

STRESZCZENIE

Przedmiotem niniejszej pracy jest opracowanie nowych czujników optycznych wykrywających jony, ze szczególnym uwzględnieniem czujników wykorzystujących nanostruktury metaliczne. W kręgu zainteresowań znalazły się kationy metali oraz aniony soli nieorganicznych jako cząsteczki chemiczne powszechnie występujące w środowisku w różnych rolach: od podstawowych elektrolitów w organizmach (kationy sodu, potasu, aniony chlorkowe), przez dodatki do żywności (azotany, węglany), po niepożądane zanieczyszczenia (kationy metali ciężkich, siarczany, fosforany). Ich detekcja jest istotna z punktu widzenia m.in. kontroli jakości produktów spożywczych, badania próbek środowiskowych, monitoringu odpadów przemysłowych, a także w szybkiej diagnostyce schorzeń.

W związku z obecnością jonów w tak wielu obszarach, duży nacisk kładzie się na rozwój różnego typu czujników. Obok dobrze znanych czujników elektrochemicznych, rosnącą popularnością cieszą się czujniki optyczne. Informacje o parametrach środowiska przenoszone są w nich przez wiązkę światła. Badana substancja powoduje zmiany w oddziaływaniu światła z reporterem – cząsteczką wrażliwą na obecność analitu. Spektroskopia fluorescencyjna, absorpcyjna w zakresie UV-Vis, spektroskopia oscylacyjna – to główne optyczne techniki detekcji. W świecie postępującej miniaturyzacji nie jest niespodzianką, że coraz częściej dochodzi do połączenia metod analitycznych z nanotechnologią, co owocuje powstaniem nanoczujników. Tendencja ta stymuluje rozwój nanosensorów wykorzystujących efekt powierzchniowo wzmocnionego rozproszenia ramanowskiego (ang. *surface enhanced Raman scattering* – SERS). W spektroskopii SERS, słabe z natury nieelastyczne rozproszenie światła – rozproszenie Ramana – ulega wzmocnieniu dzięki lokalnemu wzmocnieniu pola elektromagnetycznego przy powierzchni nanostruktur metalicznych. Umieszczenie w tym obszarze cząsteczki, np. poprzez adsorpcję, skutkuje zwiększeniem intensywności jej widma ramanowskiego aż do poziomu obserwacji pojedynczych molekuł (tzw. *single molecule SERS*). Nanometryczne rozmiary takich czujników umożliwiają bezpośrednie dotarcie do nieosiągalnych do tej pory próbek, takich jak wnętrza komórki oraz jej poszczególne kompartmenty. Co więcej, zasięg wzmocnienia powierzchniowego w zjawisku SERS – ograniczający się do najbliższego otoczenia plazmonowej nanocząstki – daje nadzieję na przełamanie limitu dyfrakcyjnego i osiągnięcie rozdzielczości uwarunkowanej jedynie wielkością czujnika. Wszystkie te cechy, jak również optyczny charakter pracy, a zatem

bezwzględne przekazywanie informacji o badanym środowisku, czynią nanoczuJNIKI SERS szczególnie przydatnymi w zastosowaniach biologicznych. O ile jednak znanych jest już wiele układów opartych na spektroskopii SERS czułych na różnorakie parametry biologiczne (takie jak pH czy potencjał redoks), efektywne oznaczanie tą metodą jonów w stężeniach występujących w komórkach wciąż stanowi wyzwanie. Mimo że zagadnienie to jest pozornie zbadane – znamy wszak równowagowe stężenia jonów nieorganicznych w komórkach – rozkład ich stężenia wewnątrz komórki, mechanizmy ich transportu oraz akumulacji w organellach są w dalszym ciągu obiektem badań. Opracowanie sensorów tego typu przyczyni się do rozwoju metod analitycznych i stworzy nowe możliwości w zakresie detekcji jonów, a co za tym idzie, zaburzeń ich gospodarki w organizmie i schorzeń nimi wywołanych.

Należy podkreślić, że detekcja kationów metali przy pomocy spektroskopii oscylacyjnej musi odbywać się w sposób pośredni. Jony te, jako jednoatomowe indywidua chemiczne, nie posiadają żadnych modów drgań, są więc niewidoczne dla spektroskopii Ramana lub spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni. Obserwuje się natomiast wpływ jonu na widmo cząsteczki reportera. Zmiany te dotyczą całkowitej intensywności widma, względnej intensywności pasm bądź położenia wybranych pasm. Opisany w pracy nanoczuJNIK na kationy działa w oparciu o widmo SERS anionu 2-merkaptoetanosulfonowego (MES) zaadsorbowanego na nanocząstkach srebra (Ag-MES). Pasmami markerowymi, czyli tymi, które służą do oznaczenia analitu, są dwie składowe przypisane drganiom symetrycznym rozciągającym grup sulfonowych. Pasma o niższej energii odpowiada drganiom grup SO_3^- otoczonych cząsteczkami rozpuszczalnika (**pasmo 1**), zaś druga składowa pochodzi od pasma drgań grup sulfonowych tworzących kontaktową parę jonową z kationem (**pasmo 2**). Położenie pasma 2 zależy od rodzaju oddziaływującego jonu – pozwala zatem rozpoznać kation – a jego intensywność względem pasma 1 wyznacza stężenie jonu. Położenie pasma 2 dla kationów bez silnej otoczki hydratacyjnej zależy od energii ich wiązania elektrostatycznego z grupą sulfonową, zatem od powierzchniowej gęstości ładunku jonu. Opracowany nanosensor jest czuły na zmiany stężeń wszystkich badanych kationów (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}), a dodatkowo rozróżnia cztery pierwsze z wymienionych kationów metali alkalicznych oraz metali ziem alkalicznych. Najniższy limit detekcji nanoczuJNIK wykazuje dla jonów wapnia: 10^{-8} M. Ponadto możliwe jest przy jego użyciu współoznaczanie jonów magnezu i wapnia.

Test cytotoxycywności czujnika Ag-MES przeprowadzony na dwu liniach komórkowych: HeLa oraz CHO.K1 dowodzi, że w stężeniach poniżej 10 $\mu\text{g/ml}$ jest on nietoksyczny dla komórek inkubowanych w medium komórkowym z nanosensorem przez 24 i 48 godzin. Na

komórkach, które wchłonęły nanocząstki Ag-MES, można przeprowadzić mapowanie SERS, tj. rejestrowanie widm SERS z ustalonej siatki punktów na próbce. Na podstawie zebranych widm wyznacza się rozkład wewnątrzkomórkowego stężenie jonów, w tym przypadku potasu. Stężenia K^+ występujące w środku komórki przewyższają te w rejonach bliskich błonie komórkowej. Taki rozkład wynika z równowagi jonowej między wnętrzem i otoczeniem komórki oraz dynamiki zmian stężenia jonów wewnątrz komórek. Czujniki są wchłaniane przez komórkę na drodze endocytozy: umieszczane są wraz z medium w pęcherzykach zawieszonych w cytoplazmie – endosomach. Początkowo są zatem wystawione na kationy potasu w stężeniu charakterystycznym dla medium ($[K^+]_{\text{medium}} = 5 \text{ mM}$). Endosomy te przebywają w pobliżu błony komórkowej. W miarę upływu czasu dochodzi do dyfuzji endosomów we wnętrzu komórki, w trakcie której na drodze wymiany jonowej stężenie jonów w endosomach sięga wartości identycznych z tymi w cytoplazmie ($[K^+]_{\text{intracellular}} = 150 \text{ mM}$). Ten prosty eksperyment wykazuje, że opracowany nanoczujnik Ag-MES znajduje zastosowanie jako wewnątrzkomórkowy czujnik na kationy.

W pracy ujęte są także badania nad nanoczujnikami Ag-MES pokrytymi otoczką z krzemionki (Ag-MES@SiO₂). Taka warstwa stanowi barierę ochronną tak dla komórki – chroni biomolekuły przed dezaktywacją na powierzchni srebra oraz ogranicza dyfuzję jonów srebra do cytoplazmy – jak i dla czujnika: ogranicza adsorpcję cząsteczek na nanocząstkach metalu, co mogłoby zaburzyć sygnał rejestrowany od czujnika. Nanocząstki Ag-MES skutecznie pokryte 30-nanometrową otoczką SiO₂ wykazują aktywność w spektroskopii SERS. Zachowują także czułość na kationy. Gorszy limit detekcji jest rekompensowany podwyższeniem czułości: zmiana stężenia jonu o jeden rząd wielkości wiąże się z większą zmianą sygnału czujnika. Różnice między odpowiedziami analitycznymi czujników Ag-MES i Ag-MES@SiO₂ wywołane są różnym stopniem penetracji jonów przez warstwę krzemionki. Stężenie jonów docierających do metalowego rdzenia, gdzie następuje ich detekcja, jest mniejsze niż stężenie na zewnątrz otoczki w roztworze i jest tym większe, im łatwiej danym jonom pokonać barierę SiO₂. Zdolność penetracji SiO₂ zależy więc od wielkości jonu, jego energii solwatacji oraz czasu.

Przedstawiam także badania nad wytworzeniem wysokowydajnych biokompatybilnych nanopodłoży SERS – nanogwiazdek złota pokrytych srebrem w otocze z mezoporowatej krzemionki oraz magnetycznych nanocząstek janusowych: złota nanogwiazdka-nanocząstka Fe₃O₄ pokrytych srebrem. Złoto w porównaniu do srebra charakteryzuje się mniejszą toksycznością dla układów biologicznych. Niestety, nanostruktury złota wzmacniają

rozproszenie ramanowskie w mniejszym stopniu niż nanocząstki srebra. Stąd też stosuję rozwiązanie polegające na pokryciu złotych nanogwiazdek cienką warstwą srebra, która nie zmienia znacząco toksyczności syntezowanych nanocząstek, a wpływa pozytywnie na wzmocnienie widma SERS.

Kolejnym problemem podjętym w pracy jest opracowanie sensora anionów wykorzystującego widma oscylacyjne SERS i IR. Jako receptor anionów stosuję pochodne 1,8-diamido-3,6-dichlorokarbazolu – związku, który od lat z powodzeniem jest przedmiotem badań grupy dr. Michała Chmielewskiego. Trzy atomy azotu we wnętrzu cząsteczki karbazolu są zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych z anionami. Uprzednio wykazane zdolności kompleksowania anionów siarczanowych (VI) w roztworze są zestawiane z przeprowadzonymi przeze mnie badaniami nad receptorami karbazolowymi osadzonymi na metalicznym podłożu. Adsorpcja na powierzchni srebra i złota odbywa się dzięki funkcjonalizacji cząsteczki 1,8-diamido-3,6-dichlorokarbazolu poprzez wiązanie amidowe resztami kwasu liponowego zawierającego mostek disiarczkowy. Obecność atomów siarki pozwala na wytworzenie wiązania kowalencyjnego siarka-metal (Ag lub Au). Pochodne ujęte w projekcie różnią się modyfikacją przez drugie wiązanie amidowe: grupą t-butyłową, fenyłową lub ponownie – resztą kwasu liponowego. Badania z wykorzystaniem spektroskopii SERS oraz absorpcyjnej spektroskopii zewnętrznego odbicia w podczerwieni z modulacją polaryzacji (ang. polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy, PM-IRRAS) dowodzą, że receptory karbazolowe po adsorpcji na powierzchni zachowują zdolność wiązania jonów SO_4^{2-} z roztworów acetonitrylowych. Ponadto, obserwuje się różnice w powinowactwie badanych pochodnych względem anionów, które rośnie w kolejności: pochodna fenyłowa < pochodna z resztą kwasu liponowego < pochodna t-butyłowa.

Przedstawione badania prezentują możliwości zastosowania technik opartych na spektroskopii oscylacyjnej w zakresie detekcji jonów nieorganicznych. Optyczna droga przekazywania informacji decyduje o ich znikomej inwazyjności, a sprzężenie z nanostrukturami otwiera perspektywę dotarcia do wnętrza komórek i przyjrzenia się procesom tam zachodzącym z czułością sięgającą pojedynczych molekuł.

Rozprawa napisana jest w języku angielskim. Wyniki zostały opublikowane w dwóch czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: *Sensors and Actuators B: Chemical* oraz *Journal of Physical Chemistry C*, a także w rozdziale w książce *Optical Spectroscopy and Computational Methods In Biology and Medicine*, wyd. Springer Netherlands. Kolejna oryginalna publikacja jest w zaawansowanej fazie przygotowań.