzenia UCL w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$

W niniejszym rozdziale zaprezentowano wyniki, które miały na celu wyjaśnienie, jak obecność nanodrutów srebra w pobliżu nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ wpływa na ich właściwości optyczne, a w szczególności na ich mechanizmy wzbudzenia i emisji.

Mocne strony rozdziału:

- Opracowanie protokołów powlekania nanodrutów srebra nanokryształami UCNPs

Słabe strony rozdziału:

- Badanie przeprowadzono na małej ilości próbek, dla niewielkiej ilości parametrów technologicznych
- Mało uwagi poświęcono mechanizmowi gaszenia emisji poprzez druty srebra, które absorbować mogą emisję zieloną z jonów Er^{3+} (skracanie czasu życia emisji). Główny nacisk w dyskusji był położony na wzmacnianie emisji. Do wyciągania wniosków nt. tego rodzaju oddziaływań zasadnym byłoby jednoczesne wykonywanie pomiarów wydajności kwantowej emisji. Skracanie czasu życia nie zawsze świadczy o poprawie wydajności emisji, zazwyczaj o jej spadku ze względu na sprzężenie z nowymi kanałami rekombinacji niepromienistej.
- Zbyt mała rozdzielczość układu pomiarowego względem planowanych badań. Rozdzielczość wykonywanych pomiarów jest istotnie większa (gorsza) niż rozmiar UCNPs. W pracy pokazano, że na powierzchni drutu Ag jest silna agregacja nanocząstek. Oczywistym jest zatem, że sygnał przy powierzchni nanodrutu będzie większy niż sygnał dla nanocząstek poza drutem, bo zależy on od ilości UCNPs/per mierzony pixel (rozmiar plamki lasera). Tego rodzaju badania ilościowe i analiza sprzężenia nanostruktur z plazmonami wymagają pomiarów na policzalnych nanocząstkach. Także warunki środowiskowe tj. obecność PVP w jakich znajdują się UCNPs są inne na drucie i poza drutem.

Pytania:

1. W rozdziale tym autorka pisze: *Na podstawie analizy otrzymanych map EDS można wywnioskować zatem, że w czasie powstawania nanostruktury hybrydowej nanocząstki adsorbują się bezpośrednio na powierzchni srebrnego nanodrutu pod warstwą polimeru PVP.* Na ile możliwe jest, że sam pomiar SEM wpływa na degradację warstwy PVP?
2. Autorka tłumaczy swoje wyniki różnicą w oddziaływaniu pomiędzy UCNPs-drut typu jon-dipol, a oddziaływaniem PVP-drut typu dipol-dipol. Jakie są typowe wartości takich oddziaływań? Na ile jest to istotna różnica?

3. Autorka pisze, że: *Wytwarzanie zawiesin z nanostrukturami hybrydowymi daje potencjalnie większe możliwości otrzymywania docelowych urządzeń*. Jakie urządzenia autorka ma na myśli? Jakie jest zastosowanie takiego układu?
4. Autorka pisze: *Następnie, na tak przygotowane szkiełko naniesiono kroplowo roztwór zawierający UCNPs. W obu próbkach stężenie nanocząstek i drutów nanoszonych na podłoże było takie samo*. Jak wykonano pomiar stężenia dla obu materiałów i jaki jest błąd wyznaczenia stężeń? Jakich metod analitycznych użyto do potwierdzenia wykonanych szacowań?
5. Autorka pisze, że: *Pomiary w trybie fluorescencyjnym wykonano wykorzystując pobudzenie próbek za pomocą promieniowania o długości fali 535 nm z mocą 200 μ W*. Nie do końca jest to jasne dla recenzenta. Czy UCNPs pobudzane były rezonansowo poprzez Er? Jeżeli tak to moc pobudzania była zaskakująco mała? Prośba o komentarz. Czy jest możliwość zobaczenia jak wygląda sygnał spektralny zebrany z tego obszaru? Czy jest możliwość, że prezentowane obrazy są wynikiem zbierania światła rozproszonego, a nie emisji z UCNPs?
6. Autorka na stronie 93 przytacza wzór (5.1, 5.2) stosowany do modelowania kinetyki jonów. Jest to wzór otrzymany dla modelu dwu poziomowego. Czy taki model do analizy narastania populacji Er pompowanego przez Yb w procesie nieliniowym jest miarodajny dla prowadzonej analizy? Modelowanie procesów kinetycznych dla jonów ziem rzadkich to dość skomplikowane zadanie. Są to układy wielopoziomowe, mamy do czynienia z procesami nieliniowymi oraz możliwymi oddziaływaniami Er-Yb, Yb-Yb czy Er-Er. Pomijam fakt, że de facto mamy zawsze dwie populacje aktywnych jonów Er – objętościowych i powierzchniowych, znajdujących się w różnych polach krystalicznych, a więc i o różnych parametrach kinetycznych. Dla przykładu: na Rys. 5.10B czy 5.11C widać ewidentnie, że dopasowanie jest słabej jakości. Jeżeli stosujemy uproszczone podejście do analizy zjawiska to byłbym ostrożny z wyciąganiem szczegółowych wniosków nt. zachodzących w nim procesów fizycznych.
7. Nie do końca czytelne jest dla mnie widmo absorpcji na Rys. 5.5. Dlaczego widmo to nie osiąga wartości zero na krańcach? Czy jest szansa, że przy pomiarze źle odjęte zostało tło i na krańcach widma powinna być jednak wartość 0 zamiast wartość 0.4? To by oznaczało, że absorpcja przez nanodrut długości fali 980 nm jest bliska zeru – co zgadzałoby się z moją intuicją. Dziwi mnie także kształt tego widma z maksimum przy 400 nm. Mamy tutaj do czynienia z makroskopowym drutem metalicznym więc nie oczekiwałbym zlokalizowanego rezonansu plazmonowego w widmie. Czy jest możliwość, że zaprezentowane widmo nie przedstawia widma absorpcji tylko widmo rozpraszania, ścięte po stronie wysoko energetycznej np. użyciem szklanej kувety, nieuwzględnieniem absorpcji wody, brakiem czułości detektora czy innym artefaktem? W celu rozwiania wątpliwości oczekiwałbym tutaj przynajmniej pokazania widma absorpcji ale zmierzonego w funkcji stężenia nanodrutów w szerokim przedziale stężeń.
8. Przy analizie stosunków pasma czerwonego od pasma zielonego dla nanokryształów na drucie i poza drutem autorka uwzględnia oddziaływania UCNPs z plazmonami. Nie znalazłem jednak dyskusji jak na różnice tych stosunków może wpłynąć różne otoczenie nanokryształów to jest PVP i brak PVP. Czy można zobaczyć jak wygląda widmo UCNPs na podłożu krzemowym i widmo UCNPs w polimerze? Czy już ta zmiana nie może powodować zmian w stosunku emisji pasma czerwonego do zielonego?
9. Na Rys.5.10 autorka prezentuje wyniki czasów narostów dla emisji Er³⁺ w UCNPs umieszczonych na drucie Ag i poza drutem Ag. Prośba o wyjaśnienie dlaczego ten czas narostu

się skraca w przypadku UCNPs na drucie i to tak bardzo istotnie, nawet mocniej niż dla skracania się czasu życia emisji?

10. Dlaczego podobne pomiary dla próbki drugiej (chyba takiej samej jeżeli chodzi o właściwości drutu i UCNPs) dają inne wyniki, a nawet odwrotne dla czasów narostu? Przy okazji analizy tych widm widać jak mało optymalny jest model funkcji wykładniczej do dopasowania widm zaniku emisji – szczególnie dla przypadku UCNPs na drucie.
11. Prośba o komentarz wyników symulacji na Rys. 5.12. Po pierwsze, średnica drutu została do tych symulacji przyjęta jako 50 nm podczas gdy w eksperymencie widać, że średnica drutów jest z przedziału 100 – 300 nm, pewnie średnio 200 nm. Z symulacji nie jest jasne, czy do modelowania założono sferę czy drut? Wydaje mi się, że sfera o 50 nm średnicy, a drut 200 nm średnicy i mikrometrów długości to dwa całkiem inne układy i nie wiem czy należy wyciągać wnioski z takich symulacji i aproksymować je na badany układ. Dla układu na poziomie pojedynczych dziesiątek nanometrów mamy już pewnie do czynienia ze zlokalizowanymi plazmonami i silnymi polami. Poza tym, w symulacji nie uwzględniono chyba PVP otaczającego taki układ. Chyba kontrast współczynnika załamania jest dość istotny z punktu widzenia takich symulacji? Poza tym, jeżeli nawet założyć, że drut Ag absorbuje 980 nm to gęstość mocy tego promieniowania jest o rzędy inna niż gęstość promieniowania zielonego emitowanego przez jony Erbu. Czy taka różnica została uwzględniona w symulacji czy założono jednakowy poziom mocy dla różnych długości fali generujących wzbudzenie w Ag? Prośba o podanie szczegółów tej symulacji i zasadności przeniesienia otrzymanych w niej wniosków do warunków otrzymanych wyników eksperymentalnych.

III. Uproszczenie metody przyłączania RB do powierzchni nanocząstek, a skuteczność terapii fotodynamicznej

W tym rozdziale pracy przedstawiono wyniki badań nad próbą poprawy skuteczności zastosowania UCNPs@SiO₂-RB w terapii fotodynamicznej. Przeprowadzone testy skuteczności terapii fotodynamicznej wykazały, że wykorzystanie UCNPs@SiO₂-RB o stężeniu 250 µgml⁻¹ przy 10 minutowej ekspozycji na promieniowanie podczerwone z gęstością mocy 2 Wcm⁻¹ powoduje spadek przeżywalności komórek do około 30%.

Silne strony rozdziału:

- Zaproponowanie modyfikacji protokołu funkcjonalizacji powierzchni UCNPs i zrezygnowanie z wykorzystania kwasu kapronowego, jako linkera, co umożliwiło zmniejszenie odległości między nanocząstką, a cząsteczką RB.

Słabe strony rozdziału:

- Brak badań i wyników DLS dla poszczególnych etapów modyfikacji nanokryształów. Zdjęcia na Rys.6.2 str. 108. wskazują, że nanocząstki występują w dużych agregatach o rozmiarach powyżej 100 nm. Takiego rodzaju materiał nie nadaje się do zastosowania w biologii i medycynie. W pierwszej kolejności należałoby pokazać widma DLS, które potwierdzić mogą, że proces silanizacji zakończył się skutecznie i autorka uzyskała wyizolowane układy UPC-SiO₂. Podobne pomiary DLS powinny zostać wykonane po procesie funkcjonalizacji oraz po koniugacji RB. Pomiary DLS są pomiarami powszechnie dostępnymi. W mojej opinii,



prorowadzenie badań tego rodzaju nie powinno się odbywać bez dostępu do pomiarów DLS oraz Zeta potencjału.

Pytania:

1. Autorka pisze *W następnym kroku wyznaczono liczbę UCNPs, jaka znajduje się w próbce UCNPs@SiO₂-RB o określonej masie i objętości.* Prośba o podanie procedury jak wyznaczone zostały te wielkości i jakimi dodatkowymi metodami analitycznymi zostały one potwierdzone.
2. Autorka pisze również, że: *Wykonane w opisany wyżej sposób obliczenia wykazały, że w badanym materiale na jedną nanocząstkę przypada w przybliżeniu 6900 ± 140 cząsteczek RB.* Prośba o podanie szczegółów jak to zostało policzone i odniesienie tej liczby do geometrii UCNPs. Ile jest atomów powierzchniowych dla nanokryształu NAYF₄? Z moich szacowań wynika, że to będą pojedyncze tysiące. Molekuła RB jest dość spora. Czy uwzględniając efekty steryczne liczba 6900 cząsteczek RB/nanokryształ jest realistyczna?
3. Jak wyznaczono, że uzyskano całkowite pokrycie powierzchni UCNP przez cząsteczki RB?
4. Z Rys.6.8. na str. 113 wynika że transfer energii z UCNPs do RB jest bardzo słabo wydajny. Autorka pisze wcześniej, że ma całkowite pokrycie powierzchni UPC. Skąd tak niewielka wydajność transferu energii?
5. Autorka pisze: *Oznacza to, że dla badanego materiału FRET nie jest jedyną drogą przekazu energii z nanocząstek do cząsteczek RB, lecz stanowi około 62% całkowitego przekazu energii. Pozostała część energii może być zatem przekazywana na drodze reabsorpcji.* Tego wniosku recenzent do końca nie rozumie. Skąd przekonanie, że pozostała energia jest przekazana do RB, a nie jest rozproszona?
6. Rys.6.14 *Z analizy obrazów przedstawionych na rysunkach 6.14(D) oraz (H) wynika, że sygnał pochodzący od nanocząstek pokrywa się z sygnałem zmierzonym dla wyznakowanych lizosomów. Oznacza to, że UCNPs@SiO₂-RB znajdują się wewnątrz komórek 4T1.* To tylko oznacza, że nanocząstki są w tej samej płaszczyźnie xy co lizosomy. Nie jest to dowód na obecność UCNPs wewnątrz komórek. Należałoby wykonać tutaj przynajmniej z-skan.

Podsumowując, bazując na zawartych w pracy wynikach eksperymentalnych oraz na dyskusji merytorycznej zawartej w pracy stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi związane z uzyskaniem stopnia doktora. W związku z tym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Fizyki, Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Anny Borodziuk do dalszych etapów procedury doktorskiej w celu uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk fizycznych.

Z poważaniem,


A.Podhorodecki