



Prof. dr hab. Jolanta Borucka-Bukowska

Wydział Chemii

Uniwersytet Warszawski

ul. L. Pasteura 1, 02093 Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Jaworskiej

pt. „ Surface enhanced Raman spectroscopy in diagnostics of endothelium: from adsorption of pyridinium salts to physicochemical studies on cells”

Praca doktorska mgr Aleksandry Jaworskiej została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej. Rolę ko-promotora pełniła dr Kamilla Małek.

Jak jasno wynika z tytułu pracy dotyczy ona możliwości wykorzystania spektroskopii powierzchniowo wzmocnionego rozproszenia ramanowskiego (SERS) do diagnostyki komórek śródbłonna. Poszukiwanie nowych, skutecznych narzędzi fizycznych do badania obiektów biologicznych i opracowywanie nowoczesnych metod diagnostycznych na potrzeby medycyny to jedno z istotniejszych wyzwań współczesnej chemii i fizyki. Wśród tych narzędzi ważne miejsce zajmują metody spektroskopowe, charakteryzujące się nieinwazyjnością, wysoką czułością i bogactwem możliwych do wykorzystania informacji na poziomie molekularnym. Praca doktorska mgr Aleksandry Jaworskiej doskonale wpisuje się w ten nurt badań, koncentrując się na opracowaniu metodologii powierzchniowo wzmocnionego rozproszenia ramanowskiego (SERS), nastawionej na wykorzystanie zjawiska SERS do diagnozowania komórek śródbłonna. Aby poprawnie usytuować recenzowaną pracę doktorską wśród licznych badań prowadzonych na świecie w dziedzinie spektroskopii SERS, należy przyjrzeć się w jakim kierunku ewoluuje ta dziedzina w literaturze światowej.

Zjawisko SERS jest znane od dawna (odkrycie to koniec lat siedemdziesiątych XX wieku). Prace teoretyczne i doświadczalne poświęcone wyjaśnieniu natury wzmocnienia powierzchniowego rozproszenia ramanowskiego doprowadziły już moim zdaniem do zrozumienia i dobrego opisu fizycznych podstaw zjawiska. W związku z tym ten nurt prac stopniowo wygasa. To co budzi w ostatnim czasie największe zainteresowanie wśród badaczy pracujących w dziedzinie spektroskopii SERS to oprócz prac zmierzających do otrzymania

nanostrukturalnych podłoży o wysokich współczynnikach wzmocnienia powierzchniowego, to właśnie różnorodne zastosowania tej metody w analityce chemicznej i biochemicznej (sensory SERS jonów, detekcja biomolekuł) oraz w badaniach o charakterze biomedycznym (diagnostyka raka, oznaczanie stężenia różnych jonów w komórkach, badania wirusów i mikroorganizmów). Tematyka pracy doktorskiej mgr Aleksandry Jaworskiej jest zatem bardzo aktualna i w perspektywie, przy dobrze przemyślanym programie badań, w ścisłej współpracy z przedstawicielami nauk medycznych, może doprowadzić do uzyskania szeregu wartościowych informacji biomedycznych na poziomie komórkowym.

Praca doktorska mgr Aleksandry Jaworskiej składa się z dwóch części. Część pierwsza poświęcona jest klasycznym badaniom SERS oddziaływania nikotynamidu i jego kilku pochodnych, a także monopodstawionego kationu N-metylopirydyniowego z nanocząstkami srebra, stanowiącymi podłoże wzmacniające rozproszenie ramanowskie. Część druga dotyczy już badań obiektów biologicznych takich jak makrofagi (1 publikacja) oraz komórki śródbłonna (3 publikacje). Powstaje pytanie: co merytorycznie łączy te dwa bloki prac? Jak wynika ze streszczenia pracy i wstępu do publikacji pewne analogi nikotynamidu chronią komórki śródbłonna przed uszkodzeniami powodowanymi np. przez tlenek azotu. Ponadto 1-metylnikotynamid wykazuje działanie przeciwzapalne i przeciwzkrzepowe. I to jak rozumiem zmotywowało doktorantkę do zajęcia się pochodnymi nikotynamidu.

Wyniki pierwszej części pracy doktorskiej opublikowano w 3 pracach. Badania opisane w tych publikacjach mają podobny schemat: pomiary widm SERS molekuł adsorbowanych na Ag z roztworów o różnych pH, obliczenia widm metodą DFT (częstości drgań normalnych oraz intensywności pasm w widmach IR i Ramana), wsparte obliczeniami rozkładu energii potencjalnej (PED), a na koniec analiza widm prowadząca do określenia orientacji molekuly względem powierzchni metalu i sposobu oddziaływania z nanocząstkami srebra. Chciałabym w tym miejscu zasygnalizować pewne zastrzeżenia do tego sposobu interpretacji widm SERS (często zresztą stosowanego). Wynikają one z faktu, że widmo teoretyczne obliczane jest jak piszą autorzy publikacji, w fazie stałej, natomiast eksperyment SERS prowadzony jest dla molekuł oddziałujących z metalem. Wprawdzie zmiany widm na skutek adsorpcji badanych związków na powierzchni Ag nie są bardzo duże więc można założyć, że tzw. oddziaływania chemiczne z metalem nie są zbyt silne, jednak wydaje mi się, że obliczenia przeprowadzone przynajmniej dla kilku wybranych związków oddziałujących ze srebrem (pojedyncze atomy, lub klastry kilkuatomowe) poprawiłyby wnioskowanie o orientacji molekuł na powierzchni metalu i sposobie ich oddziaływania z metalem. Tego rodzaju obliczenia są na świecie coraz częściej

prorowadzone w celu poprawnej interpretacji widm SERS. Szkoda, że doktorantka nie odniosła się do tego problemu w części wstępnej, opisującej wyniki przedstawione w publikacjach. Druga ogólna uwaga odnosi się do możliwości przenoszenia wniosków wynikających z określenia na podstawie eksperymentów SERS sposobu oddziaływania z powierzchnią metalicznej nanocząstki na oddziaływania molekuł leków z receptorami. Taka sugestia pojawia się nie tylko w części wstępnej pracy doktorskiej lecz także w oryginalnych publikacjach. O wątpliwościach jakie w związku z tym mogą się nasuwać doktorantka wprawdzie pisze krótko na stronie 13, w rozdziale 2.3 poświęconym omówieniu zastosowań spektroskopii SERS w układach biologicznych. To umyka jednak przy późniejszej lekturze. Szkoda, że doktorantka nie nawiązała do tych problemów, których niewątpliwie jest świadoma, w rozdziale zawierającym podsumowanie wyników dla pochodnych nikotynamidu. Stałoby się wtedy jasne na ile wnioski o oddziaływaniach z powierzchnią wyprowadzone na podstawie przeprowadzonych eksperymentów SERS można wykorzystać w zagadnieniach biomedycznych. Kolejny problem dotyczy sposobu wnioskowania o orientacji molekuł względem powierzchni na podstawie widm SERS. Zabrakło moim zdaniem opisu rozumowania, które prowadzić może do poprawnego wnioskowania na temat orientacji molekuł na powierzchni metalu, przedstawienia istotnych założeń przyjmowanych w tym rozumowaniu, wraz z krytyczną ich oceną. Umożliwiłoby to zrozumienie czytelnikom mniej zorientowanym w spektroskopii SERS, sposobu wyciągania najważniejszych wniosków pojawiających się w publikacjach. Do tej części pracy doktorskiej mam także kilka uwag i pytań bardziej szczegółowych (podaję w kolejności pojawiania się w tekście pracy):

1. str. 17 – pasma 1390 i 850 cm^{-1} (na widmach są nieco inne częstości) pochodzą nie od grup COOH jak pisze autorka, lecz od grup COO^- (drgania symetryczne rozciągające i zginające COO^-). Nie jest ponadto jasne dlaczego ich pojawienie się w widmie powierzchniowym sugeruje płaską orientację grup karboksylowych?
2. zastanawiające jest, że przy interpretacji widm SERS pochodnych nikotynamidu (str 17-19) nie pojawia się nigdzie wątpliwość co do przypisania pasm ok. 1640 cm^{-1} . Pasma to przypisywane jest (publikacje 1 i 2) drganiom pierścienia (mod 8b w notacji Wilsona) lub/i antysymetrycznemu drganiu rozciągającemu grupy NO_2 . Badane związki zawierają jednak także ugrupowanie amidowe (CONH). Gdzie zatem leży tzw. I pasmo amidowe ?
3. str. 19 – zdanie „Lack of C-H stretching...“ jest nieprawdziwe. Pasma 2960 cm^{-1} jest w widmie SERS silne. Domyślam się, że chodziło o pasmo drgań rozciągających C-H pierścieni aromatycznych (powyżej 3000 cm^{-1}). Zwracam jednak uwagę, że w widmie

Ramana roztworu także tego pasma nie widać. Przyczyną tego jest pewnie ogromne, strome tło obserwowane przy wzbudzaniu linią 1064 nm. Szkoda, że nie zastosowano innego wzbudzenia (np. 532 nm). Dziwi mnie także przypisanie pasm 2960 cm^{-1} (widmo SERS) i 2977 cm^{-1} (widmo roztworu) antysymetrycznemu drganiu rozciągającemu grup alkilowych (publikacja 2). W widmie Ramana silniejsze są raczej pasma pochodzące od drgań symetrycznych niż antysymetrycznych.

4. Z rys 3 i 4 w części wstępnej wynika, że widma były rejestrowane przy różnych liniach wzbudzających (532 nm – nikorandil; 1064 nm – 1-metylonikorandil). Z publikacji 2 można jednak wywnioskować, że w obu przypadkach rejestrowano widma na linii 532 nm. Jeśli poprawnie zrozumiałam intencje autorów publikacji chodziło o uniknięcie wzbudzania widma w obrębie pasma CT, pojawiającego się w widmie UV/Vis tylko w przypadku nikorandilu.

Z pewnością te wszystkie znaki zapytania i wątpliwości uda się doktorantce wyjaśnić w trakcie obrony pracy doktorskiej.

W podsumowaniu oceny tej części pracy uważam, że stanowi ona odrębną całość i dostarcza szeregu wartościowych informacji o oddziaływaniu pochodnych nikotynamidu z nanocząstkami srebra, przedstawia modele tych oddziaływań, pozostawiając jednak otwartym pytanie o możliwość przeniesienia tych informacji na oddziaływania leków o strukturze zbliżonej do badanych związków z receptorami.

Druga część pracy dotyczy zupełnie innych obiektów i mieści się w bardzo, jak wspomniałam, aktualnym i ambitnym nurcie badań wewnątrzkomórkowych metodą spektroskopii SERS. Wiedząc z iloma trudnościami trzeba się było z pewnością zmierzyć, zanim udało się uzyskać satysfakcjonujące wyniki, z wielką satysfakcją odnotowałam pierwsze sukcesy w tej dziedzinie osiągnięte przez zespół prof. Małgorzaty Barańskiej.

Badania prowadzone przez doktorantkę w tej części pracy zostały opisane w 4 publikacjach i obejmują różnorodne obiekty biologiczne i różne zagadnienia. Trzy z nich poświęcone są ciekawym eksperymentom SERS w żywych komórkach śródbłonna, a jedna obrazowaniu SERS makrofagów. Ta ostatnia praca ma charakter rozpoznawczy. Doktorantka wprowadzała nanocząstki złota, których powierzchnia została zmodyfikowana molekułami barwników takich jak rodamina 6G, rodamina B, czy zieleń malachitowa, do wnętrza makrofagów. Barwniki te są bardzo popularne w spektroskopii SERS, ze względu na silne widmo i w związku z tym powszechnie stosowane jako molekuły tzw. reportera ramanowskiego. Okazało się, że barwniki rodaminowe wewnątrz makrofagów częściowo desorbują się z powierzchni, powodując

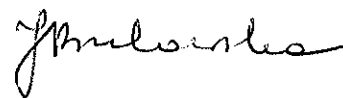
adsorbowanie się różnych biomolekuł (białek DNA, lipidów) na nanocząstkach Au. Inaczej jest w przypadku zieleni malachitowej. Te wstępne eksperymenty przede wszystkim udowodniły, że nanocząstki Au o średnich rozmiarach około 40 nm łatwo przenikają przez ściany komórki, a ponadto wskazały, że do następnych eksperymentów, prowadzonych na komórkach śródbłonna, należy wybrać rodaminę 6G jako molekułę reportera. Trzy następne publikacje dotyczą komórek śródbłonna i są próbą odpowiedzi na następujące pytania:

1. jakie są optymalne warunki prowadzenia procesu wychwytu nanocząstek Au pokrytych rodaminą 6G, tak aby nie spowodować śmierci komórki, a zarazem osiągnąć optymalne stężenie nanocząstek Au dające dobrze mierzalny sygnał SERS? Wykazano, że optymalny czas akumulacji Au to 2-4 godzin, przy zachowaniu stężenia nanocząstek ok. 10^{-12} M a rodaminy na poziomie 10^{-6} M.
2. czy wewnątrz komórki zachodzą procesy desorpcji molekuł reportera i adsorpcji biomolekuł na powierzchni Au? Wykazano, że metodą SERS można śledzić dynamikę wymiany molekuł na powierzchni nanocząstek.
3. jak zewnątrzkomórkowe pH wpływa na rozkład pH wewnątrz komórek śródbłonna?
4. jaka jest przepuszczalność błon komórkowych w stanie zapalnym wydukowanym przez TNF α (tumor necrosis factor alpha) dla nanocząstek Au?

Na dwa ostatnie pytania odpowiadano stosując inną molekułę reportera – kwas 4-merkaptobenzoesowy. Pomiar wewnątrzkomórkowego pH z użyciem tej molekuły prowadzono już wcześniej w kilku laboratoriach na świecie, jednak dla innego typu komórek. W stosunku do tej części pracy nasuwają mi się dwa komentarze. Po pierwsze, sugerowano już wcześniej w literaturze, że oddziaływania molekuł reportera z białkami mogą fałszować pomiar wewnątrzkomórkowego pH. Stosuje się wtedy „osłone” nanocząstek przez pokrycie bardzo cienką warstwą SiO₂. Szkoda, że doktorantka nie odniosła się do tego problemu. Druga uwaga dotyczy faktu, że czujnik Au/4-MBA pracuje dobrze w zakresie pH 4.5 – 7.5. Powyżej i poniżej tych wartości mamy plateau, tymczasem na rys. 3 w publikacji 7 mamy mapy pH obejmujące wartości 8.5; 9.1; 9.8. Jak udało się określić te wartości? Mimo tych uwag wydaje mi się, że opisywana seria eksperymentów dotyczących komórek śródbłonna wskazuje na znaczny potencjał spektroskopii SERS w dziedzinie obserwacji złożonych procesów wewnątrzkomórkowych. To co do tej pory udało się uzyskać doktorantce zasługuje z pewnością na uznanie. To są przecież pierwsze tego typu eksperymenty ramanowskie w Polsce.

Na koniec chciałabym odnieść się do formalnej strony pracy. Praca doktorska napisana jest po angielsku i składa się z dosyć krótkiego omówienia wyników (około 25 stron), poprzedzonych określeniem celu badań i krótkim omówieniem literatury. Cytowanych jest niewiele prac (38 odsyłaczy) z dziedziny objętej doktoratem, bo inne odnośniki są zawarte w publikacjach. Trzon pracy doktorskiej stanowią zatem odbitki publikacji. Ponieważ publikacje są wiele autorskie to dołączone są także oświadczenia współautorów. Na ich podstawie można uznać, że wkład mgr Aleksandry Jaworskiej był znaczący, szczególnie w zakresie eksperymentalnym. Ta formuła pracy jest dla mnie nowa i przyznam, że wydaje mi się bardziej właściwa dla rozprawy habilitacyjnej. Jest ona jednak całkowicie zgodna ze znowelizowaną ustawą o stopniach i tytułach naukowych. Zatem w pełni ją akceptuję, a moja wypowiedź jest jedynie głosem w dyskusji o nowej formule doktoratu.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca zawiera szereg elementów nowości naukowej, a przeprowadzone badania, szczególnie te dotyczące zaadaptowania metody powierzchniowo wzmocnionego rozproszenia ramanowskiego do badania żywych komórek śródbłonna, stwarzają perspektywy dalszych, ciekawych prac w powiązaniu z problematyką diagnostyki medycznej. Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia bardzo trudnych eksperymentów i świetnie opanowała warsztat naukowy konieczny do ich prowadzenia. Ma bardzo duży dorobek naukowy, obejmujący 7 publikacji związanych z doktoratem i 4 poza tematyką pracy doktorskiej. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że recenzowana praca całkowicie spełnia warunki ustawy o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65) znowelizowanej 18 marca 2011 (Dz. U. 2011 nr 84 poz. 455). W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Jaworskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jolanta Bukowska

Warszawa 17.03.2015