

Rzeszów 2022-05-30

Dr hab. Robert Pązik Prof. UR

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Zajdel zatytułowanej:

Ocena funkcjonalności i cytotoksyczności luminescencyjnych nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ do zastosowań biomedycznych

Przedstawiona do recenzji praca doktorska autorstwa Pani mgr Karoliny Zajdel dotyczy wieloaspektowych oraz interdyscyplinarnych badań określających właściwości nanomateriałów zdolnych do konwersji energii w góry na klasycznym obecnie układzie par jonowych $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$, które zostały na etapie syntezy wbudowane w strukturę krystaliczną modelowej matrycy nieorganicznej na bazie fluorku itrowo-sodowego (NaYF_4). Ocenione zostały jego podstawowe cechy strukturalne, morfologiczne, skład pierwiastkowy oraz wykonano imponującą liczbę badań biologicznych związanych z określeniem cytotoksyczności, mechanizmów endocytozy komórkowej, oddziaływania nanomateriałów na skrawki hipokampa szczurzego z jednoczesnym wskazaniem potencjalnie interesujących możliwości aplikacyjnych wspartych obiecującymi wynikami badań.

Praca została napisana w postaci klasycznej monografii. Promotorem pracy doktorskiej jest Pani dr hab. n. med. Małgorzata Frontczak-Baniewicz przy wsparciu merytorycznym Pani promotor pomocniczej dr n. fiz. Bożeny Sikory. Taki podział kompetencji jest dla mnie oczywisty i wynika z silnie interdyscyplinarnego charakteru badań, który w istocie wymagał szerszego spojrzenia na wybrany obszar badawczy wzmacniając potencjał naukowy dysertacji. Praca została wykonana w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, aczkolwiek wykorzystano zasoby oraz infrastrukturę badawczą wielu prestiżowych

instytucji krajowych jak i zagranicznych uzupełniając wachlarz metodologiczny pracy o najnowocześniejsze techniki. Należy wspomnieć, że część wyników została uzyskana w ramach realizacji projektu naukowego fundowanego przez Narodowe Centrum Nauki (DEC-2014/15/ST5/02604), środków statutowych IMDiK PAN oraz programu wymiany naukowej Erasmus+.

Dysertacja Pani mgr Karoliny Zajdel podzielona została na 5 głównych części. Zawiera wykaz skrótów, obszerne streszczenie w języku polskim i angielskim, oświadczenie autorki o innowacyjnym charakterze badań, podsumowanie, wnioski wraz z bibliografią oraz załącznikami stanowiącymi uzupełnienie wyników, które wyłączono z części głównej pracy. Całość zamieszczono na 202 stronach, okraszono 83 ilustracjami i zacytowano ogromną liczbę pozycji literaturowych (333 odnośniki), które zostały trafnie dobrane i są to pozycje aktualne. Część teoretyczna pracy przedstawiona jest w rozdziale pierwszym liczącym 45 stron. Rozdział ten podzielony jest na podrozdziały i dostarcza czytelnikowi niezbędnej oraz bardzo konkretnej wiedzy pozwalającej na wprowadzenie w tematykę pracy. Ta część nie jest przesadnie przeładowana i autorka skupiła się na przybliżeniu najistotniejszych kwestii.

Cel badań został określony w poprawny sposób i podzielony na kilka etapów zawierających cele szczegółowe, które w konsekwencji miały doprowadzić do osiągnięcia głównego zadania.

Właściwa część doktoratu dotycząca badań własnych autorki zaczyna się od rozdziału trzeciego opisem zastosowanych materiałów, metodologii i wykorzystanych technik. Rozdział czwarty w całości poświęcony został omówieniu wyników badań, a piąty stanowi krytyczną dyskusję otrzymanych rezultatów z odniesieniem autorki do osiągnięć innych grup badawczych i podkreśleniem własnej indywidualności naukowej. Wspomniane rozdziały zajmują 112 strony. Dysertacja kończy się szczegółowym podsumowaniem oraz przedstawieniem najważniejszych wniosków. Jak wspomniałem wcześniej, Pani magister zawarła aż 333 odnośniki literaturowe, co jednoznacznie wskazuje, że posiada szeroką wiedzę w wybranym przez siebie obszarze badawczym. Praca jest przygotowana z dbałością o szczegóły i napisana poprawnym językiem. Widać, że włożono dużo wysiłku w prezentację wyników i końcową formę przekazu. Zamieszczony materiał bardzo dobrze się



czyta i za ten aspekt pracy należy się Pani Karolinie pochwała i ukłon dla obu Pań promoterek za dopilnowanie całego procesu przygotowawczego pracy i wskazanie dobrych praktyk.

W kontekście najważniejszym, a więc merytorycznej zawartości dysertacji przede wszystkim chciałbym podkreślić, że praca dotyczy bardzo aktualnej tematyki związanej z syntezą nanomateriałów o właściwościach wielofunkcyjnych i ich ukierunkowaniu na wykorzystanie w szeroko pojętych aplikacjach biologicznych i medycznych.

Praca porusza istotne zagadnienia z tego obszaru i po określeniu typowych właściwości charakteryzujących sam nanomateriał skupia się na badaniach oddziaływania z układami biologicznymi. Wybrane zostały dwie linie komórkowe: embrionalne komórki nerki HEK293 oraz komórki nabłonkowe raka szyjki macicy HeLa (badania *in-vitro*). Jako model *ex-vivo* zaproponowano organotypowe skrawki hipokampa szczura pozyskiwane z oseków rasy Wistar. Autorka wykorzystwała cały arsenał najnowocześniejszych technik badawczych do charakterystyki przedstawionej zarówno w części materiałowej jak i biologicznej.

Według mojej oceny otrzymane wyniki są na światowym poziomie. Do szczególnie istotnych osiągnięć Pani mgr Karoliny Zajdel zaliczam przebadanie mechanizmów endocytozy związanej z internalizacją $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ w komórkach z wykorzystaniem techniki TEM. Faktycznie obszar ten ze względu na bardzo wysublimowany sposób preparatyki próbek i inne problemy jest trudny, a z drugiej strony wielce nagradzający ze względu na potencjalną istotność wyników. Bardzo ciekawe okazały się również wyniki dotyczące oddziaływania nanokonwerterów promieniowania podczerwonego w badaniach *ex-vivo* na skrawkach hipokampa. Pani mgr Karolina Zajdel zaproponowała metodykę podawania nanomateriałów oraz przeanalizowała ich lokalizację w strukturach komórkowych. Ostatni element, który należy docenić, to wykazanie możliwości detekcji i w konsekwencji obrazowania luminescencyjnego nanomateriałów po internalizacji w układach biologicznych, co znakomicie podkreśla potencjał wybranych nanomateriałów w aplikacjach biomedycznych.

W swojej recenzji chciałbym zwrócić uwagę na istotny interdyscyplinarny charakter badań z pogranicza chemii, fizyki ciała stałego, inżynierii materiałowej, biologii oraz nauk medycznych. Na pewno droga do osiągnięcia założonego celu nie była łatwa i wymagała przyswojenia ogromnej ilości wiedzy, poznania technik syntezy materiałów, metodologii badań stosowanych w wielu dyscyplinach oraz skoordynowania całości projektu. Uważam, że Pani mgr Karolinie Zajdel udało się w pełni osiągnąć założony cel zachowując przy tym sporą dozę samokrytyki, co świadczy o jej dojrzałości naukowej adekwatnej do etapu kariery.

Oczywiście w przedstawionej do recenzji pracy można znaleźć pewne mankamenty, jak w każdej innej. Uchybienia dotyczą braku ankiety osobowej, sfery edytorskiej, oraz zagadnieniami merytorycznymi wymagającymi doprecyzowania ze strony autorki.

Szkoda, że autorka nie zamieściła w formie osobnego załącznika informacji dotyczącej dotychczasowego dorobku i innej istotnej aktywności naukowej. Z zamieszczonych cytowań wynika, iż Pani Karolinie poddawała pod ocenę społeczności naukowej efekty swoich badań przynajmniej w dwóch czasopismach naukowych. Jeden został opublikowany na łamach *RSC Advances* (IF 3,36) a drugi w *Nanoscale* (IF 7,79). Sądząc po randze obu periodyków są to czasopisma specjalistyczne o dużym znaczeniu ze szczególnym wskazaniem na tą drugą pozycję. Ze wstępu do doktoratu wynika, że Pani Karolina uczestniczyła w realizacji projektu naukowego NCN, co świadczy o tym, że potrafi efektywnie pracować w zespole silnie zorientowanym na realizację założonych celów pod presją ram czasowych.

W kontekście błędów edytorskich, które nie wymagają komentarza, to na stronie 15 znajdujemy oczywistą omyłkę „.charakteryzujących się...”; dalej w tekście pojawia się angielskie tłumaczenie konwersja energii w górę pisane dwojako „up-conversion” bądź częściej „upconversion” (przykład porównanie strona 15 z 29); na stronie 16 znajdujemy „...spektrometria mas...”, skrót „NPs” pojawia się na stronie 25, a jego wyjaśnienie jest podane później (brak chronologii). Zdarzają się powtórzenia tych

samych wyrazów, które występują bardzo blisko siebie w tekście. Tak jak wspomniałem, nie są to błędy w żadnej mierze znaczące, ale z obowiązku recenzenta muszę je przytoczyć.

W zakresie merytorycznych uwag bardzo proszę o ustosunkowanie się do najważniejszych z nich, które wymieniam poniżej.

- (1) Strona 16 „Przeprowadzono również pomiary wartości potencjału powierzchniowego”, w części metodycznej znajdujemy definicję potencjału zeta, która jest sprzeczna z przedstawionym określeniem, proszę o doprecyzowanie, potencjał czego został zmierzony?
- (2) Strona 27 tabela 1, w kolumnie opisującej efekt toksyczny dla nanocząstek Fe_2O_3 napisała Pani, że materiał ten uwalnia jony Fe^{2+} , czy jest Pani pewna, że chodzi konkretnie o ten kation?
- (3) Strona 28 ta sama tabela dotycząca kropek kwantowych znajdujemy „...uwalniają toksyczne jonu kadmu...”, czy tylko kationy kadmu, skoro termin kropka kwantowa określa konkretną grupę materiałową dla której obserwuje się efekt ograniczenia kwantowego?, na stronie 31 w tabeli 2 ten zapis jest powielony.
- (4) Strona 32 cytuję „...fotowyswiecanie ze względu na krótkie czasy zaniku fluorescencji...” bardzo proszę o weryfikację poprawności tego stwierdzenia.
- (5) Podrozdział 1.4. mechanizmy konwersji energii w górę. Mój komentarz dotyczy zastosowanego podziału. Wymienia Pani jako (1) absorpcję ze stanu wzbudzonego ESA, (2) konwersję energii w górę z transferem energii ETU, (3) efekt lawinowej emisji fotonów PA, (4) relaksację krzyżową CR (sic!) oraz (5) konwersję energii z wykorzystaniem kooperatywnego uczulania CSU lub po prostu CU. To co budzi moje wewnętrzne kontrowersje to zjawisko relaksacji krzyżowej jako mechanizm, który w literaturze przypisywany jest do procesu pasożytniczego prowadzącego do spadku wydajności kwantowej wykazującego silną zależność od stężenia emitera. Rozumiem, że inspiracją jest cytowana praca, ale bardziej adekwatną pozycją w tym zakresie jest praca ojca chrzestnego tego zjawiska profesora F. Auzela (Chem. Rev. 2004, 104, 139), który CR traktuje jako element istotny w PA (mechanizm nr 5). Natomiast w cytowanej



przez Panią pozycji, autorzy przyznają, że CR w tym rozumieniu wykorzystywany jest do swoistej optymalizacji barwy emisji i w gruncie rzeczy odpowiada za wygaszanie stężeniowe. Wydaje mi się, że bardziej adekwatny byłby podział na (1) ESA, (2) ETU, (3) PA, (4) CSU oraz (5) EMU (*energy migration up-conversion*) konwersja z migracją energii – bardzo ciekawy mechanizm zachodzący w układzie czterech partycypujących jonów (Mahata et al. *Biomedicines*, 2021, 9, 756). Proszę o krótki komentarz.

- (6) Strona 49 i w zasadzie całą preparatyka. Tutaj moje wątpliwości budzi określenie techniki syntezy materiałów. Napisała Pani, że w syntezie NaYF_4 wykorzystuje metodę współstrącania z roztworu homogenicznego z czym bardzo trudno mi się zgodzić. W konfrontacji z literaturą w zakresie problematyki preparatyki NaYF_4 metoda, którą Pani opisała w doktoracie jest kwalifikowana jako metoda dekompozycji termicznej fluorooctanów lantanowców. Absolutnie nic Pani w tej technice nie strąca ponieważ produkt końcowy powstaje na etapie rozkładu termicznego owych substratów. Po zadnym czasie reakcja jest przerywana, a produkt jest wtedy w pełni uformowany (w ramach parametrów syntezy, i w rozumieniu rozmiaru cząstek oraz morfologii). O tym zresztą napisała Pani później na stornie 144. Zmiana warunków syntezy np. wydłużenie czasu reakcji zachodzącej w wysokiej temperaturze wpływa na kontrolę morfologii (kluczowy parametr dla konwersji) i rozmiar cząstek (kluczowy dla internalizacji). Zatem proces formowania NaYF_4 kończy się na tym etapie. Uważam, że nomenklatura działań podejmowanych po zakończeniu dekompozycji jest, co do zasady, błędna i wiąże się tylko z separacją i oczyszczaniem produktu końcowego z roztworu poreakcyjnego zawierającego finalny NaYF_4 . W pracy czytamy „*Nanokryształy wytrącano z wystudzonego roztworu nadmiarem etanolu...*” – nic tu Pani nie wytrącała, to jest separacja i początek oczyszczania. W mieszaninie poreakcyjnej znajduje się silnie niepolarny rozpuszczalnik, a do kształtowania morfologii i kontroli rozmiaru użyła Pani kwasu oleinowego. W dodatku jego chemisorpcja na powierzchni formującego się NaYF_4 nadał produktowi



hydrofobowy charakter. To spowodowało, że nie widzi Pani gołym okiem produktu (monodispersyjność, wielkość cząstek mniejsza od długości fali świetlnej). Toteż dodanie alkoholu spowodowało typowy efekt zmętnienia zawiesiny wskutek agregacji hydrofobowego produktu w silnie polarnym medium, po to żeby lepiej odseparować materiał od matczynego roztworu podczas wirowania i usuwania niechcianych zanieczyszczeń. W zasadzie jestem pewny, że być może nie do końca zostało to Pani wyjaśnione przez opiekuna szczególnie po przeczytaniu kolejnego zdania z tej samej strony. Cytuję „...zsyntezowane cząstki rozpuszczano w cykloheksanie” i dalej, aż do zdania z „Finalną próbkę ...zawieszano w 5 ml cykloheksanie”. Jeśli NaYF_4 jest rozpuszczalny w cykloheksanie to po co Pani wykonała syntezę? żeby stracić tak mozolnie tworzony produkt o pożądanej morfologii, który w dodatku formowany jest nie na tym etapie. Mało tego, na końcu zawiesza Pani próbkę w cykloheksanie i jakoś NaYF_4 zgodnie z opisem już się nie rozpuszcza, a stanowi medium, w którym stanowi fazą rozproszoną (cząstki NaYF_4). Myślę, że w tej materii zabrakło finalnej korekty przez osobę z doświadczeniem w tym zakresie. Za drogowskaz proszę popatrzeć na publikację naukowe innych autorów, wybór jest duży. Proszę zwrócić uwagę na różnice w obu podejściach syntetycznych pomiędzy techniką współstrącania NaYF_4 (kompletnie inne substraty, temperatura i są faktyczne stosowane czynniki strącające) a dekompozycją termiczną z wykorzystaniem wysokowrzących silnie niepolarnych rozpuszczalników organicznych. Tytułem wyjaśnienia, błąd ten absolutnie nie waży na osiągnięciach przedstawionych w pracy ponieważ pożądany produkt został uzyskany i w pełni scharakteryzowany.

- (7) Zmierzyła Pani potencjał zeta, dlaczego przy okazji tego pomiaru na popularnym urządzeniu nie zdecydowała się Pani na wyznaczenie średnicy hydrodynamicznej. Określenie tej wielkości mogłoby być pomocne w badaniach biologicznych. Zyskałaby Pani wiedzę na temat stanu agregacji nanocząstek w roztworze wodnym. Jest to ważna informacja, szczególnie w sytuacji gdy pozbawiono NaYF_4 ligandu hydrofobowego (z oczywistych względów) i powierzchnia



nie została zmodyfikowana inną substancją pomocniczą. Znajomość rozmiaru hydrodynamicznego i połączenia faktu o braku modyfikacji powierzchni NaYF_4 mogłaby pomóc wyjaśnić istnienie skupisk nanocząstek w komórkach.

(8) Na stronie 57 popełnia Pani podobne błędy jak w preparatyce w określeniu co się faktycznie dzieje po procesie usuwania ligandu. Żadne nanocząstki nie ulegają w tych warunkach rozpuszczeniu. Zważywszy, że w porównaniu z cykloheksanem kwas solny jest bardziej agresywny, a powoduje tylko usunięcie ligandu oleinianowego nie roztwarzając NaYF_4 do postaci wolnych jonów. Ten sam błąd powielony jest na stronie 145 cytuję „*Zmiany wywołane modyfikacją powierzchni nadają nanomateriałom nowych właściwości, takich jak dobra rozpuszczalność w wodzie (hydrofilowość)*” – to nie jest rozpuszczalność. Modyfikacja powierzchni i zmiana charakteru hydrofilowy-hydrofobowy (lub odwrotnie) umożliwia (1) transfer nanocząstek do rozpuszczalnika polarnego bądź niepolarnego oraz (2) pozwala myśleć o tworzeniu stabilnych dyspersji nanomateriałów w odpowiednim medium po uwzględnieniu dodatkowych czynników. W kontekście badań biologicznych zależy nam na materiale hydrofilowym (nic się nie rozpuszcza, patrz chemia koloidów), ale sam charakter hydrofilowy nanocząstki nie gwarantuje stabilności nanocząstki w zawieszynie.

(9) Strona 59, napisała Pani, że nanocząstki były przed użyciem sonikowane (20 minut) aby zapobiec tworzeniu skupisk materiału. Jaką ma Pani gwarancję, że po tym zabiegu cząstki nie będą agregować ponownie, skoro powierzchnia NaYF_4 nie został niczym zmodyfikowana w celu minimalizacji energii powierzchniowej? (brak modyfikacji lub funkcjonalizacji, brak dodatku stabilizatora sterycznego bądź elektrostatycznego). To się wiąże z problemem akcentowanym w komentarzu (7).

(10) W pracy wykorzystała Pani oprócz $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ materiał pokryty cienką warstwą amorficznej krzemionki. Dlaczego zabrakło charakterystyki właściwości luminescencyjnych tego ostatniego, zważywszy że materiał tworzący warstwę zewnętrzną może wpływać silnie



na właściwości spektroskopowe emitera, a został on użyty w eksperymencie ze skrawkami hipokampa?

(11) Na stronie 87 prezentuje Pani rycinę 19 próbki zawiesiny koloidalnej konwertera z widoczną zieloną intensywną emisją, podczas gdy użycie tego samego emitera w mikroskopii konfokalnej skutkuje widoczną emisją czerwoną?

(12) Strona 89, rycina 22, pokazała Pani zależność zmian stosunku intensywności emisji czerwonej do zielonej w zależności od gęstości optycznej lasera 980 nm, proszę o wyjaśnienie przyczyny tych zmian.

(13) W części biologicznej nie doszukałem się żadnych informacji na temat oceny cytotoksyczności $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}@\text{SiO}_2$. Proszę o racjonalne uzasadnienie wykorzystania tego materiału w eksperymencie *ex-vivo* ze skrawkami hipokampa?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Zajdel stanowi zbiór interesujących i oryginalnych wyników. Zauważone drobne błędy edytorskie oraz moje krytyczne uwagi nie wpływają znacząco na obniżenie merytorycznej wartości pracy. Uważam, że praca doktorska Pani mgr Karoliny Zajdel spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu pracom, które zostały zawarte w ustawie w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim.

Tym samym wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Zajdel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pragnę również zwrócić się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN o wyróżnienie pracy doktorskiej ze względu na istotność podjętej tematyki badawczej w zakresie zbadania zjawiska i mechanizmów endocytozy komórkowej nanomateriałów z wykorzystaniem techniki TEM, opracowania metodologii sposobu podawania nanocząstek w badaniach *ex-vivo* na skrawkach hipokampa, a także za wykazanie potencjalnych



możliwości wykorzystania $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ w obrazowaniu komórkowym z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

P. K.