

Natalia Jurga

Doctoral thesis „*Surface modification and functionalization of upconverting nanoparticles and their biological studies*”

Tytuł w języku polskim „*Modyfikacja i funkcjonalizacja powierzchni nanocząstek wykazujących zjawisko up-konwersji oraz ich badania biologiczne*”

Streszczenie w języku polskim

W dzisiejszych czasach coraz większym zainteresowaniem cieszą się nanocząstki domieszkowane jonami lantanowców (Ln^{3+}). Ich unikalne właściwości spektroskopowe pozwalają na wykorzystanie w zaawansowanej biomedycynie. W szczególności warto zwrócić uwagę na nanocząstki, które wykazują zjawisko konwersji energii fotonów w górę (ang. upconversion). Te wyjątkowe nanostruktury umożliwiają przekształcenie dwóch lub większej ilości fotonów z obszaru bliskiej podczerwieni (NIR) w jeden foton o wyższej energii, którego emisję można obserwować w rejonie NIR, ultrafioletu (UV) lub zakresie widzialnym. Najczęściej badane nanocząstki konwertujące energię w górę są oparte o fluorki metali ziem rzadkich (MREF_4) ze względu na ich niską energię fononów, dobrą stabilność chemiczną i wydajną luminescencję. Nanocząstki często pokrywa się dodatkową powłoką w celu zwiększenia intensywności ich luminescencji. Dodatkowa powłoka chroni jony luminescencyjne przed niepożądanym wygaszeniem ich stanów wzbudzonych, które może być związane m.in. z oddziaływaniem cząsteczek rozpuszczalnika. Najbardziej efektywną metodą syntezy wysokiej jakości nanocząstek typu rdzeń/powłoka jest wytrącanie w rozpuszczalnikach o wysokiej temperaturze wrzenia. Zsyntetyzowane tą metodą nanocząstki mają na swojej powierzchni organiczne ligandy, przez co wymagają dodatkowej modyfikacji, aby stały się hydrofilowe. Jednym z najprostszych sposobów przeniesienia nanocząstek z fazy organicznej do wody jest protonowanie ligandów organicznych silnym kwasem, co skutkuje usunięciem ich z powierzchni. Pozbawione ligandów nanocząstki tworzą koloidy, które utrzymują swoją stabilność w wodzie przez kilka miesięcy. Tak zmodyfikowane nanocząstki mogą być stosowane w medycynie jako biosensory, czujniki termiczne i chemiczne oraz znaczniki w testach immunologicznych do wykrywania markerów chorobowych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była synteza nanocząstek typu rdzeń/powłoka konwertujących energię fotonów w górę, modyfikacja i funkcjonalizacja ich powierzchni oraz zbadanie ich potencjalnego zastosowania, ukierunkowanego na biologię oraz medycynę. W trakcie tych badań wykorzystano przede wszystkim nanocząstki, które mogą zostać wzbudzone w zakresie tzw. okien biologicznych. To istotne, ponieważ taki wybór gwarantuje, między innymi, większą możliwość penetracji tkanek oraz jednocześnie eliminuje zjawisko autofluorescencji. W dążeniu do osiągnięcia optymalnych rezultatów pod kątem biokompatybilności, przeprowadzono precyzyjne analizy wpływu modyfikacji powierzchni nanocząstek na ich fundamentalne właściwości.

Metoda syntezy nanocząstek odgrywa kluczową rolę w osiągnięciu ich odpowiednich właściwości i potencjalnych zastosowań produktu końcowego. Z tego powodu, w początkowej części badań, porównałam nanocząstki otrzymane przy użyciu różnych prekursorów jonów metali ziem rzadkich (RE), koncentrując się na właściwościach fizykochemicznych, cytotoksycznych i termoczułych. Porównanie to pozwoliło na otrzymanie najbardziej obiecującego produktu do dalszych badań. Kompleksowa analiza właściwości fizykochemicznych i biologicznych zsyntetyzowanych nanocząstek typu rdzeń/powłoka wykazała, że najlepszymi właściwościami charakteryzowały się nanocząstki $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ otrzymane z octanów RE. Nanocząstki otrzymano w formie małych pręcików o średnim rozmiarze około 15 nm. Wykazywały one najwyższą stabilność w roztworze wodnym i stosunkowo niską cytotoksyczność. Wykorzystanie octanów RE jako źródła prekursorów w syntezie nanocząstek okazało się dobrą alternatywą do oleinianów oraz chlorków RE. Ich użycie nie pogorszyło jakości, intensywności emisji, wydajności kwantowej ani właściwości biologicznych nanocząstek.

W drugiej części rozprawy doktorskiej skupiłam się na modyfikacji powierzchni wcześniej zsyntetyzowanych nanocząstek, w celu nadania im właściwości hydrofilowych. Do usunięcia ligandu organicznego, tj. kwasu oleinowego, z powierzchni nanocząstek wykorzystałam różne stężenia kwasu solnego (HCl) i zróżnicowane czasy prowadzenia reakcji. Po przeprowadzeniu szeregu eksperymentów stwierdzono, że procedura oparta na użyciu 2 M roztworu HCl i 15 minutowym mieszaniu była najbardziej skuteczna spośród wszystkich testowanych wariantów. Metoda ta pozwoliła uzyskać najwyższą wydajność reakcji, sięgającą 96%. Co więcej, obecność 2 M kwasu nie wpłynęła negatywnie na morfologię i rozmiar nanocząstek. Zachowały one wysoką intensywność emisji przy wzbudzeniu o długości fali 975 nm, potwierdzając efektywne przeniesienie energii między jonami Ln^{3+} , którymi domieszkowane były nanocząstki. W wyniku tej modyfikacji, były one stabilne w roztworze

wodnym nawet do sześciu miesięcy, co czyni je odpowiednimi do zastosowań w biologii oraz medycynie.

W kolejnej części rozprawy doktorskiej zbadalam luminescencję różnych typów nanocząstek konwertujących energię fotonów w górę zarówno w wodzie jak i w pełnej krwi ludzkiej. Analizowałam cztery rodzaje nanocząstek konwertujących energię w górę: $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$, $\text{NaErF}_4/\text{NaYF}_4$, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ oraz $\text{NaTmF}_4/\text{NaYF}_4$. Ponadto, określiłam głębokość penetracji czterech różnych długości fal lasera: 808, 975, 1208 i 1532 nm na podstawie odległości, jaką światło lasera może przebyć przez medium, zanim zostanie znacząco osłabione. Dodatkowo zmierzyłam grubość warstwy krwi umożliwiającą obserwację sygnału luminescencyjnego nanocząstek. W zależności od składu chemicznego związków, luminescencję obserwowano w zakresie 500 - 1000 nm. Warto zauważyć, że obecność wody i hemoglobiny, które są składnikami krwi, znacząco wpłynęła na rejestrowane widma emisji. Spośród różnych badanych nanocząstek typu rdzeń/powłoka, $\text{NaErF}_4/\text{NaYF}_4$ wykazały największy potencjał do dalszych zastosowań. Jedną z kluczowych zalet tych materiałów jest możliwość ich wzbudzenia przy użyciu trzech różnych długości fali z zakresu okien biologicznych. Pomimo najmniejszego rozmiaru, w porównaniu z innymi badanymi nanocząstkami, sygnał luminescencji $\text{NaErF}_4/\text{NaYF}_4$ był wykrywalny przez warstwę krwi o grubości 3,0 - 3,5 mm. Wynik ten jest lepszy niż w przypadku innych cząstek. Eksperymenty potwierdziły zalety wzbudzenia laserem o długości fali 1532 nm, który może przenikać przez krew aż na głębokość 7,5 mm.

W ostatniej części rozprawy doktorskiej opisano syntezę, właściwości i zastosowania nanocząstek $\text{LiYbF}_4:\text{Tm}^{3+}/\text{LiYF}_4$ typu rdzeń/powłoka o tetragonalnej strukturze. W pracy testowałam trzy stężenia jonów Tm^{3+} aby określić, które z nich jest najbardziej optymalne dla intensywności emisji nanocząstek. Ze względu na przeniesienie energii między jonami Yb^{3+} i Tm^{3+} po wzbudzeniu laserem o długości fali 975 nm, zsyntetyzowane nanocząstki wykazywały intensywną emisję w UV, w szczególności przy 347 nm. Emisja w zakresie UV ma kluczowe znaczenie w generowaniu reaktywnych form tlenu (ROS), m.in. tlenu singletowego, w obecności hematoporfiryny (HMME) znajdującej się na powierzchni nanocząstek. Wykrycie ROS było możliwe dzięki zastosowaniu czułego barwnika (ang. *Singlet Oxygen Sensor Green*). Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że zsyntetyzowane nanocząstki mogą znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej (PDT), w której emitujące promieniowanie UV nanocząstki mogą lokalnie niszczyć komórki nowotworowe po napromieniowaniu światłem z zakresu NIR. Ponadto, wysoka intensywność emisji tych nanocząstek przy długości fali 800 nm pozwoliła na użycie ich jako beztlowych

znaczników luminescencyjnych w testach immunochemicznych. Materiały te wykorzystano do wykrywania nukleoproteiny N z SARS-CoV-2, która jest czynnikiem wywołującym Covid-19. Nanocząstki $\text{LiYbF}_4:\text{Tm}^{3+}/\text{LiYF}_4$ typu rdzeń/powłoka oferują liczne zalety i mogą być dobrymi alternatywami dla najczęściej badanych nanocząstek konwertujących energię w górę opartych na matrycy NaYF_4 .

Podsumowując, z powodzeniem zmodyfikowano i sfunkcjonalizowano powierzchnię nanocząstek konwertujących energię fotonów w górę typu rdzeń/powłoka przy użyciu różnych ligandów i białek. Sfunkcjonalizowane materiały oferują ogromny potencjał do dalszego wykorzystania w biologii i medycynie.

