

**Marta Gordel**

### Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)

Cel pracy:

Głównym powodem mojego zainteresowania badaniami w opisanej tematyce jest potrzeba nowych wydajnych znaczników, które mogą zostać użyte w trójwymiarowym obrazowaniu, zachodzącym równolegle z terapią, ściślej ujmując przy „leczeniu światłem”- fototerapii. W mojej pracy doktorskiej chciałam wskazać potencjalne wykorzystanie metod nanotechnologii, jednej z najbardziej spektakularnie rozwijających się dziedzin technologii w dzisiejszych czasach, zarówno dla diagnostyki jak i terapii (połączenie tych dwóch to „teranostyka”). Do tej pory, zagadnienia takiego wykorzystania nanoznaczników były badane przez wiele grup naukowców, jednak zazwyczaj cele diagnostyczne i terapeutyczne były charakteryzowane odrębnie, w przeciwieństwie do badań zawartych w tej pracy.

Streszczenie:

Badania opisane w tej pracy doktorskiej należą do stosunkowo młodej, interdyscyplinarnej dziedziny nauki – nanofotoniki. Zrealizowane projekty miały na celu opisanie zjawisk zachodzących podczas naświetlania materiału ograniczonego do rozmiarów rzędu od kilku do kilkuset nanometrów, wiązką światła o wysokiej energii. Badanymi procesami była absorpcja, rozpraszanie, emisja fluorescencji, wzmocnienie fluorescencyjnej emisji czy też wzmocnienie pola elektromagnetycznego w skali mniejszej niż ograniczający klasyczną optykę limit dyfrakcji. W pracy wykorzystałam nowe właściwości materii generowane gdy rozmiary kurczą się do skali nano ( $10^{-9}$ ), diametralnie różnią się wtedy one od klasycznych, makroskopowych właściwości charakteryzujących dany lity materiał. Zmiana właściwości wynika z ograniczenia przestrzennej struktury elektronowej, a także zwiększenia stosunku powierzchni materiału do jego objętości.<sup>23</sup> Dobrym przykładem są tu nanocząstki plazmoneczne, szeroko opisane w tej pracy, ich roztwory koloidalne posiadają silne pasmo absorpcji w zakresie widzialnym. W zależności od rozmiaru, kształtu, a także składu roztwór może posiadać różne kolory, w

## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)

przeciwieństwie do klasycznego zachowania powierzchni metalicznej, związanego z niemal całkowitym odbiciem światła widzialnego czyli metalicznym połyskiem. W skali nano mamy do czynienia ze zlokalizowanym powierzchniowy rezonans plazmowym, który daje podwaliny do manipulacji, modyfikacji i wzmocnienia pola elektromagnetycznego wokół nanostruktury metalicznej. Możliwość skupienia światła wokół nanocząstki poniżej limitu dyfrakcji znalazła szereg zastosowań, począwszy od mikroskopii bliskiego pola, detekcji za pomocą powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana (ang. „Surface-enhanced Raman spectroscopy”, SERS), do teranostyki, wytwarzania czytników pamięci czy ogniw słonecznych.

Z pośród szerokiej gamy nanocząstek metalicznych, w mojej pracy doktorskiej skupiłam się na badaniach prowadzonych nad nanoprętami złota i nanopowłokami złota. Pierwsze z nich podczas oddziaływania wolnych elektronów metalu z falą elektromagnetyczną powodują oscylację chmury elektronowej o dwóch częstotliwościach, poprzecznej (ok. 520 nm) i podłużnej (powyżej 650 nm, silnie zależna od stosunku długości do szerokości nanopręta). Nanopowłoki złota, są to struktury hybrydowe, składające się z krzemionkowej kulki, powleczonej warstwą złota, powierzchniowy rezonans plazmowy znajduje się w zakresie bliskiej podczerwieni, co jest powodem ich powszechnego zastosowania w medycynie. Pierwszy rozdział mojej pracy doktorskiej, wstęp teoretyczny, zapoznaje czytelnika z fizyką ciała stałego, zmianą właściwości gdy rozmiar materii redukowany jest do skali nano. Następnie omówiony jest obecny stan wiedzy na temat właściwości liniowych i nieliniowych nanostruktur plazmowych, proces samo-układania nanocząstek, dostępne metody syntezy metamateriałów, a także progi stabilności nanocząstek złota w zależności od rodzaju wiązki lasera próbkującego. W rozdziale zawierającym wprowadzenie teoretyczne znajduje się również przegląd literaturowy możliwych metod funkcjonalizacji powierzchni plazmowych nanostruktur. Poprzez dobór odpowiednich wiązań chemicznych, możliwe jest przyłączenie do powierzchni złota nici DNA, białek, przeciwciał, polimerów, dzięki czemu nanocząstki mogą selektywnie wnikać w komórki nowotworowe lub się do nich przyłączać i służyć zarówno w diagnostyce jak i leczeniu.

## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)

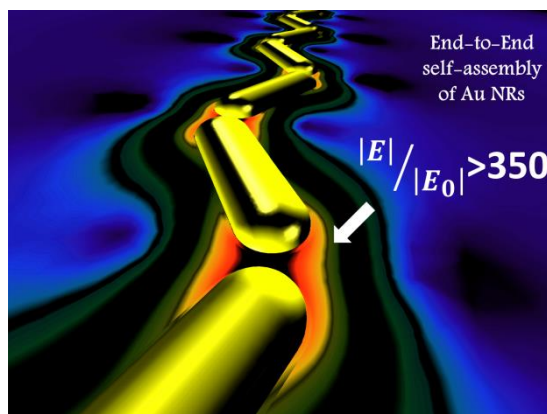
Drugi rozdział pracy doktorskiej omawia techniki eksperymentalne użyte do charakterystyki nanocząstek złota, przed i po funkcjonalizacji oraz organicznych barwników. Pierwszą z nich jest Z-skan, technika opracowana przez Sheik-Bahae, opis tej metody po raz pierwszy został opublikowany w 1990 roku. Układ pomiarowy, na którym pracowałam znajduje się w Katedrze Inżynierii i Modelowania Materiałów Zaawansowanych Politechniki Wrocławskiej. W badaniach stosowałam technikę Z-skan z otwartą i zamkniętą przesłoną, z wiązką Gaussowską, dla próbek cieńszych niż długość Rayleigha użytej wiązki. Technika ta pozwala na równoczesny pomiar nieliniowego współczynnika załamania światła ( $n_2$ ) oraz przekroju czynnego na absorpcję dwufotonową ( $\sigma_2$ ). Dodatkowo, zastosowanie przestrajalnego w szerokim zakresie widmowym femtosekundowego systemu laserowego pozwoliło na uzyskanie dyspersji wyżej wymienionych wartości w przedziale widmowym od 550 nm do 1600 nm. Kolejną techniką służącą do badania kinetyki relaksacji stanów wzbudzonych była metoda skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (ang. „time-correlated single-photon counting”, TCSPC). Układ pomiarowy używany przeze mnie znajduje się w laboratorium LBPA na École Normale Supérieure (ENS) w Cachan, we Francji. Jest to metoda mierząca czas zaniku stanu wzbudzonego poprzez zanik fluorescencji, wykonując ten pomiar byłam w stanie zmierzyć różnice w wydajności kwantowej, stałej promienistej, stałej bezpromienistej i zmianę czasu życia stanu wzbudzonego dla biofunkcjonalizowanych nanoprętów złota. Dodatkowo, morfologia oraz struktura krystaliczna otrzymywanych nanocząstek złota była badana przy wykorzystaniu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (ang. „Transmission Electron Microscopy”, TEM).

Trzeci rozdział pracy doktorskiej prezentuje metodę syntezy nanoprętów złota o ściśle kontrolowanych rozmiarach, wykonanych za pomocą metody mokrej chemii (ang. „wet chemistry method”). Ponadto, omawiam wpływ jonów srebra ( $Ag^+$ ), dodanych do mieszaniny reakcyjnej, na kształt i rozmiar nanocząstek złota. Następnie skupiam uwagę czytelnika na metodzie separacji nanocząstek złota, zastosowaną tutaj metodą jest wirowanie w gradiencie glukozy. To łatwa i wysoce wydajna metoda, która pozwala w krótkim czasie dokonać separacji nanocząstek pod względem masy, rozmiaru, a także kształtu. Jednorodność kształtu i dobrze kontrolowana wielkość nanocząstek były bazą

## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)

do kolejnych etapów przeprowadzonych badań, poświęconych samo-układaniu nanoprętów złota, a także badaniu właściwości nieliniowych nanostruktur plazmonicznych.

Kolejny etap badań poświęciłam analizie procesu samo-układania nanoprętów złota, który następuje podczas transferu nanocząstek z wody do izopropanolu. Charakterystyka optyczna, a także badania wykonane za pomocą spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. „Attenuated Total Reflectance”, ATR), pozwoliły wyjaśnić mechanizm samo-układania nanostruktur oparty na powstających wiązaniach wodorowych pomiędzy polimerami stabilizującymi powierzchnię. Dodatkowo, badania te są wzbogacone o teoretyczne obliczenia, które pokazały że samoorganizujące się nanopręty złota wykazują silną podatność optyczną, zależną od polaryzacji światła. Zostało oszacowane, że pole elektromagnetyczne zlokalizowane w przestrzeniach pomiędzy nanoprętami jest wzmocnione około 350 razy (Rys. 1). Te właściwości można zastosować w wykrywaniu biocząsteczek techniką SERS albo do tworzenia materiałów optycznych.



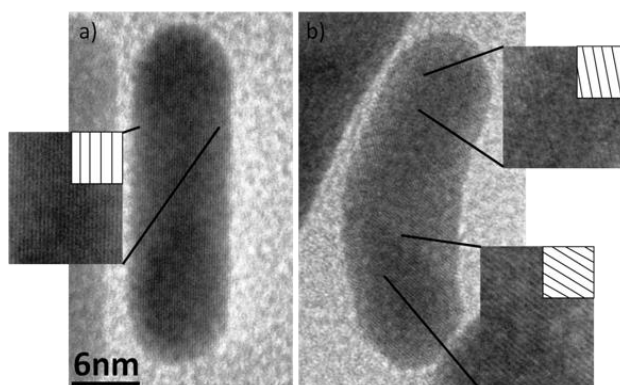
Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie procesu samo-organizacji nanoprętów złota, badania teoretyczne pokazały silne wzmocnienie pola elektrycznego w przestrzeniach między nanocząstkami.

W czwartym rozdziale dokonałam systematycznego i ilościowego opisu oddziaływania impulsów światła z nanoprętami złota (laser femtosekundowy, 130 fs, dł. fali 800 nm), które prowadziło do otrzymania nanostruktur o docelowych, specyficznych cechach.<sup>153</sup>

W tej pracy skupiłam się na badaniu zmian struktury krystalicznej nanoprętów złota

## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)

i parametrów wpływających na dokonanie zmiany. Zachodzące zmiany analizowałam uwzględniając modyfikację powierzchni za pomocą siarczku sodu, moc lasera i położenie podłużnego pasma absorpcji nanoprętów złota w odniesieniu do długości emisji źródła światła. Dodatkowo przeprowadziłam pomiar termicznej analizy grawimetrycznej (ang. „Thermogravimetric Analysis”, TGA), w celu zbadania zmian w składzie nanoprętów podczas ogrzewania. Otrzymane wyniki pokazały, że nanopręty z siarczkiem sodu na powierzchni są bardziej stabilne podczas naświetlania wiązką lasera od tych z niezmodyfikowaną powierzchnią, w obu przypadkach pasmo podłużne absorpcji było położone w tym samym zakresie długości fal. Kiedy naświetlamy próbkę zawierającą nanopręty złota w obszarze zbocza podłużnego pasma absorpcji, szerokość dystrybucji rozmiarów nanocząstek maleje. Ta metoda może stać się alternatywą do otrzymania prawie monodispersyjnego roztworu nanoprętów. Przeprowadzony eksperyment pokazuje również metodę otrzymania nowego rodzaju nanocząstek, o kształcie banana (ang. banana-shaped nanoparticle) w oparciu o przekształcanie post syntetyczne (Rys. 2).



Rysunek 2. Porównanie nanoprętów złota z pojedynczą siecią krystaliczną (a) i nanocząstki o kształcie banana (ang. banana-shaped nanoparticle) o bliźniaczej sieci krystalicznej.

W celu otrzymania nanostruktur o bliźniaczej sieci krystalicznej niezbędne jest naświetlanie próbki w maksimum podłużnego pasma absorpcji (moc  $3.6 \text{ mJ/cm}^2$ ), nowe nanocząstki stanowią około 10% spośród wszystkich nanocząstek zawieszonych w roztworze. Podsumowując, wyniki uzyskane w tym eksperymencie potwierdzają znaczący wkład topnienia powierzchniowego w fotoindukowanej transformacji nanoprętów złota. Otrzymane wyniki stanowią również alternatywną, metodę o ściśle kontrolowanych

## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)

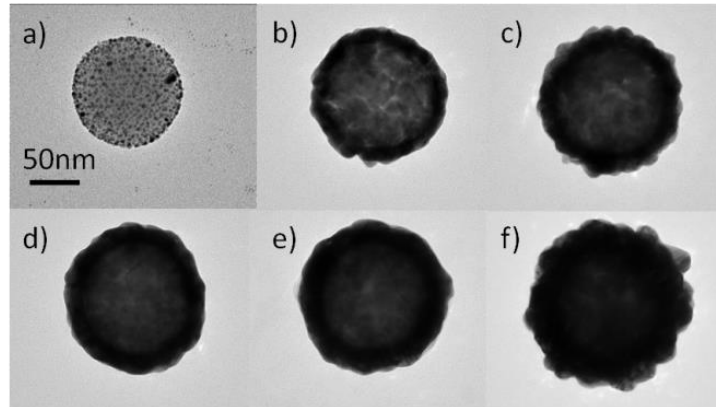
warunkach otrzymywania nanocząstek o nieopisanym do tej pory kształcie i ciekawej sieci krystalicznej, które mogą wykazywać interesujące właściwości optyczne. Dodatkowo, na podstawie analizy zdjęć TEM, a także widm absorpcji udało mi się obliczyć energię przypadającą na pojedynczą nanocząstkę, poniżej której nie zachodzą żadne modyfikacje sieci krystalicznej nanoprepta, tak więc morfologia nanostruktury pozostaje niezmienną.

Rozdział piąty mojej pracy doktorskiej ma na celu zapoznanie czytelnika z zagadnieniami optyki nieliniowej w odniesieniu do nanostruktur plazmonicznych jak i organicznych barwników. Powszechnie wiadomo, że przy małych intensywnościach światła absorpcja materiału zależy liniowo od intensywności wiązki wzbudzającej, co opisuje prawo Lamberta-Beera. Sytuacja się zmienia, gdy intensywność wiązki wzbudzającej jest bardzo duża, uzyskana za pomocą laserów impulsowych o długościach impulsu rzędu ns lub krótszych, w tych warunkach nieliniowość optyczna zaczyna odgrywać decydujące znaczenie. Parametry takie jak współczynniki absorpcji i załamania światła przestają być stałymi, ale zależą od intensywności światła. Dodatkowo mogą pojawić się procesy takie jak samoogniskowanie światła, generacja drugiej i trzeciej harmonicznej oraz absorpcja wielofotonowa.

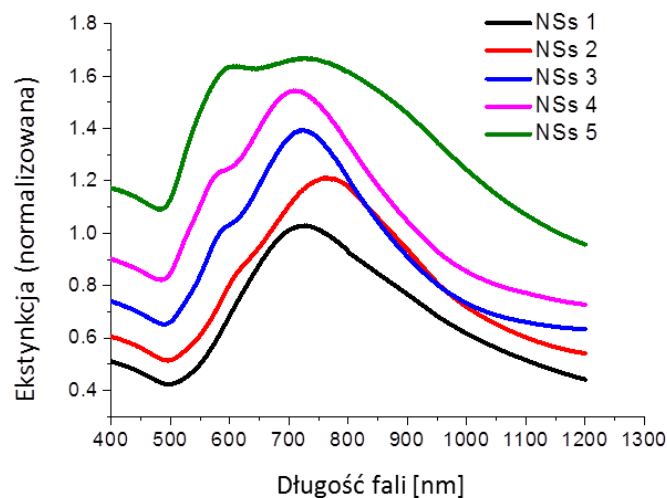
Właściwości nieliniowe opisanych materiałów zostały zbadane za pomocą techniki Z-skan przy otwartej i zamkniętej przesłonie, która polega na pomiarze transmisji wiązki światła przechodzącej przez próbkę, której położenie zmienia się w stosunku do ogniska w czasie pomiaru. Określone zostały przekroje na absorpcję dwu-fotonową, podane wartości zostały w jednostkach Goepert-Mayer ( $1GM = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1} \text{ molecule}^{-1}$ ). W pierwszym etapie moich badań skupiłam się na syntezie nanopowłok złota, która została wykonana za pomocą metody z zakresu „mokrej chemii”. Nanopowłoki złota składają się z rdzenia wykonanego z krzemowej kulki o średnicy 120 nm powleczonej warstwą złota, poprzez odpowiedni dobór reagentów byłam w stanie kontrolować grubość warstwy złota (Rys. 3), a tym samym położenie pasma ekstynkcji (Rys. 4).



## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)



Rysunek 3. Zdjęcia wybranych nanopowłok złota, wykonane za pomocą TEM: a) ziarno (krzemionkowa kulka o średnicy 120 nm ze złotymi wyspami; nanopowłoki złota o metalicznej warstwie b) do 10 nm, c)  $13 \pm 4$  nm, d)  $17.5 \pm 2$  nm, e)  $20 \pm 2.5$  nm f)  $25 \pm 7$  nm.

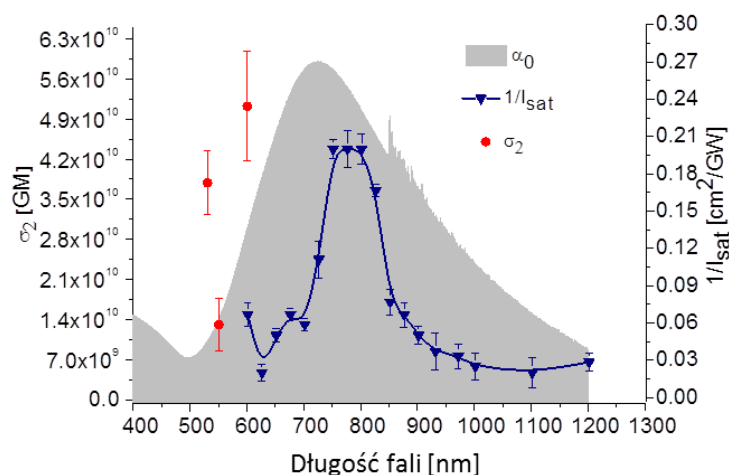


Rysunek 4. Znormalizowane widmo ekstynkcji do  $2.26 \cdot 10^{10}$  nanocząstek/ml, nanopowłoki o warstwie złota 10 nm (czarna linia),  $13 \pm 4$  nm (czerwona linia)  $17.5 \pm 2$  nm (niebieska linia),  $20 \pm 2.5$  nm (różowa linia),  $25 \pm 7$  nm (zielona linia).

Dla badanych koloidalnych roztworów nanopowłok złota wykonałam pomiary zespolonej trzeciorzędowej podatności elektrycznej  $\chi^{(3)}$ , dzięki czemu mogłam obliczyć przekrój czynny na absorpcję dwu-fotonową ( $\sigma_2$ ), a także wyznaczyłam poziom wysycenia jedno-fotonowej absorpcji ( $I_{SAT}$ ). Przykładowe wyniki dla nanopowłok o najcieńszej warstwie złota (NSs 1) znajdują się na Rys. 5. Właściwości nieliniowe badanych nanopowłok złota pokazały, że wyróżniają się one szeregiem cech, które mogą być użyte w praktycznych

## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)

zastosowaniach, szczególnie tych wykorzystujących silne właściwości nasycenia absorpcji. Co ciekawe, najbardziej korzystna kombinacja odpowiednich parametrów została uzyskana dla najcieńszych nanopowłok złota (NSs 1).



Rysunek 5. Wyniki reprezentujące zależność przekroju czynnego na absorpcję dwu-fotonową  $\sigma_2$ , oraz odwrotność wysycenia jedno-fotonowej absorpcji ( $1/I_{\text{SAT}}$ ) od długości fali wiązki lasera wzbudzającego próbkę. Szare pole reprezentuje zakres widma ekstynkcji analizowanego roztworu. Pomiar dla nanopowłok NSs 1.

W kolejnym etapie porównałam otrzymane wyniki nieliniowych właściwości optycznych nanopowłok i nanoprętów złota za pomocą tej samej techniki. Uzyskane wyniki dały mi podstawy aby wysunąć poniższe wnioski. Nanopręty złota są bardziej wydajnymi absorberami niż nanopowłoki złota, ważnym etapem było wprowadzenie współczynnika normalizującego (ang. merit factor), który pozwolił porównać wydajność procesu absorpcji względem masy molowej danej nanocząstki. Jednak ze względu na bardzo wysoką bezwzględną wartość  $\sigma_2$ , nanopowłoki złota posiadają dużą przewagę nad znacznie mniejszymi plazmonicznymi nanocząstkami o innych geometriach. Maksimum wartości odwrotności wysycenia absorpcji, przypada przy maksimum pasma ekstynkcji, zarówno dla nanopowłok i nanoprętów złota. Warto wspomnieć, że wszystkie pomiary zostały wykonane przy wartości energii przypadającej na jedną nanocząstkę poniżej progu topnienia badanych nanostruktur. Dodatkowo, dane są wzbogacone o badania teoretyczne, które dają porównanie udziału absorpcji oraz rozpraszania w całkowitym widmie ekstynkcji dla wszystkich badanych nanocząstek złota. W tym rozdziale zawarłam

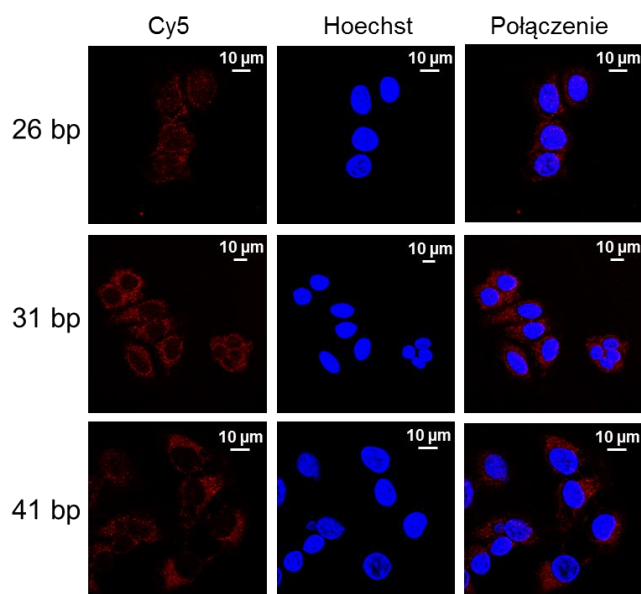


## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)

także wyniki pomiarów nieliniowych właściwości optycznych nowych, organicznych barwników, o strukturze typu elektron donor –  $\pi$  - elektron akceptor, która zwiększa prawdopodobieństwo absorpcji dwóch fotonów. Otrzymane wartości  $\sigma_2$  były w przedziale 300- 400 GM. Na końcu tego rozdziału, zaprezentowałam wyższość nieorganicznych absorberów nad organicznymi absorberami, a także wskazałam na możliwe zastosowanie obu grup związków w nanofotonice, biofotonice, przechowywaniu danych, a także teranostyce.

Kolejny rozdział, szósty, wprowadza czytelnika w biologiczny aspekt mojej pracy doktorskiej, mający na celu przygotowanie biologicznego znacznika do obrazowania żywych komórek, a także do potencjalnego zastosowania w termicznej walce z komórkami rakowymi. Opisałam proces stabilizacji powierzchni, a także biofunkcjonalizacji nanoprętów złota niciami DNA ze znacznikiem fluorescencyjnym (barwnik Cy5). Za pomocą technik stacjonarnych (ang. steady state techniques), jak i czasowo rozdzielczych (ang. time-resolved techniques), udało mi się wyznaczyć odległość barwnika od złotej powierzchni, dla której wzmocnienie procesu fluorescencji jest największe ( jest to 31 bp, 10.5 nm). Po syntezie nanopręty złota pokryte są warstwą podwójną toksycznego surfaktanta (CTAB). W kolejnym etapie opracowałam metodę wymiany toksycznej substancji powierzchniowej na polimer z grupą tiolową utrzymującą stabilność nanostruktur, z jednoczesnym bardzo niskim współczynnikiem śmiertelności znacznika dla komórek ( < 5%). Następnie dobrałam czas inkubacji, a także stężenie znacznika pozwalające najefektywniej zobrazować żywe komórki z linii komórkowej MCF7. Na Rysunku 6 przedstawione są wybrane zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu konfokalnego, znacznik pozostaje w cytoplazmie (czerwony kolor), dla lepszego kontrastu jądro komórkowe zostało zabarwione za pomocą barwnika Hoechst (niebieski kolor). Kolejna kolumna to połączenie dwóch wcześniejszych obrazów.

## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)

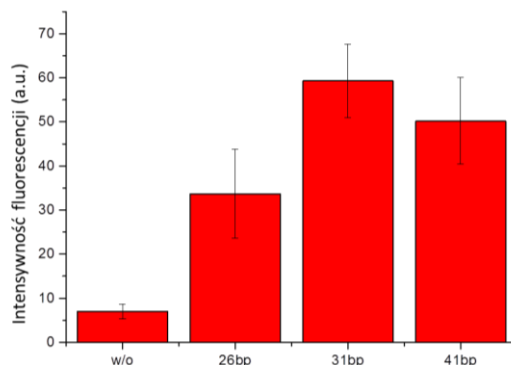


Cy5 : Wzbudzenie : 633 nm – Emisja : 650-700 nm  
Hoechst : Wzbudzenie 2-hv : 740 nm – Emisja : 400-450 nm

Rysunek 6. Obrazowanie komórek z linii MCF7 za pomocą mikroskopu konfokalnego, na czerwono oznaczona jest cytoplazma za pomocą biofunkcjonalizowanych nanoprętów z przyłączonym barwnikiem Cy5 (kolor czerwony), jądro komórkowe oznaczone za pomocą barwnika Hoechst, kolejna kolumna to połączenie dwóch poprzednich zdjęć. Badanie prowadzone dla znacznika z różną długością przyłączonych nici DNA (26 bp, 31 bp i 41 bp).

Po użyciu  $6 \cdot 10^{10}$  znaczników na 4 000 000 komórek MCF7 po trzech godzinach uzyskałam maksymalną wartość fluorescencji. Wyniki uzyskane na żywych komórkach (Rys. 7), potwierdzają wcześniejsze rezultaty uzyskane technikami w stanie stacjonarnym, a także czasowo rozdzielczymi. Największą wartość fluorescencji zarejestrowano dla nanoprętów funkcjonalizowanych DNA o długości 31 bp. Znacznik bardzo szybko wchłania się do wnętrza komórek, tym samym otrzymane wyniki dają duże podstawy do stwierdzenia, iż po wstrzyknięciu znacznika do ludzkiego krwioobiegu bardzo szybko trafi on do komórek rakowych. Komórki te podczas naświetlania wysokoenergetyczną wiązką lasera z zakresu bliskiej podczerwieni wygenerują ciepło, które doprowadzi do ich śmierci termicznej. Jestem bardzo entuzjastycznie nastawiona do otrzymanych wyników *in vitro*, które dają nadzieję do szybkiego zastosowania znacznika w badaniach *in vivo*.

## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)



Rysunek 7. Ilościowy pomiar fluorescencyjnej emisji pochodzący z żywych, pojedynczych komórek, w/o przedstawia autofluorescencję komórek bez znacznika, kolejne reprezentują pomiar dla komórek ze znacznikiem funkcjonalizowanym za pomocą nici DNA 26bp, 31 bp i 41 bp.

Podsumowanie:

Badanie zawarte w tej pracy mają charakter interdyscyplinarny, pogłębiają wiedzę z zakresu syntezy nanostruktur plazmonicznych, metod separacji, prowadzących do uzyskania koloidalnych roztworów zawierających prawie monodispersyjne nanocząstki. Opisana została metoda syntezy nowego metamateriału, wytworzonego podczas transferu nanoprętów złota z wody do izopropanolu. Przeprowadzona charakterystyka pokazała bardzo duże wzmocnienie pola elektromagnetycznego w przestrzeniach między nanocząstkami. Wskazałam na duży potencjał zastosowania tego materiału jako podłoża w detekcji biomolekuł. Ponadto, przygotowałam wysoce stabilne nanopowłoki złota z kontrolowaną grubością warstwy złota. Za pomocą techniki Z-skan dokonałam pomiaru właściwości nieliniowych nanopowłok złota, następnie porównałam je z wynikami uzyskanymi dla nanoprętów złota i organicznych barwników, wskazując na możliwe zastosowania. Przedstawiłam nową metodę biofunkcjonalizacji nanoprętów złota, która pozwoliła mi na stworzenie znacznika do obrazowania żywych komórek, a także ze względu na możliwość przemiany energii świetlnej w termiczną przez nanostruktury plazmoniczne na dalsze zastosowanie w badaniach teranostycznych.

## Streszczenie w języku polskim (Summary in Polish)