



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Kraków, 12 listopada 2024 r.

Dr hab. Jolanta Kochana, prof. UJ  
Zakład Chemii Analitycznej  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków  
tel. 12 686 24 18  
email: jolanta.kochana@uj.edu.pl

Wydział Chemii

Recenzja  
pracy doktorskiej **mgr Macieja Dzwonka**  
z tytułu  
**„Wpływ rozmiaru i sposobu modyfikacji powierzchni nanocząstek  
i klasterów złota na ich właściwości fizykochemiczne”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska powstała w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrood Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Więckowskiej, prof. ucz.

Recenzowana praca dotyczy istotnych zagadnień związanych z nanotechnologią, interdyscyplinarną nauką, która w ostatnich dziesięcioleciach bardzo prędko się rozwija, wkraczając w różne dziedziny naszego życia. Obejmuje ona projektowanie i badanie materii na poziomie nanometrycznym. Szerokie możliwości zmiany właściwości nanomateriałów, poprzez projektowanie i syntezę nanostruktur o pożądanej wielkości i kształcie, niemożliwe w przypadku materiałów konwencjonalnych o standardowych rozmiarach, stwarzają perspektywy zrewolucjonizowania wielu aspektów naszego funkcjonowania. Zdobyte nanotechnologii znajdują zastosowanie w elektronice, energetyce i ochronie środowiska, rolnictwie i przemyśle spożywczym, inżynierii materiałowej oraz w obszarze medycyny, w szczególności w zakresie diagnostyki, dostarczania leków, inżynierii tkankowej czy diagnostyki obrazowej.

Jednymi z ważnych nanomateriałów, znajdujących szerokie zastosowanie są nanostruktury metali i tlenków metali, charakteryzujące się wyjątkowymi właściwościami elektrycznymi, chemicznymi, optycznymi oraz magnetycznymi, a szczególną rolę odgrywają nanostruktury złota. Nanocząstki złota (AuNPs – gold nanoparticles), w zależności od kształtu i rozmiaru, mogą istotnie różnić się właściwościami, co jest kluczowe biorąc pod uwagę ich potencjalne zastosowanie. Wysoka wartość stosunku powierzchni do objętości tych nanomateriałów wpływa na ich reaktywność chemiczną i katalityczną, a stosunkowo łatwa modyfikacja ich

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



powierzchni umożliwia dostosowanie ich funkcji do konkretnych aplikacji. Ze względu na biokompatybilność i niską toksyczność są idealnymi nanostrukturami do zastosowań biomedycznych. Doskonałe przewodnictwo elektryczne pozwala na wykorzystanie ich w tworzeniu nowych typów materiałów przewodzących, dzięki zjawisku rezonansu plazmonów powierzchniowych, które wykazują, mogą znaleźć zastosowanie w obrazowaniu tkanek oraz w konstrukcji sensorów optycznych, a wyjątkowe właściwości katalityczne, których nie obserwuje się w złocie w skali makroskopowej, pozwalają na wykorzystanie AuNPs jako katalizatory reakcji redoksowych, przykładowo w konstrukcji ogniw paliwowych. Szczególną grupą AuNPs są klasterki złota, czyli bardzo małe agregaty atomów złota, o rozmiarach mniejszych niż 2 nanometry, zbudowane zazwyczaj z kilku do kilkudziesięciu atomów. Możliwość syntezy nanoklasterów złota o dokładnie określonej liczbie atomów, pozwala na precyzyjne projektowanie ich właściwości. W odróżnieniu od nanocząstek, w nanoklasterach pojawia się dyskretna struktura pasm energetycznych, w rezultacie takie agregaty atomów Au wykazują właściwości pośrednie między atomami a nanocząstkami, a więc przykładowo nie wykazują rezonansu plazmowego, mogą natomiast wykazywać fluorescencję. Dzięki dużej liczbie atomów na powierzchni i małej liczbie atomów wewnętrznych, nanoklasterki złota są wysoce reaktywne, a możliwość dokładnego kontrolowania liczby atomów w klasterze pozwala na regulowanie ich aktywności katalitycznej. Analogicznie jak AuNPs, nanoklasterki są biokompatybilne, ulegają również funkcjonalizacji, co pozwala na precyzyjną kontrolę ich stabilności oraz reaktywności. Obie nanostruktury złota, nanocząstki i klasterki, są pożądanymi składnikami układów bioelektrokatalitycznych, wykorzystujących enzymy, są więc przydatne w konstrukcji bioczuJNIKÓW i enzymatycznych ogniw paliwowych. Mgr Maciej Dzwonek w swojej rozprawie doktorskiej podjął badania nad sposobami syntezy nanocząstek i nanoklasterów złota, których celem była weryfikacja właściwości fizykochemicznych badanych nanostruktur, pod kątem ich potencjalnego zastosowania, w zależności od ich rozmiaru i sposobu modyfikacji powierzchni. W związku z powyższym tematykę podjętą przez Doktoranta uważam za bardzo aktualną oraz istotną, z poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia.

Recenzowana praca, rozpoczynająca się streszczeniem w języku polskim i angielskim, składa się z sześciu głównych części: wprowadzenia, celu pracy, opisu osiągnięcia, podsumowania i wniosków, bibliografii oraz załączników, czyli tekstów publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej. Całość obejmuje 197 stron, z czego 138 stron zajmują teksty publikacji wraz z suplementami. We wprowadzeniu Autor zawarł zagadnienia dotyczące nanostruktur złota, będących przedmiotem jego badań: scharakteryzował budowę nanocząstek i nanoklasterów złota, opisał właściwości fizykochemiczne tych nanostruktur, metody ich syntezy oraz przedstawił możliwości zastosowania nanocząstek i klasterów złota występujących w roztworze

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



oraz po unieruchomieniu ich na powierzchni. Następnie Autor zwięźle przedstawił cel pracy, a w kolejnym rozdziale zawarł opis osiągnięcia, w tym spis publikacji obejmujących osiągnięcie wraz z uzasadnieniem zebrania manuskryptów w cykl, oraz omówił najważniejsze wyniki przeprowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej badań. Tę część pracy zamyka podsumowanie i wnioski, poprzedzające spis cytowanej literatury obejmujący 89 pozycji.

Podstawą rozprawy doktorskiej jest spójny cykl prac obejmujący 7 oryginalnych publikacji naukowych oraz jedną pracę przeglądową. Artykuły zostały opublikowane w latach 2016-2022 w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie czasopism JCR, w szczególności dwie prace ukazały się w *Biosensors and Bioelectronics* ( $IF_{2023} = 10.7$ ), po jednej w czasopismach *Sensors and Actuators B: Chemical* ( $IF_{2023} = 8.0$ ), *RSC Advances* ( $IF_{2023} = 3.9$ ), *ChemCatChem* ( $IF_{2023} = 3.8$ ), *Current Opinion in Electrochemistry* ( $IF_{2023} = 7.9$ ), *Nanomaterials* ( $IF_{2023} = 4.4$ ) oraz w *ChemElectroChem* ( $IF_{2023} = 3.5$ ).

Głównym celem dysertacji było zaprojektowanie nanocząstek i nanoklasterów złota pod kątem konkretnego zastosowania, synteza zaprojektowanych nanostruktur i ich charakterystyka fizykochemiczna, a następnie zbadanie ich zachowania w różnych układach biochemicznych. Charakterystyka fizykochemiczna była przeprowadzana z wykorzystaniem szerokiego wachlarza technik takich jak transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), dynamiczne rozpraszania światła (DLS), spektroskopia UV/Vis, analiza grawimetryczna, różne techniki elektrochemiczne, w tym m.in. elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS),

Pierwszą z zaprojektowanych i zsyntetyzowanych nanostruktur złota były nanocząstki modyfikowane powierzchniowo heksanotiolem oraz heksanotiolem i tiolową pochodną antrachinonu (AQ), które były wykorzystane jako składnik matrycy immobilizującej enzym - lakazę. Dobór grup funkcjonalizujących powierzchnię AuNPs był podyktowany dopasowaniem do hydrofobowej kieszeni występującej w strukturze enzymu. Podczas badań oceniono, że wykorzystane nanostruktury pozytywnie wpłynęły na proces adsorpcji enzymu oraz jego katalityczne właściwości, między innymi potencjał redukcji tlenu.

Nanocząstki złota stabilizowane elektrostatycznie cytrynianami i nanocząstki modyfikowane glutationem zostały wykorzystane w konstrukcji bioogniwa paliwowego, bazującego na dwóch enzymach: dehydrogenazie fruktozy i lakazie. Materiał elektrodowy, podlegający modyfikacji, stanowił retikulowany węgiel szklisty, który po modyfikacji wykazywał bardziej rozwiniętą powierzchnię i wyższą wydajność katalityczną, równocześnie zmniejszając nadpotencjał reakcji redoksowych przy stosunkowo długich czasach pracy bioogniwa.



W celu zbadania kinetyki i mechanizmu przenoszenia elektronów w układach bioelektrokatalitycznych w zależności od rozmiaru wykorzystanych nanostruktur, syntetyzowano nanocząstki modyfikowane 1-heksanotiolem o rozmiarach od 1,0 do 3,5 nm. Otrzymanie nanostruktur złota o zróżnicowanych rozmiarach było możliwe na drodze zmiany warunków syntezy, w szczególności poprzez zmianę stężenia tioli w mieszaninie reakcyjnej. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem elektrod z dehydrogenazą fruktozy, wytworzonych za pomocą warstw ditiolowych i nanocząstek o różnych rozmiarach, wykazały iż wraz ze zmniejszaniem się rozmiarów AuNPs szybkość przenoszenia elektronów zwiększała się. Było to szczególnie widoczne dla najmniejszych struktur, klasterów o rozmiarach 1,0 i 1,5 nm. Zmienił się również mechanizm przenoszenia elektronów w układzie; dla większych AuNPs (2,0-3,5 nm) obserwowano bezpośrednie przeniesienie elektronu z centrum aktywnego enzymu na powierzchnię elektrody (DET), natomiast w przypadku klasterów odnotowano mechanizm z udziałem mediatora (MET), którego rolę odgrywały klasterzy złota.

Do konstrukcji bioogniwa paliwowego z kaskadowym układem enzymów: dehydrogenazy fruktozy, inwertazy i mutarotazy, unieruchomionych na anodzie i lakazą immobilizowaną na katodzie, zsyntetyzowano nanocząstki złota modyfikowane 1-heksanotiolem oraz pochodną naftochinonu. Nanocząstki unieruchomiono na kompozycie celulozowo-polipirolowym, stanowiącym materiał elektrodowy, za pomocą warstw ditiolowych. Przeprowadzone badania elektrochemiczne wykazały, że AuNPs funkcjonalizowane pochodną naftochinonu odgrywały rolę jednostek orientujących dla enzymów, ponadto ich zastosowanie wpłynęło na polepszenie efektywności procesu przenoszenia elektronów. Zsyntetyzowane nanocząstki złota modyfikowane 1-heksanotiolem oraz pochodną naftochinonu wykorzystano również z powodzeniem w konstrukcji superkondensatora działającego w układzie kaskadowym enzymów przekształcających sacharozę.

Kolejnym wyzwaniem, którego podjął się Doktorant, było stworzenie matrycy dla nośnika leku – doksorubicyny. Wymagało to zaprojektowania i syntezy nanostruktur złota modyfikowanych cząsteczką adresującą – kwasem foliowym. Na tym etapie pracy zostały zsyntetyzowane nanocząstki złota funkcjonalizowane kwasem liponowym, modyfikowane mieszaniną dwóch ligandów: kwasem liponowym i zsyntetyzowaną pochodną kwasu foliowego, kwasem liponowym i pochodną doksorubicyny, oraz mieszaniną trzech ligandów: kwasem liponowym, pochodną kwasu foliowego i pochodną doksorubicyny. Dalsze badania wykazały, że zaproponowane nanostruktury złota pozwoliły na przenoszenie leku na modyfikowanej powierzchni nanocząstek, a wytworzone wiązania kowalencyjne umożliwiły kontrolę zawartości leku w nośniku.



Klasterzy złota stabilizowane 1-butanotiolem,  $[Au_{25}(SC_4)_{18}]^0$ , zostały zsyntetyzowane, a następnie wykorzystane do wytworzenia hybrydowych monowarstw lipidowych, o rozmiarze około 1 nm, domieszkowanych klasterami o różnym stężeniu. Optymalne warunki syntezy oraz złożony proces oczyszczania klasterów doprowadziły do otrzymania nanocząstek o określonej liczbie atomów, wykazujących właściwości redoksove. Wytworzone hybrydowe monowarstwy lipidowe zostały użyte do skonstruowania elektrody z immobilizowaną lakazą. Badania wykazały, iż obecność klasterów, zlokalizowanych pomiędzy łańcuchami lipidu DOPC, w niewysokich stężeniach skutkuje wytworzeniem sieci nanoelektrod, działających jako całość, z których każda uczestniczy i wnosi swój wkład do sumarycznego procesu redukcji tlenu zachodzącego na elektrodzie. Modyfikując stężenie klasterów, które odgrywają rolę mediatora, można wpływać na efektywność procesu przenoszenia elektronów w hybrydowej monowarstwie lipidowej.

W dołączonym do cyklu publikacji artykule przeglądowym dokonano krytycznej oceny stanu wiedzy na temat wpływu obecności nanocząstek złota, a przede wszystkim ich rozmiaru na termodynamikę i kinetykę procesów bioelektrokatalitycznych. Przedyskutowano najnowsze prace, skupiając się na klasterach złota, ponieważ wpływają one na efektywność transferu elektronu, mogą również zmienić mechanizm procesu przeniesienia elektronu w układzie elektroda-centrum aktywne enzymu.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej rozprawy doktorskiej zaliczam:

- wykazanie, iż synteza nanocząstek złota o konkretnym rozmiarze, a co za tym idzie o pożądanym właściwościach, jest możliwa na drodze dobrania odpowiednich warunków syntezy;

- dowiedzenie, iż kinetyka i mechanizm przenoszenia elektronów w układach bioelektrokatalitycznych zależy od rozmiaru wykorzystanych nanostruktur;

- wykazanie, iż w konstrukcji biocujników i bioogniw paliwowych wykorzystanie nanocząstek złota modyfikowanych grupami wykazującymi powinowactwo do wybranych struktur enzymu zwiększa elektroaktywną powierzchnię elektrody i ilość zaadsorbowanych biomolekuł, usprawnia efektywność transportu elektronów pomiędzy centrum aktywnym enzymu a elektrodą i poprawia wydajność katalityczną układu;

- potwierdzenie możliwości wykorzystania nanostruktur złota jako nośników leków w terapii celowanej poprzez funkcjonalizację AuNPs jednym lub kilkoma odpowiednio dobranymi związkami, pozwalając równocześnie na lepszą kontrolę zawartości leku w nośniku;

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl





- wykorzystanie klasterów złota, wbudowanych w monowarstwy lipidowe, do weryfikacji efektywności przenoszenia elektronu przez warstwę oraz do modyfikowania jej właściwości redoksoowych w zależności od zawartości klasterów.

W przypadku rozprawy doktorskiej opartej na cyklu prac, opublikowanych w recenzowanych czasopismach, rola recenzenta jest w zasadzie ograniczona. Opublikowane manuskrypty zostały już zaopiniowane i przeanalizowane przez wybitnych specjalistów z danej dziedziny, a ewentualne niedociągnięcia wskazane Autorom i przez nich skorygowane. Oryginalność rozwiązania problemu naukowego, w kontekście ukazania się prac w recenzowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, nie może budzić wątpliwości. Recenzentowi pozostaje stwierdzenie, jaki był udział Autora w badaniach, ponieważ wszystkie prace zgłoszone do rozprawy są wieloautorskie, mają od dwóch do dziewięciu autorów. Doktorant był pierwszym autorem w jednej publikacji, sześciokrotnie drugim autorem oraz jednokrotnie trzecim, przy czym pięciokrotnie pierwszym autorem był pan Michał Kizling, a Doktorant drugim. Zgodnie z oświadczeniem Pani Promotor nie udało się skontaktować z Panem Kizlingiem, dlatego nie ma informacji o jego udziale w powstaniu prac, nie ma również oświadczeń pozostałych współautorów na temat ich udziałów w badaniach, będących podstawą manuskryptów. Mgr Maciej Dzwonek zawarł informacje o własnym udziale w badaniach w rozdziale III.1. Szczegółowa lektura tekstu wskazuje na istotny udział Doktoranta w przeprowadzone badania, w zakresie obejmującym jego zagadnienia badawcze, a więc dotyczące projektowania, syntezy i charakterystyki nanostruktur złota, wytworzonych do konkretnych zastosowań.

Po przeczytaniu rozprawy nasunęło mi się kilka pytań, głównie dyskusyjnych. Najważniejsze z nich zamieszczam poniżej i proszę mgr Macieja Dzwonka o ustosunkowanie się do nich podczas obrony pracy.

- Czy w oparciu o przeprowadzone badania można wyciągnąć wnioski odnośnie możliwości zaprojektowania nośnika opartego na nanostrukturze złota dla dowolnego enzymu, wykorzystywanego w konstrukcji bioelektrod, oraz dla dowolnego leku w terapii celowanej?
- Czy nanostruktury złota byłyby pomocne w działaniu elektrochemicznych biocujników wykorzystujących inne elementy biologiczne, np. przeciwciała czy łańcuchy kwasów nukleinowych?
- Jak ocenia Pan zieloność przeprowadzonych syntez nanostruktur złota?

Z merytorycznego punktu widzenia przedstawioną do recenzji rozprawę oceniam bardzo pozytywnie. Praca jest napisana stosunkowo przejrzysto, treść została zobrazowana tabelami i rysunkami, podsumowanie trafnie uwypukla wszystkie najważniejsze etapy i wyniki badań. Szkoda, że Autor nie odniósł się do najnowszej literatury dotyczącej badanej tematyki, na 89 pozycji literaturowych

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



jedna została opublikowana w 2020 r., jedna w 2022 r., pozostałe pozycje bibliografii są starsze. A przecież poruszana tematyka jest bardzo aktualna i rokrocznie pojawia się wiele doniesień odnoszących się do poruszanych zagadnień.

W rozprawie można znaleźć nieliczne błędy redakcyjne, literówki i niefortunne sformułowania. W mojej opinii zabrakło wyjaśnienia stosowanych symboli, cytowania literatury nie zostały uporządkowane (przykładowo na stronie 13 cytowania 5, 6 i 82). Wspomniane niedoskonałości nie rzutują na pozytywny odbiór rozprawy.

W pracy widać dobrą znajomość tematyki badawczej oraz duże zaangażowanie Doktoranta w prowadzone badania. Znaczne zróżnicowanie stosowanych technik pomiarowych pozwala wnioskować o szerokiej wiedzy z zakresu technik badawczych i świadczy o dobrym przygotowaniu Doktoranta do dalszej pracy badawczej. Należy podkreślić, iż średnia wartość współczynnika oddziaływania zgłoszonych do doktoratu publikacji wynosi 6,6 (wyliczone w oparciu o wartości współczynnika oddziaływania z 2023 r.), co jest wartością ponadprzeciętną, jeżeli chodzi o dorobek publikacyjny zgłaszany jako podstawa rozprawy doktorskiej. Niestety, do recenzenta nie trafiły informacje na temat innych aktywności naukowych Doktoranta, takich jak udział w realizacji projektów badawczych, udział w konferencjach czy współautorstwo publikacji niezwiązanych tematycznie z rozprawą doktorską.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż przedstawiona praca doktorska całkowicie spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 2018 r., z późniejszymi zmianami, i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Macieja Dzwonka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.