Załącznik nr 1: Autoreferat

AUTOREFERAT

Dr Artur Bednarkiewicz

Artur Bednarkiewicz

Zakład Spektroskopii Stanów Wzbudzonych
Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych
Polskiej Akademii Nauk w Wrocławiu

Wrocław, 12 grudnia 2012 r.

Spis treści

1 Dane podstawowe 3

1a Dane personalne 3

1b Podsumowanie dorobku naukowe (na dzień 12.12.2012 r.) 3

1c Wykształcenie i stopnie naukowe 4

1d Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowo-badawczych 4

1e Tematyka pracy naukowej 4

2 Osiągnięcie stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego 5

2a Lista publikacji uwzględniona w opisie osiągnięcia 5

2b Omówienie celu naukowego cyklu prac i osiągniętych wyników 6

Właściwości spektroskopowe nanokrystalicznych $NaGdF_4$ i Eu^{3+}: $NaGdF_4$ 8

Laserowo indukowane wygrzewanie w ultra małych nanoluminoforach $NaYF_4$:Yb/Er 9

Nanowymiarowe sondy luminescencyjne jako Donory w czujnikach typu FRET 13

Nanotermometria i nanogrzanie 19

Plazmoniczne wzmocnienie sprawności konwersji energii górę 25

Podsumowanie 26

3 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych 27

3a Realizowane projekty badawcze 27

3b Lista wizyt badawczych: 27

3c Nagrody i wyróżnienia 27

3d Recenzje, organizacja konferencji 28

3e Patenty 28

3f Dorobek publikacyjny 28

3g Najważniejsze wystąpienia konferencyjne 29

3h Działalność popularyzatorska i dydaktyczna 29

3i Inne 30

4 Przebieg pracy naukowej 31

4a Okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora 31

4b Spis publikacji przed obroną doktoratu 31

4c Praca naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora 33

4d Współpraca naukowa 35

Niniejszy autoreferat przygotowano zgodnie z §3 i §4 rozporządzenia MNiSW z dnia 1.09.2011 „w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego" (Dziennik Ustaw Nr 196, Poz 1165) w obszarze nauk ścisłych zgodnie.

1 Dane podstawowe

1a Dane personalne

Imię i Nazwisko: Artur Bednarkiewicz, dr
Miejsce pracy: Zakład Spektroskopii Stanów Wzbudzonych
Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych
Polska Akademia Nauk
ul. Okólna 2, 50-422 Wrocław, Poland
tel. : (0048) 71 39 54 166
e-mail : A.Bednarkiewicz@int.pan.wroc.pl
web-page : http://ses.int.pan.wroc.pl

Stanowisko : adiunkt

1b Podsumowanie dorobku naukowe (na dzień 12.12.2012 r.)

Całkowita liczba publikacji	58 + 4 + 6 = 68*
Przed doktoratem	
Wszystkich	20
Z listy FI	13
Po doktoracie	
Wszystkich	48
Z listy FI	42
Do habilitacji	12
Sumaryczny IF na podstawie WoK	
Prace do habilitacji	45.5
Wszystkie po doktoracie	111.8

Całkowita liczba cytowań w bazie Web of Knowldge	
Wszystkie	398
Bez autocytowań	367
Index Hirscha	12

*58 publikacji na podstawie bazy Web Of Knowledge (WoK), Thomson Reuters; 4 najnowsze publikacje nie są jeszcze widoczne w bazie; pozostałe artykuły [11, 31, 32, 34, 35, 39] z załącznika 2, nie są notowane w bazie Web Of Knowledge.

1c Wykształcenie i stopnie naukowe

dr nauk fizycznych	2003 r., Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN ***Właściwości spektroskopowe i laserowe jonów iterbu w matrycach krystalicznych i szklanych*** Promotor: **Prof. dr hab. Wiesław Stręk**
mgr inż. fizyki technicznej	1999 r., Politechnika Wrocławska, realizacja w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN Specjalność: fizyka techniczna ***Generacja drugiej harmonicznej lasera neodymowego pompowanego diodą laserową*** Promotor **dr inż. Przemysław Dereń**

1d Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowo-badawczych

2011-2014	Kierownik zadania badawczego NAOMIS Departament Nanotechnologii Wrocławskie Centrum Badań EIT+, Wrocław, Polska
2009-	Adiunkt, Zakład Spektroskopii Stanów Wzbudzonych, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polska Akademia Nauk, Wrocław, Polska
2005-2008	pozycja post-doc, European Commission - Joint Research Centre, Nanomaterials and Molecular Imaging, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy
2003-2005	Adiunkt, Zakład Spektroskopii Stanów Wzbudzonych, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polska Akademia Nauk, Wrocław, Polska

1e Tematyka pracy naukowej

- Właściwości spektroskopowe nano- i mono-kryształów oraz szkieł domieszkowanych jonami lantanowców, wykorzystanie tych nanoluminoforów w biologii i medycynie (Nano-termometria, Nano-termoterapia, sondy luminescencyjne, wykorzystanie zjawiska konwersji energii w górę w czujnikach bazujących na transferze energii typu FRET)
- Lasery na ciele stałym pompowane diodą półprzewodnikową (konstrukcja i badanie właściwości)
- Bio-spektroskopia, diagnostyka fluorescencyjna (wykorzystanie auto-fluorescencji endogennych chromoforów tkankowych np. NADH/FAD)
- Oddziaływanie światła z materią żywą i wykorzystanie światła laserowego w biologii i medycynie
- Obrazowanie widm luminescencji (HSI), obrazowanie czasów życia (FLIM), analiza globalna HSI/FLIM (konstrukcja układów obrazowania, oprogramowanie, analiza globalna, analiza obrazów)

2 Osiągnięcie stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) jest jednotematyczny cykl publikacji naukowych pt. ***Właściwości luminescencyjne nanowymiarowych luminoforów fluorkowych domieszkowanych jonami lantanowców.***

2a Lista publikacji uwzględniona w opisie osiągnięcia

H1. **A. Bednarkiewicz**, M. Maczka, W. Strek, J. Hanuza i M. Karbowiak, *Size dependence on infrared spectra of $NaGdF_4$ nanocrystals*, Chemical Physics Letters, **418**:75-78 (2006), AB: 40%, MM:20%, WS:20%, JH:10%, MK:10%; [IF =1.628, 2005]

H2. **A. Bednarkiewicz**, A. Mech, M. Karbowiak i W. Stręk, *Spectral properties of Eu^{3+} doped $NaGdF_4$ nanocrystals*, J.Luminescence, **114**(3-4):247-254 (2005), AB: 50%, AM:20%, MK:20%, WS:10%; [IF =2.169, 2008]

H3. **A. Bednarkiewicz**, D. Wawrzynczyk, A. Gagor, M. Nyk, L. Kepinski, M. Kurnatowska, L. Krajczyk, W. Strek i M. Samoc, *Giant enhancement of upconversion in ultra-small Er^{3+}/Yb^{3+}:$NaYF_4$ nanoparticles via laser annealing*, Nanotechnology **23** 145705 (2012) AB: 45%, DW:20%, AG:10%, MN:5%, LK+MK+LK:10%, WS:5%, MS:5%, [IF=3.979, 2012]

H4. **A. Bednarkiewicz**, D. Wawrzynczyk, M. Nyk i M. Samoć, *Tuning red-green-white up-conversion color in nano $NaYF_4$:Er/Yb phosphor*, Journal Rare Earth **29**(12), 1152–1156 (2011) AB: 50%, DW:30%, MN:10%, MS:10%; [IF =0.901, 2011]

H5. **A. Bednarkiewicz**, M. Nyk, M. Samoc i W. Strek, *Up-conversion FRET from Er^{3+}/Yb^{3+}:$NaYF_4$ nanophosphor to CdSe quantum dots* J. Phys. Chem. C **114**, 17535–17541 (2010) AB: 40%, MN:40%, MS:10%, WS:10%; [IF =4.805, 2010]

H6. D. Wawrzynczyk, **A. Bednarkiewicz**, M. Nyk, J. Cichos, M. Karbowiak, D. Hreniak, W. Strek, i M. Samoc, *Optimisation of Ligand Exchange Towards Stable Water Suspensions of Crystalline $NaYF_4$: Er^{3+}, Yb^{3+} Nanoluminophors*, J. Nanoscience Nanotechnology **12**, 1886-1891 (2012) DW:50%, AB:25%, MN:5%, JC+MK:5%, DH:5%, WS:5%, MS:5%; [IF=1.563, 2012]

H7. D. Wawrzynczyk, M. Nyk, **A. Bednarkiewicz**, W. Strek i M. Samoc, *A comparison of morphology, structure and optical properties of ultrasmall, small and core-shell up-converting $NaYF_4$/$NaGdF_4$ nanocrystals co-doped with Tm^{3+} and Yb^{3+} ions*, J.Luminescence **133**, 138-144 (2013) DW:30%, MN:30%, AB:30%, WS:5%, MS:5%; [IF =2.102, 2011]

H8. **A. Bednarkiewicz,** D. Wawrzyńczyk, M. Nyk i W. Stręk *Synthesis and spectral properties of colloidal Nd^{3+} doped $NaYF_4$ nanocrystals*, Optical Materials, **33**(10), Pages 1481-1486 (2011) AB:40%, DW:40%, MN:10%, WS:10%; [IF=2.023, 2011]

H9. **A. Bednarkiewicz**, D. Wawrzyńczyk, M. Nyk i W. Strek, *Optically stimulated heating with nano-colloidal solution of luminescent Nd^{3+}:$NaYF_4$*, Applied Physics B **130**, 4, (2011) 847-852 AB: 40%, DW:40%, MN:10%, WS:10%; [IF=2.189, 2011]

H10. D. Wawrzynczyk, **A. Bednarkiewicz**, M. Nyk, W. Stręk i M. Samoć *Neodymium (III) doped fluoride nanoparticles as a non-contact optical temperature sensor* Nanoscale **4**, 6959 (2012) DW:40 %, **AB**: 40%, MN:20%, WS:10%, MS:10%; [IF= 5.914, 2012]

H11. D. Wawrzynczyk, **A. Bednarkiewicz**, M. Nyk, M. Gordel, W. Strek i M. Samoc, *Modulation of Up-conversion Luminescence of Lanthanide (III) Ion Co-doped NaYF4 Nanoparticles using Gold Nanorods*, Optical Materials **34**, 1708-1712 (2012) DW:40%, **AB**: 20%, MN:15%, MG:5%, WS:10%, MW:10%; [IF=2.023, 2012]

H12. A. Gnach i **A. Bednarkiewicz**, *Lanthanide doped Up-converting Nanoparticles: merits and challenges* , NanoToday **7**(6), 532–563 (2012) AG: 35%, **AB**: 65%; [IF =15.355, 2012]

Na końcu każdej publikacji podano szacowany przez habilitanta udział każdego ze współautorów w planowaniu, przygotowaniu, wykonaniu i interpretacji badań oraz przygotowania publikacji. Podano również IF dla danego czasopisma dla roku wydania, albo z roku najbliższego daty publikacji w którym znany jest IF. Oświadczenia współautorów o udziale w planowaniu, przygotowaniu badań, interpretacji i wkładzie w przygotowanie w/w publikacji zamieszczono w oddzielnych załącznikach.

2b Omówienie celu naukowego cyklu prac i osiągniętych wyników

Ostatnie osiągnięcia, rozwój i integracja nanotechnologii i biofotoniki doprowadziły do powstania wyrafinowanych luminescencyjnych nano-platform (NP) takich jak kropki kwantowe (QD - Quantum Dots), nanocząsteczki srebra, nanocząsteczki krzemionkowe domieszkowane barwnikami organicznymi, jak również nanokrystality domieszkowane lantanowcami. Te ostatnie wymagają znacznie większej uwagi, gdyż właściwości jakie oferują (tj. wąskie linie emisyjne, długie czasy życia luminescencji) są istotne z punktu widzenia konstrukcji luminescencyjnych znaczników w biologii i diagnostyce medycznej. Dodatkowo nanoluminofory te wykazują bardzo wysoką stabilność fotochemiczną, są nietoksyczne, pozwalają uzyskać wiele różnych kodów barwnych do detekcji wielo-parametrycznej oraz pozwalają na łatwe wyeliminowanie sygnału tła (tj. fluorescencji endogennych związków organicznych), a tym samym uproszczenie konstrukcji układów detekcji i obrazowania w biologii i medycynie.

Mimo, że właściwości spektroskopowe lantanowców, w tym konwersja energii w górę (ang. up-conversion) są badane od kilkudziesięciu lat pod kątem zastosowań w konstrukcji laserów, źródeł światła i konwersji energii świetlnej, domieszkowane lantanowcami nanokrystaliczne odpowiedniki znanych mono- i mikro-kryształów charakteryzują się bardzo często odmiennymi właściwościami spektroskopowymi i mniejszą sprawnością kwantową emisji. Wymaga to dalszych badań i optymalizacji wielu czynników, w tym składu, morfologii i architektury tych luminescencyjnych nanomateriałów, tak by poprawić wydajność luminescencji oraz poprawić czułość bioczujników opartych na tych materiałach.

Właściwości luminescencyjne przejść 4f-4f lantanowców w matrycach krystalicznych istotnie zależą od lokalnej siły pola krystalograficznego, struktury krystalograficznej (widma fononowego matrycy) oraz obecności i typu domieszek. Jednak w bardzo małych nanokrystalitach, tj. gdy rozmiary

matryc osiągają 5-10 nm średnicy, jony lantanowców są wyeksponowane na lokalne chemiczne środowisko znacznie bardziej niż w matrycy monokrystalicznej. Prowadzi to do zmian w długościach wiązań atomowych i liczby koordynacyjnej, a wpływ pola krystalograficznego i samej matrycy ustępuje pod względem znaczenia wpływowi otoczenia nanokrystalitów. Objawia się to zmianą właściwości luminescencyjnych, tj. widm luminescencji i czasów zaniku luminescencji w porównaniu do mono-krystalicznych odpowiedników. Zwykle, czasy życia luminescencji lantanowców w nanokryształach ulegają skróceniu, gdyż zwiększa się wygaszanie niepromieniste w związku z obecnymi defektami i pojawieniem się centrów wygaszania (np. drgań O-H ~3300cm^{-1} cząsteczek wody). Z drugiej strony, dla określonych przejść (np. $^5D_0 \rightarrow Eu^{3+}$) w matrycach nanokrystalicznych obserwowano znaczne wydłużenie czasów życia lumienescencji. Istnieje kilka sposobów wytłumaczenia tego zjawiska, np. zwiększenie lokalnej symetrii lantanowca w nanokrystalitach, zredukowanie nieparzystych komponentów pola krystalicznego, czy też fakt, że procesy radiacyjne zależą od współczynnika załamania otoczenia. Dla bardzo małych nanokrystalitów jon aktywny „doświadcza" bowiem tzw. efektywnego współczynnika załamania (n_{eff}), będącego liniową kombinacją współczynników załamania matrycy oraz rozpuszczalnika (np. powietrza, wody itp.). Rozpatrując wpływ rozmiaru nanokrystalitów na właściwości luminescencyjne lantanowców, nie wolno zapominać o nieradiacyjnych procesach transferu energii. Transfer energii (np. relaksacja krzyżowa – ang. cross-relaxation, konwersja w górę – ang. up-conversion), szczególnie z asystą fononów, stanowią ważny mechanizm obsadzania wyższych poziomów energetycznych oraz istotnie wpływają na dynamikę luminescencji i populację wyżej leżących poziomów energetycznych, tak ważnych przy zjawisku konwersji energii w górę. Wiadomo jednak, że ograniczenie rozmiaru matrycy powoduje modyfikację gęstości i częstotliwości drgań fononowych. W rezultacie, modyfikacji ulegają oddziaływania elektron-fonon, redukcji ulega transportu ciepła a wzmocnieniu termalizacji wyższych stanów Starkowskich co przyczynia się do zmiany warunków rezonansu energetycznego i skutkuje zmianami właściwości optycznych w tych nanowymiarowych materiałach.

Podsumowując, wszystkie te obserwowane anomalie i nowe zjawiska fizyczne będące wynikiem zredukowanych rozmiarów matryc domieszkowanych jonami lantanowców można wytłumaczyć:

(i) brakiem niskoenergetycznych fononów i niską gęstością pasm fononowych, które to prowadzą do istotnych zmian widm luminescencyjnych i zmian dynamiki transferu energii między jonami współdomieszek,
(ii) zwiększeniem lokalnej symetrii kationów w małych klastrach,
(iii) niejednorodną dystrybucją jonów Ln^{3+} w nanokrystalitach,
(iv) zmianie rozszczepienia i obsadzenia poziomów Starkowskich wynikającym ze zredukowanej siły pola krystalicznego w nanowymiarowych ziarnach,
(v) tzw. gorącą emisją, tj. emisją z poziomów energetycznych populowanych w wyniku termicznego obsadzania poziomów Starkowskich oraz metastabilnych.

Celem prowadzonym przeze mnie badań podstawowych była chęć lepszego zrozumienia zjawisk emisji Stokesowskiej i anty-Stokesowskiej, które zachodzą w nanokrystalicznych luminoforach fluorkowych Na(Y,Gd)F_4 współ-domieszkowanych jonami lantanowców. Zjawiska te były badane również pod kątem możliwości zastosowania tych materiałów jako znaczników luminescencyjnych w biologii i medycynie, m.in. jako sondy w czujnikach bazujących na mechanizmie bezpromienistego transferu energii FRET, czy też w nano-termoterapii i nano-termometrii. Wybór matrycy $NaYF_4$ oraz stosowanych metod syntezy był podyktowany możliwością precyzyjnego kontrolowania rozmiaru tych nanokrystalitów w zakresie 7-60 nm, niską energią fononów (~350cm^{-1}) w fluorkach Na(Y/Gd)F_4, relatywnie wysoką sprawnością kwantową

konwersji energii w górę (0.1%), a także możliwością uzyskania wysoce jednorodnych rozmiarowo zawiesin nanokoloidalnych. Ponadto, interesujący był również dla mnie fakt, że badane materiały pozwalają w wyniku wymiany ligandów uzyskać stabilne i jednorodne zawiesiny koloidalne w środowisku wodnym, co jest przepustką do praktycznych zastosowań tych nanoluminoforów w biologii. Prowadzone przeze mnie prace miały również na celu badanie i optymalizację właściwości spektroskopowych nanoluminoforów $Na(Y/Gd)F_4$ domieszkowanych i współ-domieszkowanych jonami lantanowców.

Właściwości spektroskopowe nanokrystalicznych $NaGdF_4$ i Eu^{3+}: $NaGdF_4$

W pracy [**H1**] badano widma podczerwieni niedomieszkowanych krystalitów $NaGdF_4$ w funkcji ich rozmiaru. Materiał wyjściowy uzyskany metodą współ-strącania wygrzewano w temperaturach od 300 do 780 °C w atmosferze Ar+(10%)SF_6, co pozwoliło na kontrolowaną zmianę rozmiaru w zakresie od 17 do 60 nm. Średnie rozmiary nanokrystalitów wyznaczono na podstawie równania Sherrera. Dla temperatury wygrzewania 300°C uzyskano ziarna wielkości 17 nm, natomiast największe ziarna ~60 nm wymagały grzania do 750°C. Ponieważ w zastosowanych warunkach $NaGdF_4$ krystalizuje w fazie haksagonalnej (P-6=C13h) w widmach IR obserwowano mody aktywne A'' i E'. Spośród wszystkich drgań widocznych w widmach IR porównano intensywności integralne pasm niskoenergetycznych przy 116 cm^{-1} (drgania translacyjne E' jonów Gd^{3+} i Na^{+}) oraz 168 cm^{-1} (drgania rozciągające i zginające Gd-F i (Gd,Na)-F). Intensywność tych pasm spadała (Fig.1) proporcjonalnie do odwrotności rozmiaru krystalitów.

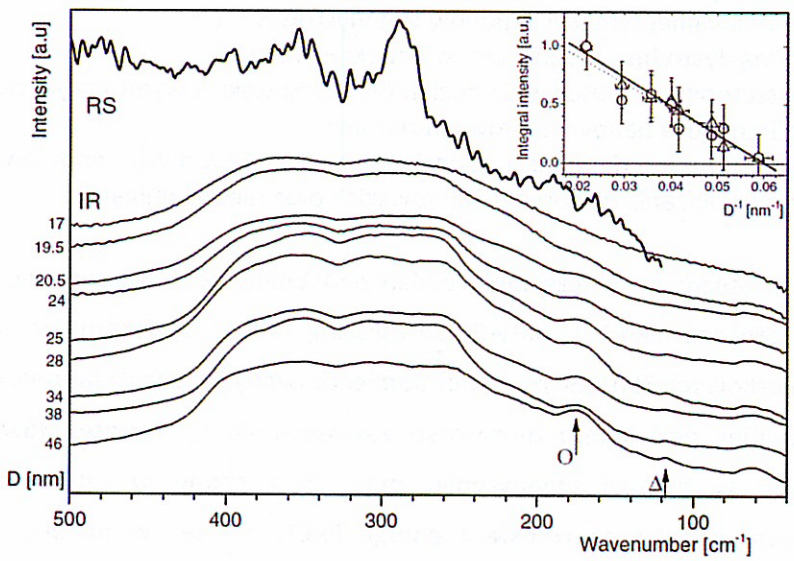

Fig.1. *Zależność widm IR nanokrystalicznych proszków $NaGdF_4$ w funkcji rozmiaru nanokrystalitów. Dla największych krystalitów przedstawiono dla porównana widma Ramanowskie. Mały wykres przedstawia zależność intensywności integralnej pasma przy 168 cm^{-1} (kółka) i 116 cm^{-1} (trójkąty) w funkcji odwrotności średnicy nanokrystalitów* ***(Rysunek 1 z pracy H1)***.

Bazując na modelu Tamury oszacowano, że dla małych cząsteczek sferycznych, intensywność współczynnika absorpcji fononowej powinna rzeczywiście zależeć odwrotnie proporcjonalnie od średnicy nanokrystalitów. Ma to brzemienne skutki dla właściwości luminescencyjnych nanoluminoforów, a szczególnie dla procesów konwersji energii w górę, które wymagają zwykle asysty fononów. Redukcja intensywności drgań fononowych może być wyjaśnieniem wielu zjawisk anomalnej termalizacji w nanoluminoforach, a także pomogła zrozumieć przyczyny laserowo indukowanego wygrzewania obserwowanego w ultra małych nanokrystalitach [**H3**].

W pracy [**H2**] przebadano w funkcji rozmiaru, właściwości nanokrystalitów domieszkowanych sondą luminescencyjną tj. jonami Eu^{3+}. Podobnie jak w pracy [**H1**] wielkość krystalitów regulowano temperaturą wygrzewania, uzyskując ziarna o średnim rozmiarze równym ~14 nm, ~35 nm i ~60 nm odpowiednio dla temperatur 330 °C, 680 °C, 750 °C. Porównywanie bezwzględnej intensywności luminescencji są zwykle obarczone dużym błędem (o ile nie stosuje się sfery integracyjnej) w przypadku pomiaru widm luminescencji proszków. Dlatego do analizy wpływu rozmiaru krystalitów na właściwości luminescencyjne badanych nanomateriałów wykorzystano analizę widm luminescencji jonów europu oraz metodę Kodairy, będącą uproszczoną formą teorii Judda-Ofelta. Bazując na przejściu $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ stwierdzono, że jon lantanowca wbudowuje się w dwie pozycje krystalograficzne oraz zidentyfikowano, którym lokalnym symetriom one odpowiadają. Zaobserwowano również termiczną kontrakcję nanokrystalitów, które w pomiarach w 77K wykazywały pasma emisji przesunięte w stronę wyższych energii. Ponieważ przejście $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ ma charakter magnetyczny i generalnie słabo zależy od wpływu pola krystalicznego, jego intensywność przyjęto jako stałą. Wówczas normalizowanie intensywności $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ / $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ oraz $^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ / $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ pozwoliły oszacować wartości parametrów Ω_2 i Ω_4 oraz współczynniki prędkości procesów (A). Uzyskane rezultaty pozwoliły zrozumieć zachowanie się matrycy fluorkowej w funkcji rozmiaru nanokrystalitów. Właściwości spektroskopowe, tj. widma luminescencji i czasy zaniku luminescencji w Eu^{3+}:$NaGdF_4$ wykazywały znaczne różnice w nanomateriałach w porównaniu do większych odpowiedników, a standardowa teoria Judda-Ofelta może wymagać rozszerzenia by w pełni uwzględniała również zachowanie lantanowców w nanomateriałach.

Laserowo indukowane wygrzewanie w ultra małych nanoluminoforach $NaYF_4$:Yb/Er

Istnieje wiele technik zapisu optycznego informacji, które bazują na modyfikacji materiału wiązką laserową. Zwykle stosowane są do tego celu lasery femtosekundowe, które charakteryzują się emisją olbrzymiej energii w bardzo krótkim impulsie. Pod wpływem wiązki laserowej następuje na przykład krystalizacja substratów materiałów nieliniowych optycznie, jednak ze względu na stosowane ultrakrótkie impulsy i mały przekrój czynny na absorpcję tych związków, obecnie stosowane metody wykazują bardzo wysoki próg krystalizacji i wymagają równoczesnego jednorodnego grzania całego materiału. W pracy [**H3**] badano zachowanie ultra małych (~8 nm) nanokrystalitów domieszkowanych jonami Yb^{3+} i Er^{3+} pod wpływem skupionego światła laserowego. Laserowe wygrzewanie (ang. Laser Induced Annealing - LIA) uzyskano dla gęstości mocy pobudzenia 15.5 kW/cm^2 (350 mW) w plamkach o średnicy 54 μm uzyskanych za pomocą obiektywu mikroskopowego 10x. Zjawiska tego nie obserwowano w przypadku krystalitów o wielkości ponad 20 nm. Pomiary właściwości spektroskopowych materiałów po LIA wykazywało dramatycznie inne właściwości spektroskopowe w porównaniu do materiału oryginalnego, m.in. prawie 1000 krotnie niższy próg i 100-1000 krotnie większą intensywność konwersji w górę, a także odmienne widma luminescencji i czasy życia poziomów wzbudzonych. Po przeprowadzeniu serii pomiarów, tj.:

(i) rozdzielczych temperaturowo pomiarów XRD,

(ii) pomiarów właściwości spektroskopowych materiałów jednorodnie wygrzewanych w piecu,

(iii) zdjęć TEM i SEM,

i głębszej analizie zaproponowano mechanizm laserowo indukowanego wygrzewania w materiałach domieszkowanych lantanowcami. Praca ta została opublikowana **[H3+Supporting information]** i prezentowana na konferencji IWASOM 2011.

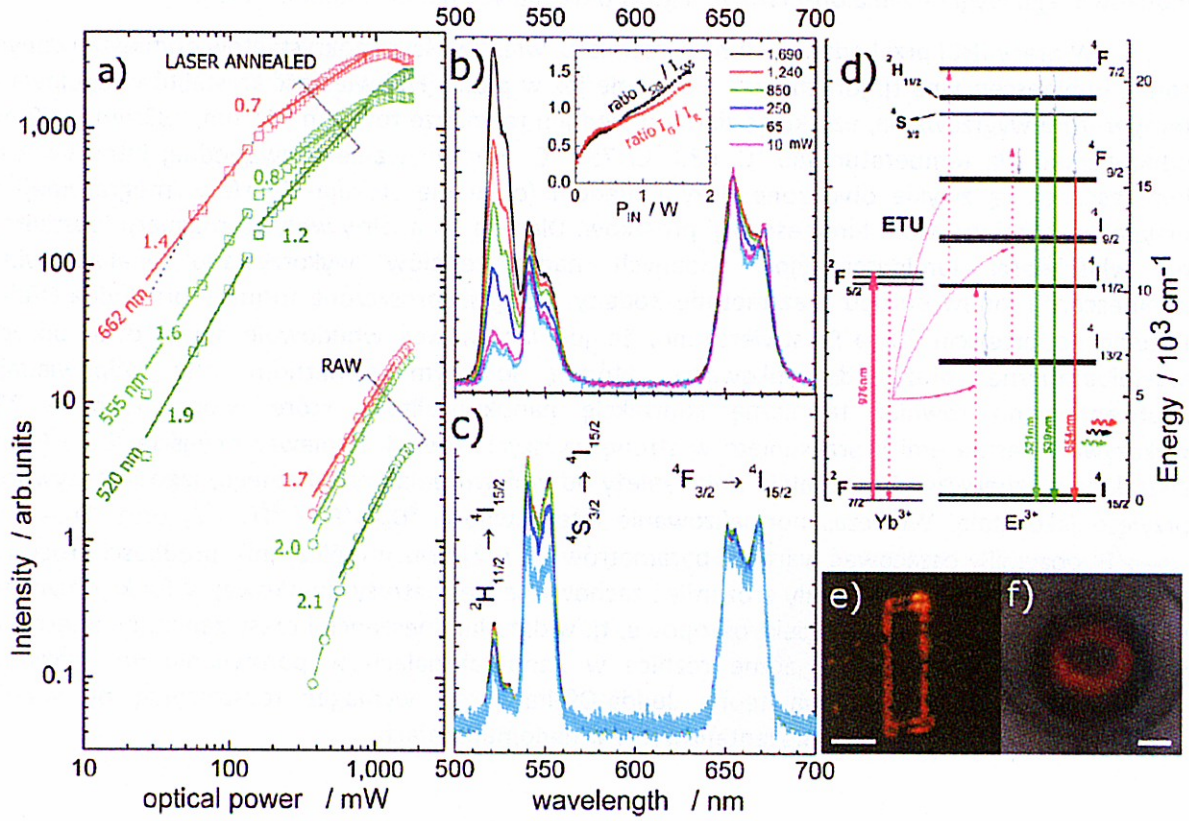

Fig. 2. *Porównanie właściwości spektroskopowych ultramałych nanokrystalitów $NaYF_4$:2% Er^{3+}, 20% Yb^{3+} przed i po laserowo indukowanym wygrzewaniu (a) Zależność intensywności emisji anty-Stokesowskiej w funkcji mocy pobudzenia, dla przejść $^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, $^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ i $^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$; widma luminescencji w funkcji mocy pobudzenia dla materiału oryginalnego (c - RAW) i po wygrzewaniu laserowym (b – laser annealing); schemat poziomów energetycznych i wyjaśnienie mechanizmu emisji anty-Stokesowskiej w jonach Yb^{3+} i Er^{3+} (d); obraz luminescencji wzoru (e) i pojedynczy punktu (f) uzyskanego w wyniku LIA. Skale na zdjęciach e) i f) wynoszą odpowiednio 2 mm i 20 μm* ***(Rysunk 1 z pracy [H3]).***

Materiał poddany działaniu LIA wykazywał bardzo duże zmiany zarówno w intensywności (Fig.2a), strukturze widm luminescencji jak i w relacji emisji zielonej do czerwonej (widma Fig.2b i c oraz wstawka do Fig.2b). Szczególnie istotne zmiany odnotowano dla przejścia $^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, natomiast przejście $^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ podlegało mniejszym fluktuacjom. Zmiany te przypisano do termicznej populacji poziomu $^2H_{11/2}$ względem poziomu metastabilnego $^4S_{3/2}$. Istotnej zmianie uległy również rzędy procesów N (Fig.2a) – dla przejść $^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, $^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ i $^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ parametr N malał odpowiednio z 2.1, 2.0 i 1.7 na 1.9, 1.6 i 1.4, co świadczy o zredukowaniu strat niepromienistych w procesie dodawania fotonów (APTE – fr.addition de photon par transferts d'energie). Dodatkowo bezwzględna intensywność emisji anty-Stokesowskiej wzrosła o 2-4 rzędy wielkości, a próg konwersji energii w górę zmalał o 2 rzędy wielkości po obróbce LIA w porównaniu do materiału wyjściowego (Fig.2a).

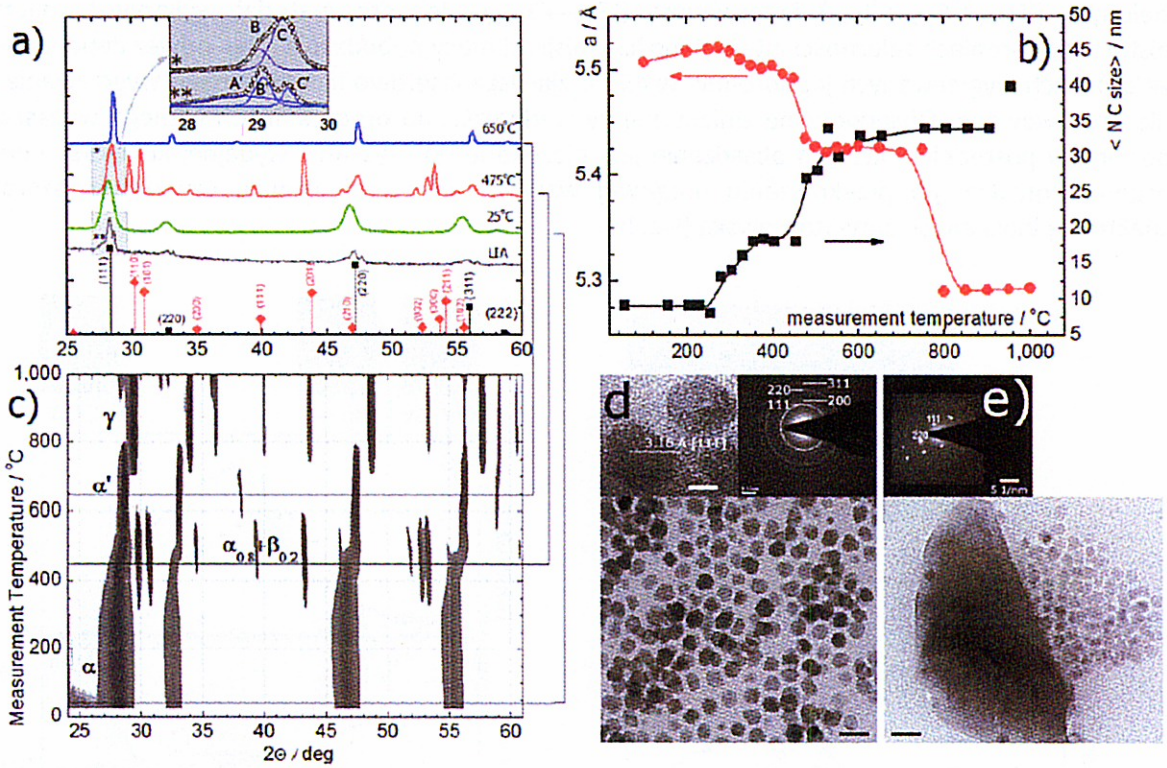

Fig.3. *Zależne temperaturowo pomiary strukturalne (a) porównanie XRD dla próbek jednorodnie wygrzanych w 25, 475 i 650°C oraz próbki poddanej LIA, (b) rozmiar komórki elementarnej (lewa oś) i średni rozmiar krystalitów (prawa oś) wyznaczone z widm XRD w funkcji temperatury wygrzewania jednorodnego, (c) mapy widm rozpraszania XRD w funkcji temperatury, oraz morfologia (d) materiału oryginalnego i (e) po LIA (**Rysunek 3 z pracy [H3]**).*

W celu wyjaśnienia obserwowanego zjawiska, wykonano wszechstronne badania strukturalne i spektroskopowe [**H3**], w tym zależność temperaturową widm rozpraszania rentgenowskiego (szczegóły Fig.3a-c), badania morfologii (Fig.3d) i składu mikrokryształów (Fig.S[1]3c w [**H3**] i Fig.S3b w [**H3**]) powstałych w wyniku LIA. Dodatkowo, dla każdej ze zidentyfikowanych faz uzyskanych poprzez jednorodne wygrzewanie w temperaturach 200, 450, 650 i 900°C (Fig.S2 w [**H3**]) zbadano właściwości spektroskopowe (Fig.S1 w [**H3**]), co potwierdziło przypuszczenia o laserowo indukowanym wygrzewaniu nanokrystalitów. Zjawisko to polega najprawdopodobniej na rekrystalizacji ultra-małych nanokrystalitów do innej fazy, na zwiększeniem rozmiarów krystalitów. Zjawiska te prowadzą do pasywacji powierzchni nanomateriałów i redukcji wpływu dużej powierzchni nanokrystalitów. Wart podkreślenia jest fakt, podobnych zjawisk nie obserwowano dla większych nanokrystalitów.

Podczas eksperymentów dotyczących LIA, zauważono również niespodziewanie duże zmiany właściwości spektroskopowych w funkcji mocy pobudzenia dla próbek, które były jednorodnie wygrzewane w temperaturze 450°C przez 2h [**H4**]. Materiał $NaYF_4$ współdomieszkowany jonami Yb^{3+} i Er^{3+} wykazuje wydajną konwersję energii w górę, gdzie energia niskoenergetycznych fotonów (NIR, 980 nm) jest absorbowana przez jony Yb^{3+} i w wyniku sumowania fotonów przekazywana do wyższych poziomów wzbudzonych jonów Er^{3+}. Skutkuje to uzyskaniem promieniowania elektromagnetycznego z zakresu widzialnego, dla jonów Er^{3+} odpowiednio światło zielone 540 nm (emisja z poziomu $^4S_{3/2}$, $^2H_{11/2}$) i czerwone 650 nm ($^4F_{9/2}$). Zjawisko konwersji energii jest powszechnie znane, jednak jak dotąd nie obserwowano tak anomalnych zmian we właściwościach

[1] Rysunki "S" odnoszą się do materiałów dodatkowych (supporting information) do wymienionej pracy

spektroskopowych. W wyniku zmian mocy pobudzenia obserwowano odwracalną zmianę barwy emisji od zielonej po czerwoną, która wynikała za zmiany proporcji intensywności emisji w pasmach zielonym ($^2H_{11/2}$+$^4S_{3/2}$→$^4I_{15/2}$) i czerwonym ($^4F_{3/2}$→$^4I_{15/2}$). Ponadto materiał wykazywał znaczącą histerezę w profilach zależności intensywności emisji od mocy pobudzenia (tzw. power dependence). W próbkach wygrzewanych jednorodnie w 450°C zjawiska laserowo indukowanego wygrzewania już nie obserwowano. Obserwowane zmiany barwy wytłumaczono procesami termicznego wygaszania poziomów pośrednich, których obsadzenie jest niezbędne do uzyskania wydajnej konwersji energii w górę. Ponadto, po przekroczeniu progowej wartości mocy pobudzenia, uzyskiwano szeroko-spektralną białą emisji anty-Stoksowską (Fig.4c).

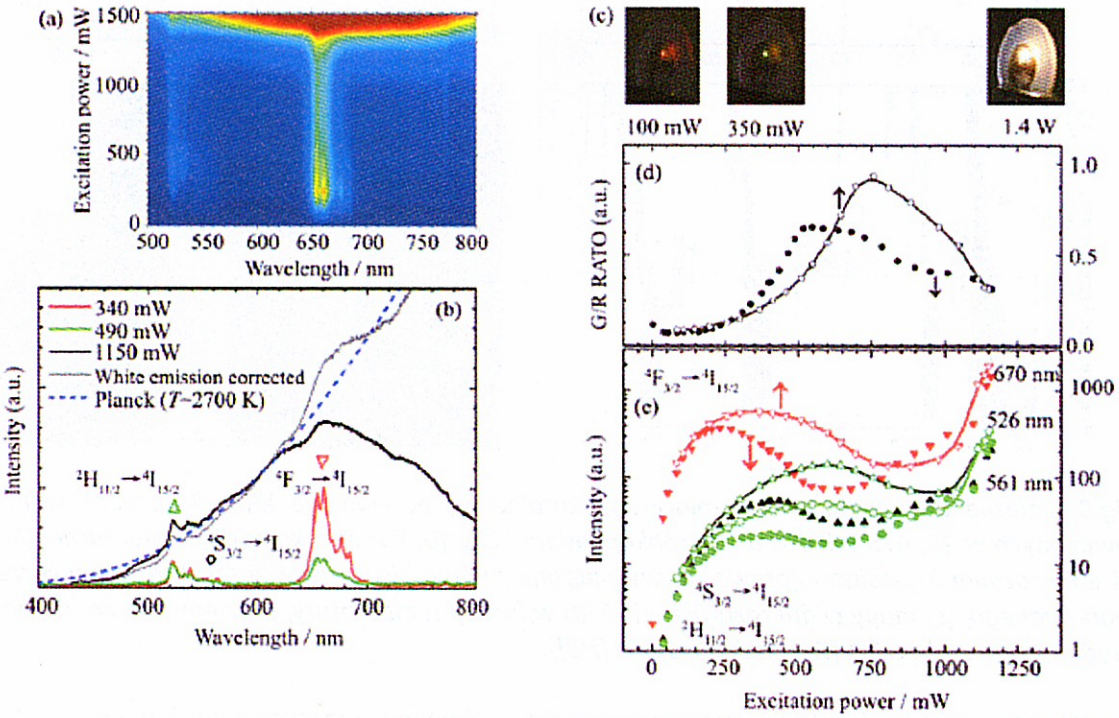

Fig.4. *Właściwości spektroskopowe $NaYF_4$ 20%Yb^{3+} 2%Er^{3+} po jednorodnym wygrzaniu w temperaturze 450°C przez 2h; (a) widma w funkcji mocy pobudzenia wiązką laserową 976 nm, (b) wybrane widma przy mocy pobudzenia 340, 490 i 1150 mW; (c) zdjęcia przedstawiające czerwoną, zieloną i białą emisję przy odpowiednio niskiej (100 mW), średniej (350 mW) i wysokiej (1400 mW) mocy pobudzenia; (d) współczynnik zielonej do czerwonej emisji oraz (e) profile mocy wyjściowej do mocy wejściowej mierzone dla różnych pasm emisji oraz dla rosnącej i malejącej mocy pobudzenia* ***(Rysunek 2 z pracy [H4]).***

Po skorygowaniu szeroko-spektralnego widma uzyskanego przy 1150 mW pobudzenia z uwzględnieniem czułości spektralnej układu pomiarowego, uzyskane widmo fitowano w zakresie 400-800 nm krzywą Planck'a w celu uzyskania temperatury emitującego materiału. Na Fig.4b widać zgodność modelu Plancka przy T=2700K z danymi eksperymentalnymi, co potwierdzałoby hipotezę istotnej roli temperatury w procesach budowania populacji poziomów wzbudzonych jonów Er^{3+}. Praca to została opublikowana [**H4**] i była prezentowana na konferencji REMAT 2011.

Nanowymiarowe sondy luminescencyjne jako Donory w czujnikach typu FRET

Jednym z niewielu sposobów na poznanie selektywnego oddziaływania między specyficznymi molekułami jest zjawisko Rezonansowego Transferu Energii (FRET – ang. Förster Resonance Energy Transfer). Zjawisko to pozwala na poziomie atomowym i molekularnym badać zależne od odległości procesy przekazywania energii miedzy dwoma chromoforami tzw. donorem i akceptorem energii. Zjawisko bezpromienistego transferu energii zachodzi tylko dla fluoroforów, których całka nakrywania pasm emisji donora i pasm absorpcji akceptora jest większa od zera. Przy założeniu, że para donor-akceptor są kompatybilne, kolejnym warunkiem niezbędnym dla zaistnienia FRET jest odległość między dwoma molekułami fluorofortami, która powinna wynosić od 1 do około 10 nm. Förster wykazał, że wydajność procesu (E) transferu energii zależy od odwrotności szóstej potęgi odległość między donorem i akceptorem:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Gdzie R_o jest odległością Förstera, przy której energia jest przenoszone z wydajnością 50%, a r jest rzeczywistą odległością między donorem a akceptorem. Wielkość bezwzględna R_o jest zależna od właściwości spektralnych donora i akceptora, całki nakrywania, orientacji względnej (κ^2) i współczynnika załamania medium wokół molekuł D i A. W większości zastosowań biomedycznych użyteczne R_0 mieści się w zakresie od 20 do 90 Å, a odległości te są porównywalne do średnicy większości białek, grubości błon biologicznych, odległości kompleksu antygen-antyciało czy też odległości między podjednostkami złożonych białek. Proces FRET może być łatwo kwantyfikowalny, gdyż prowadzi on do zmniejszenia intensywność fluorescencji; skrócenia czasu życia stanu wzbudzonego donora jak również do zwiększenia intensywności fluorescencji akceptora.

W wielu przypadkach analizę FRET można przeprowadzić na podstawie względnych wartości intensywności fluorescencji donora/akceptora, jednak takie podejście jest podatne na artefakty i błędy pomiarowe. Korzystniejszy z punktu widzenia powtarzalności jest pomiar czasu życia stanów wzbudzonych donora, gdyż efektywność transferu energii między D a A jest zdefiniowany prostym równaniem

$$E_T = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

Gdzie τ_{DA} jest czasem życia stanu wzbudzonego donora w obecności akceptora, a τ_D jest czasem życia donora w przypadku braku akceptora. W związku z tym za pomocą pomiaru czasów życia w obecności i przy braku akceptora, możliwe jest ilościowe określenie odległość między donorem i akceptorem. Ta wrażliwość efektywności transferu energii na odległość między molekułami D i A umożliwia wykorzystanie zjawiska FRET do badania odległości między molekułami, co w konsekwencji pozwala studiować wiele złożonych procesów biologicznych, np. badanie struktury i budowy białek, badanie oddziaływania receptorów i ligandów, immunooznakowanie lub immunotesty (ang.immunoassays), badanie struktury, konformacji i hybrydyzacji kwasów nukleinowych itp.

Tradycyjnie, pary D-A dobiera się spośród barwników organicznych, jednak z względu na bardzo krótki czasy życia fluorescencji większości z tych chromoforów, jak również ich podatność na fotowybielanie nadal istnieje wiele wyzwań technologicznych w wykorzystaniu zaprezentowanej metody. Konieczność pomiaru nanosekundowych czasów życia fluorescencji z rozdzielczością pikosekund wymusza stosowanie wyrafinowanej, a tym samym drogiej aparatury pomiarowej. Jednak obecny rozwój inżynierii i chemii materiałów nanowymiarowych domieszkowanych jonami lantanowców pozwala zaoferować nietoksyczne znaczniki luminescencyjne o wąskich liniach emisyjnych, dużym przesunięciu Stokesa, długich czasach życia luminescencji, wysokiej stabilności fotochemicznej i złożonych cechach spektroskopowych przydatnych do detekcji wielo-parametrycznej. Co również bardzo istotne, właściwości tych nanoluminoforów pozwalają na łatwe wyeliminowanie tła (tj. fluorescencji związków organicznych) poprzez wzbudzenie w zakresie bliskiej

podczerwieni lub w trybie pomiarów rozdzielczych w czasie. Tym samym przyczynić się one mogą do uproszczenia konstrukcji i miniaturyzacji układów detekcji i obrazowania w biologii i medycynie.

W pracy [**H5**], jako jedni z pierwszych zademonstrowaliśmy możliwość uzyskania transferu energii FRET między cząsteczkami konwertującymi w górę a kropkami kwantowymi. W tym celu zsyntezowano nanokrystality $NdYF_4$ współdomieszkowane jonami Yb^{3+} i Er^{3+} oraz CdSe kropki kwantowe o odpowiednim rozmiarze, który determinował położenie pasma absorpcji w obszarze zielonej emisji jonów erbu (tj. $^2H_{11/2}+^4S_{3/2}\rightarrow{}^4I_{15/2}$ na 520-560 nm). W tej konfiguracji nanoluminoforów, istniały wystarczające warunki do uzyskania emisji QD albo w wyniku re-absorpcji promienia zielonego jonów Er^{3+}, albo w wyniku bezpromienistego transferu energii. Za pomocą zaplanowanych eksperymenty wykazano, że dominującym mechanizmem jest proces bezpromienisty. Zaobserwowano, że proporcjonalnie do koncentracji akceptorów w znormalizowanym do pasma Er^{3+}:$^4F_{9/2}\rightarrow{}^4I_{15/2}$ widmie emisji, osłabieniu uległa zielona emisja erbu oraz pojawiła się czerwona emisja QDs w obszarze 570-600 nm (Fig.5). Ponadto skróceniu uległy czasy życia poziomu $^4S_{3/2}$:Er^{3+} na 540 nm w porównaniu do próbek nie zawierających akceptorów (tj.QD). Dodatkowo czasy życia emisji na 580 nm (emisja QD), wynosiły około 82 μs – tj. znacznie dłużej niż typowe czasy zaniku luminescencji dla struktur półprzewodnikowych. Te obserwacje potwierdzają fakt dominacji bezpromienistego transferu energii między jonami lantanowców a kropkami kwantowymi (Fig.6) nad reabsorpcją. Podobne wnioski wyciągnęli inni autorzy, którzy zsyntezowali Nano-heterostruktury UCNP-QD, które pod wpływem promieniowania NIR 980 nm wykazywały zmiany fotoprzewodnictwa.

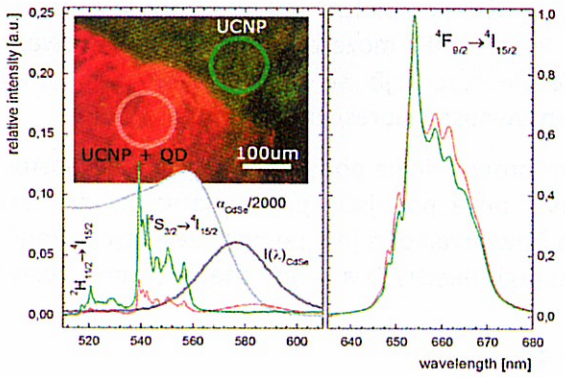

Fig.5. *Widma emisji anty-Stokesowskiej oraz obraz tej emisji spod mikroskopu fluorescencyjnego (2%Er^{3+}/ 20%Yb^{3+} NaYF4 UCNPs) „bez" (zielona krzywa, zielony obszar zdjęcia) oraz „z" (czerwona krzywa, czerwony obszar na zdjęciu) obecnością QD. Przedstawiono również widmo absorpcji użytych kropek kwantowych* ***(Rysunek 2 z pracy H5)***

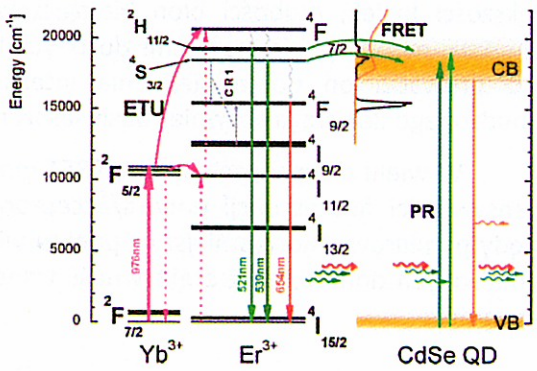

Fig.6. *Transfer energii (ang. energy transfer up-conversion - ETU) pod wpływem promieniowania NIR 976 nm. Energia z Yb/Er:NP jest transferowana do kropek kwantowych przez FRET lub reabsorpcję promieniowania (PR). Przedstawiono schematycznie pasma walencyjne (VB) I przewodnictwa (CB) badanych kropek kwantowych* ***(Rysunek 5 z pracy AB5)***

W w/w pracy policzono również parametry, który pozwoliły wyciągnąć daleko idące wnioski o przydatności UCNP do zastosowań w konstrukcji czujników oraz obrać kierunek dalszych badań. Uwzględniając sprawność kwantową emisji donora (Er^{3+}), parametry użytych do stabilizacji zawiesin koloidalnych ligandów (tj. kwasu oleinowego dla UCNP i TOPO dla QD), obliczając ponadto całkę nakrywania *J* między emisją donora (Er^{3+} $^2H_{11/2}+^4S_{3/2}\rightarrow{}^4I_{15/2}$) a absorpcją akceptora (QD), można było oszacować, że dystans Forstera równa się około 15 Å. Tak mała wartość R_0 potwierdziła obserwacje niewielkiej czułości metody przy użyciu badanej pary D-A. Najpoważniejszym źródłem niskiego R_0 jest niska sprawność kwantowa procesu konwersji energii w górę, która dla monokryształów domieszkowanych jonami Yb/Er wynosi 3%, jednak gwałtownie maleje dla mniejszych rozmiarów nanokrystalitów i spada do 0.3% dla nanokrystalitów o średnicy 100 nm i aż do 0.005 % dla

nanokrystalitów 10 nm. Dodatkowo, niesprzyjającym czynnikiem jest również fakt, że jony erbu znaczną część emisji wykazują w zakresie czerwonym ($^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ na 650 nm) i podczerwieni ($^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ na 850 nm, $^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ na 1.23 µm, $^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ na 1.7 µm). Konkludując, jedynie niewielka część energii może być przekazana do akceptora, co przekłada się na czułość i użyteczność detekcji.

Pierwsze eksperymenty wykazały, że nanokrystality domieszkowane lantanowcami stanowią ciekawą alternatywę dla typowych par D-A, jednak niska sprawność transferu energii stanowi przeszkodę dla zastosowania tych materiałów w biologii i medycynie. Szacunki pokazały, że transfer energii może się odbywać wyłącznie na niewielkich dystansach (15-30 angstremów) między molekułami/cząsteczkami akceptorów. Oznacza to, że przy rozmiarze nanoluminoforów rzędu 10-20 nm, jedynie przypowierzchniowe jony lantanowców są efektywnymi donorami do transferu energii FRET (Fig.7). Pozostałe jony znajdujące się w objętości nanokrystalitów wykazują emisję własną, wnoszą wkład do uśrednionej emisji, jednak nie podlegają żadnym zmianom wynikającym z obecności molekuł akceptora. Fakt ten prowadzi do obniżenia czułość metody pomiarowej. Niestety jony erbu czy tulu znajdujące się przy powierzchni nanokrystalitów są podatne na bezpromieniste wygaszanie ze strony medium i ligandów. Pomocna w takim przypadku mogłaby być pasywacja powierzchni nanokrystalitów [AB12], jednak zastosowanie płaszcza jednocześnie odpowiada za zwiększenie dystans między jonami przypowierzchniowymi (donorami) a molekułami akceptorów.

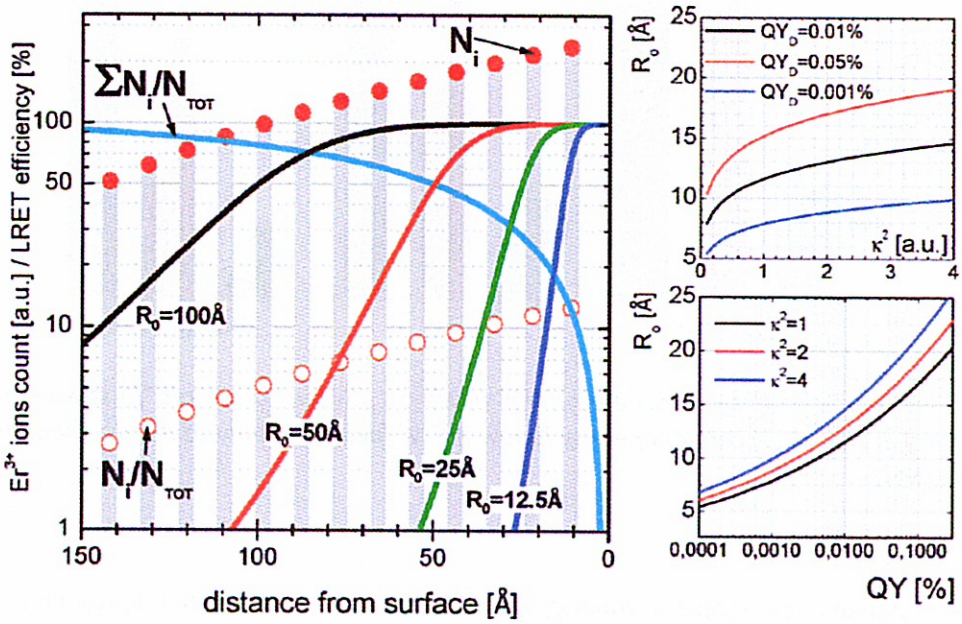

Fig.7. *(a) Ilość jonów erbu przedstawiona jako liczba jonów (N_i) oraz procentowy udział(N_i/N_{TOT}) jonów Er^{3+} dla różnej odległości od powierzchni nanokrystalitu (odpowiednio słupki z pełną i pustą czerwoną kropką). Dodatkowo przedstawiono kumulacyjną liczbę ($\Sigma N_i/N_{TOT}$) jonów erbu (błękitna krzywa) oraz teoretyczną sprawność kwantową dla założonych dystansów Forstera (R_0) równych 100, 50, 25, i 12.5 Å w funkcji odległości od powierzchni nanokrystalitu. Wykresy po prawej stronie pokazują symulowaną wartość R_o w funkcji sprawności kwantowej QY oraz wartości parametru orientacji κ^2* ***(Rysunek 6 z pracy H5).***

W pracy [**H6**] próbowano również zoptymalizować procedury wymiany ligandów oleinianowych w badanych nanokrystalitach $NaYF_4$. Przeniesienie koloidalnych kryształów $NaYF_4$, które są stabilizowane kwasem oleinowym do wody, wymaga wymiany ligandów na np. kwas merkaptopropionowy. Mimo, że procedura wymiany tych ligandów jest powszechni stosowana, zaproponowano możliwość jej optymalizacji, ponieważ oryginalny sposób przynosił spore straty

materiału związane z agregacją, wirowaniem i filtrowaniem zawiesin. Okazało się, że wykonanie tych procesów w atmosferze azotu w 50°C, poprawia o około 30% transparentność zawiesin i o około 25 % intensywność fluorescencji względem podobnej procedury przeprowadzanej w temperaturze pokojowej w powietrzu (Fig.8). Założono, że badane krystality tak samo zachowują się w swoim chemicznym otoczeniu w identycznych warunkach pomiarowych. Dlatego transparentność roztworu może świadczyć o tworzeniu się aglomeratów wielu nanokrystalitów. Intensywność luminescencji jest równocześnie miarą efektywności procedury wymiany ligandów, gdyż jest proporcjonalna do ilość nanokrystalitów w jednostce objętości. Zwiększenie transparentności wraz z równoczesnym wzrostem intensywności emisji skorelowane z zmianami w widmach IR, świadczą jednoznacznie o tym, że atmosfera azotu w podwyższonej do 50°C temperaturze, istotnie poprawia proces wymiany ligandów poprzez destabilizację kowalentnego wiązania się grup karboksylowych kwasu oleinowego do powierzchni nanokrystalitów. Równocześnie atmosfera interna zapobiega najprawdopodobniej tworzeniu mostków dwu-siarczkowych, co zapobiega agregacji nanocząsteczek.

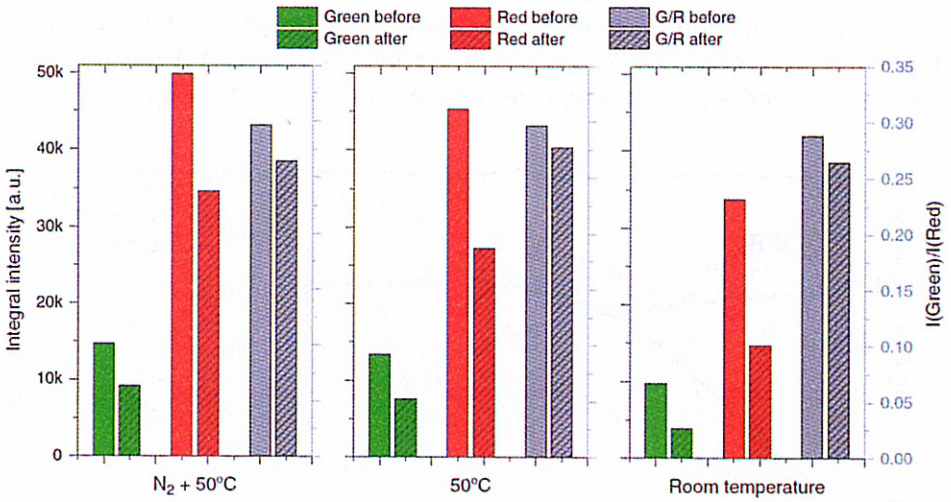

Fig.8. *Porównanie intensywności integralnej (lewa oś, „Green" oraz „red") i stosunku (prawa oś; G/R) składowych zielonej i czerwonej emisji jonów Er^{3+} w funkcji metody użytej do wymiany ligandów* ***(Rysunk 4 z [H6])****.*

Pierwsze badania dotyczące wymiany ligandów i transferu energii między nanokrystalitami domieszkowanymi jonami lantanowców a akceptorami zasugerowały możliwość zaproponowania całkowicie nowego podejścia do konstrukcji luminoforów do tego rodzaju testów. W środowisku Mathlab stworzono program symulujący zachowanie nanoluminoforów w funkcji wielkości krystalitów, koncentracji domieszki oraz architektury nanokryształów (tj.rdzeń-płaszcz). W wyniku przeprowadzonych symulacji (wyniki nie publikowane), zaproponowano dwa rozwiązania: tj. ultra małe nanokrystality UCNP oraz struktury typu rdzeń-płaszcz w postaci niedomieszkowanego rdzenia i domieszkowanego płaszcza (Fig.9).

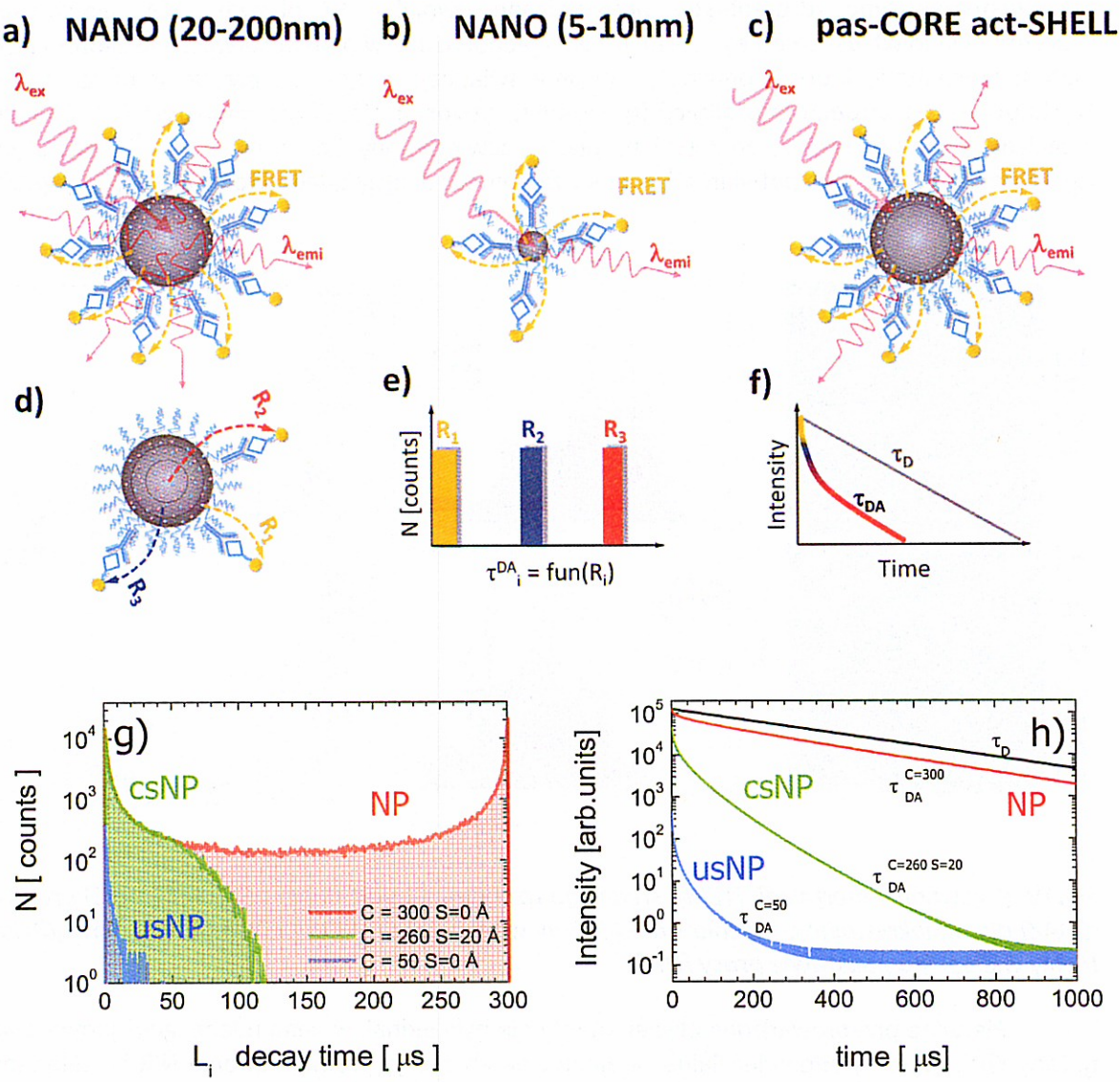

Fig.9. *Porównanie architektury nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców jako biologicznych sond FRET. Porównano nanokrystality jednorodnie domieszkowane jonami Yb/Tm (a), ultra małe nanokrystality (b) oraz krystality typu rdzeń domieszkowany jonami Yb3+ oraz płaszcz domieszkowany jonami Tm^{3+}(c). W zależności od odległości jonu domieszki od powierzchni (d), każdy z tych jonów daje inny wkład do obserwowanej makroskopowo kinetyki luminescencji(e-f). Szacowane w programie histogramy czasów życia (g) oraz krzywe zaniku luminescencji (h) dla różnych (a,b,c) nanokrystalitów (dane nie publikowane).*

Zastosowanie proponowanej przez nas architektury nanoluminoforów UPC FRET, powinno pozwolić uzyskać luminescencję jedynie z jonów zlokalizowanych w warstwie przypowierzchniowej pozwolic u krystalitów. Jony te są bardziej podatne na wpływ otoczenia chemicznego (np. obecność molekuł akceptora) niż jony znajdujące się w objętości krystalitów. To z kolei powinno pozwolić poprawić czułość metod detekcji.

W celu weryfikacji przyjętych założeń i przeprowadzonych symulacji zsyntezowano trzy typu W celu w krystalitów UCNP domieszkowanych 20% jonami Yb^{3+} oraz 2% jonów Tm^{3+} [**H7**], tj. NaYF4:Tm^{3+}/Yb^{3+} (Φ ~ 25nm), NaYF4:Tm3+/Yb3+ (Φ ~ 10nm) oraz struktur typu rdzeń-$NaYF_4$: Yb^{3+} – płaszcz $NaGdF_4$:Tm^{3+} (Φ ~ 40nm). Wszystkie uzyskane materiały wykazywały czystą fazę kubiczną. Budowę

nanocząsteczek typu rdzeń-płaszcz potwierdzono dwojako. W obrazie TEM nanokrystalitów zaobserwowano wzrost średniego rozmiaru NC i jednocześnie w polu obserwacji nie zaobserwowano małych krystalitów, których obecność mogłaby świadczyć o tym, że prekursor płaszcza zamiast krystalizować na zarodku krystalizacji (tj. rdzeniu), utworzył niezależne nanokrystality. Ponadto, w przeciwieństwie do rdzenia, prekursor na płaszcz zawierał jony Gd^{3+} a nie jony Y^{3+}, więc strukturę rdzeń-płaszcz można było potwierdzić również za pomocą analizy składu atomowego EDX (Fig.10)

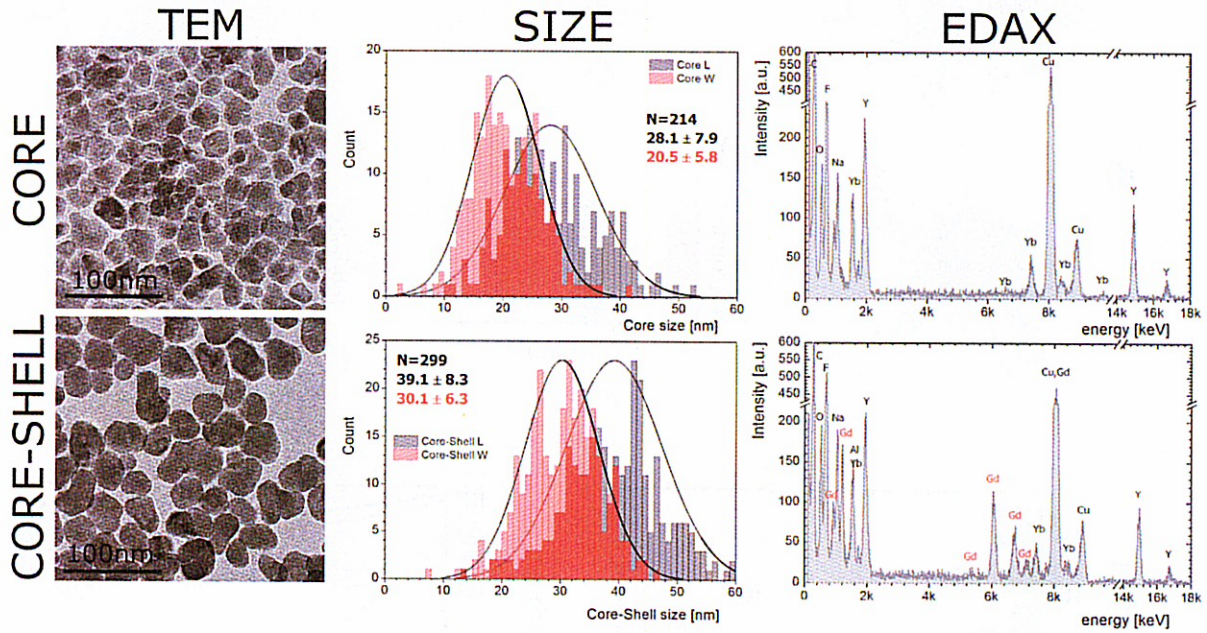

Fig.10. *Porównanie morfologii (TEM), średniego rozmiaru na podstawie zdjęć TEM (SIZE) oraz składu (EDAX) dla nanokrystalitów rdzenia $NaYF_4$ (górny wirsz) oraz struktury rdzeń-płaszcz $NaYF_4$@$NaGdF_4$ (dolny wiersz)* ***(na podstawie pracy [H7])***.

Pierwsze przeprowadzone eksperymenty nie były jednak w pełni udane, gdyż jony uczulacza, tj. jony Yb^{3+}, które są odpowiedzialne za efektywną absorpcję promieniowania NIR i przekazanie jej jonom aktywatora i zarazem donorom (tj. Tm^{3+}) zlokalizowano w rdzeniu. Ponieważ jony Yb^{3+} wykazują relatywnie długi czas życia i mają prostą strukturą elektronową, prowadzi to do akumulacji i migracji energii i stanowi swego rodzaju rezerwuar energii. To znaczy, po impulsie wzbudzającym jony Tm^{3+} (aktywatora i równocześnie donora) są wzbudzane stopniowo i niejako „dopompowywane" energią zgromadzoną w rdzeniu. Jest to efekt niepożądany, ale nie udało się go przewidzieć przy pierwszych syntezach. Obecnie trwają prace nad syntezą nanoluminoforów UCP FRET, w których zarówno jony uczulacza jak i aktywatora, będą znajdowały się w płaszczu, natomiast rdzeń będzie niedomieszkowany.

Uważam, że jest to bardzo obiecujący kierunek badawczy, który może doprowadzić do konstrukcji bio-czujników do szybkiego badania biomarkerów w pełnej krwi, tzn. bez konieczności skomplikowanego przygotowania próbek do pomiarów. Zadania te będą realizowane w grancie Sonata-Bis (2012/05/E/ST5/03901, 2013-2018) pt."Domieszkowane lantanowcami nanokoloidalne struktury typu rdzeń-płaszcz: synteza i aktywne modulowanie właściwości spektroskopowych", który został rozstrzygnięty w październiku 2012 r, a którego jestem kierownikiem.

Nanotermometria i nanogrzanie

W serii trzech artykułów [**H8-10**] przedstawiono syntezy, badania spektroskopowe i zachowanie nanowymiarowych koloidalnych luminoforów $NaYF_4$ domieszkowanych jonami Nd^{3+}. Idea, która przyświecała tym eksperymentom wynikała z chęci stworzenia materiału, który intencjonalnie będzie wykazywał duże straty niepromieniste, po to by umożliwić podgrzewanie makroskopowych objętości zawiesin w/w krystalitów. Materiał taki mógłby znaleźć potencjalne zastosowanie w tzw. termoterapii nowotworów. Ten rodzaj terapii ma swój początek w 1868 roku, kiedy to profesor Busch z Berlińskiej kliniki zaobserwował, że nowotwór *Sarcoma* u pacjenta, który przeszedł infekcję i kilkudniową czterdziestostopniową gorączkę, uległ znacznej regresji. Od tego czasu, tzw. termoterapia albo hypertermia zyskała znaczne zainteresowanie lekarzy i trwają intensywne poszukiwania metody, która w sposób zlokalizowany prowadziłaby do selektywnego zniszczenia nowotworów na zasadzie przegrzewania tkanek nowotworowych. Nowotwory wykazują bowiem większą podatność na uszkodzenie w wyniku przegrzania w porównaniu do tkanek zdrowych. Udowodniono, że hypertermia powoduje zwiększoną produkcję komórek T, aktywację czynnika transkrypcyjngo NF-κB, uwolnienie białek szoki termicznego, zwiększenie produkcji immunizujących białek HSP90 na powierzchni komórek nowotworowych lub też aktywację komórek typu „natural killer cells". Zlokalizowaną hypertermię z powodzeniem stosowano w laboratoriach, wykorzystując materiały takie jak biofunkcjonalizowane nanocząsteczki złota, hybryd $Au\text{-}Fe_3O_4$ czy też grafenu. Prócz tego, że bromek cetyltrimethylamonu (CTAB) stosowany w produkcji Nano-struktur złota jest wysoce toksyczny, wymienione materiały nie wykazują luminescencji, utrudniają więc prowadzenie równoczesnej obserwacji miejsca akumulacji nanogrzałek (tzw. teranostyki, czyli diagnostyki i równoczesnej terapii). Możliwość taka pojawia się dopiero po syntezie hybryd – skoniugowanych nanogrzałek i nanoluminoforów lub fluoroforów.

W wymienionych pracach postulowaliśmy, że nanoluminofory koloidalne domieszkowane jonami Nd^{3+} mogą posiadać równocześnie wszystkie niezbędne do zlokalizowanej teranostyki cechy:

1. Jony Nd^{3+} posiadają względnie intensywne pasma absorpcji w całym zakresie widzialnym (Fig.2 w **H9**), szczególnie istotne jest jednak pasmo absorpcji $^4I_{9/2}\rightarrow{}^4F_{5/2}$ znajdujące się w zakresie bliskiej podczerwieni, zapewniając największą głębokość penetracji światła oraz brak autofluorescencji tkanek.
2. Jony Nd^{3+} wykazują intensywną emisję Stokesowską na $^4F_{3/2}\rightarrow{}^4I_{9/2}$ (850-900nm) oraz $^4F_{3/2}\rightarrow{}^4I_{11/2}$ (1060nm), (Fig.4 w **H8**) czyli również w zakresie bliskiej podczerwieni.
3. Czasy życia luminescencji poziomu metastabilnego $^4F_{3/2}$ sięgają setek mikrosekund (Fig.6b w **H8**), co rodzi nadzieję na obrazowanie w trybie czasowo-rozdzielczym i dalsze poprawienie stosunku sygnału do szumu w głębokim obrazowaniu lokalizacji tych znaczników luminescencyjnych w tkankach.
4. Z względu na rozszczepienie, term ^4I_J rozszczepia się na równo położone poziomy ^4I_J (J=9/2, 11/2, 13/2, 15/2) wykazując efektywne (nawet w niskofononowych fluorkach $NaYF_4$) wygaszanie koncentracyjne w wyniku relaksacji krzyżowej ($^4F_{3/2}$; $^4I_{9/2}$)→($^4I_{15/2}$; $^4I_{15/2}$); (11600; 0) →(5851; 5851), $\Delta E = +102\ cm^{-1}$ (Fig.3a w **H9**).
5. Z względu na 60 cm^{-1} rozszczepienie poziomów Starkowskich poziomu $^4F_{3/2}$, Boltzmanowska populacja poziomu Z_2 rodziła nadzieję, że emisja jonów Nd^{3+} będzie podatna na zmiany temperatury (Eq.1 w **H10**), tak, by prócz grzania, jon Nd^{3+} mógł pełnić rolę czujnika temperatury (Fig.2 w **H10**).

Do syntez wykorzystano syntezę hydrotermalną, która polega na termicznym rozpadzie substratów w postaci octanów lantanowców w organicznych ligandach (np. kwasi oleinowym) o wysokiej temperaturze wrzenia (przekraczającej 250°C). Przed rozpoczęciem syntezy, przygotowane prekursory były oczyszczane z pozostałości wody oraz tlenu przy pomocy podgrzewania roztworów w obniżonym ciśnieniu, które było uzyskiwane przy pomocy pompy próżniowej podłączonej do układu. Reakcja formowania się nanokrystalitów z przyłączonymi ligandami organicznymi na

powierzchni zachodziła w obojętnej chemicznie atmosferze azotu. W celu modyfikacji parametrów syntezy, temperatura procesu była zmieniana w zakresie od 250°C do 330°C, a czas trwania reakcji zmieniał się od 30 minut do jednej godziny.

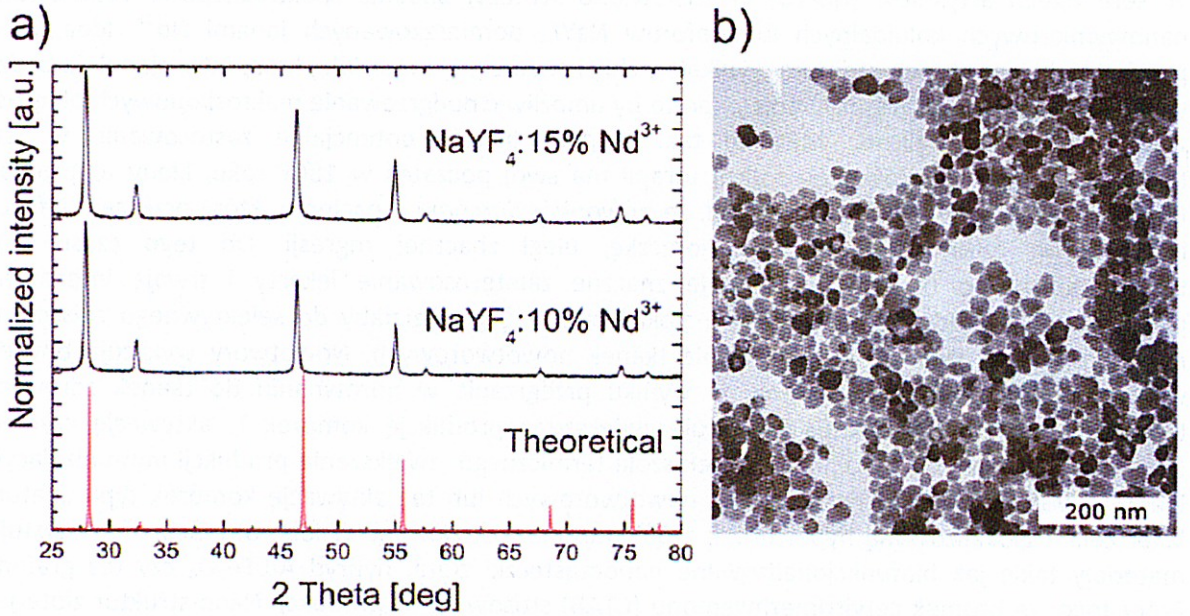

Fig.11. *(a) Rozpraszanie Rentgenowskie X-ray na proszkach $NaYF_4$ NPs domieszkowanych 10% i 15% jonów Nd^{3+}. Jako odniesienie podano wzorzec (ICSD-60257); (b) przykładowe zdjęcie z transmisyjnego mikroskopu elektronowego, demonstruje jednorodność rozmiaru uzyskiwanych nanocząsteczek* ***(Rysunek 1 z pracy H8).***

Na potrzeby eksperymentów wykonano serię próbek z rosnącą koncentracją jonów 1, 2, 5, 10, 15 i 25 % Nd^{3+} w $NaYF_4$. W wyniku analizy struktury i morfologii, wykazano istnienie czystych fazowo nanokrystalitów kubicznej formy fluorku $NaYF_4$, o średnim rozmiarze ziaren ~ 25 nm ± 2 nm. Wykonane widma absorpcji zostały dzięki pomiarom składu atomowgo (ICP-MC) znormalizowane do koncentracji krystalitów w zawiesinie. Pozwoliło to wykonać analizę Judda-Ofelta (**H8**), porównać bezwzględną intensywność integralną (Fig.5 **H8**) oraz określić sprawność kwantową emisji (Tabela 2 w **H8**) w funkcji koncentracji jonów Nd^{3+}. Wykazano, że wraz ze wzrostem koncentracji domieszki, czasy życia luminescencji skracały się z ~ 330 μs przy 1% do około 10 μs przy 25% (Fig.12). Wynikało to z rosnącej roli procesu relaksacji krzyżowej (Fig.3 w **H9**). Równocześnie obserwowano monotoniczne spadki parametrów Ω_2 i Ω_6 i monotoniczny wzrost Ω_4 oraz wzrost parametru spektroskopowego $X_{Nd} = \Omega_4/\Omega_6$ (Fig.12).

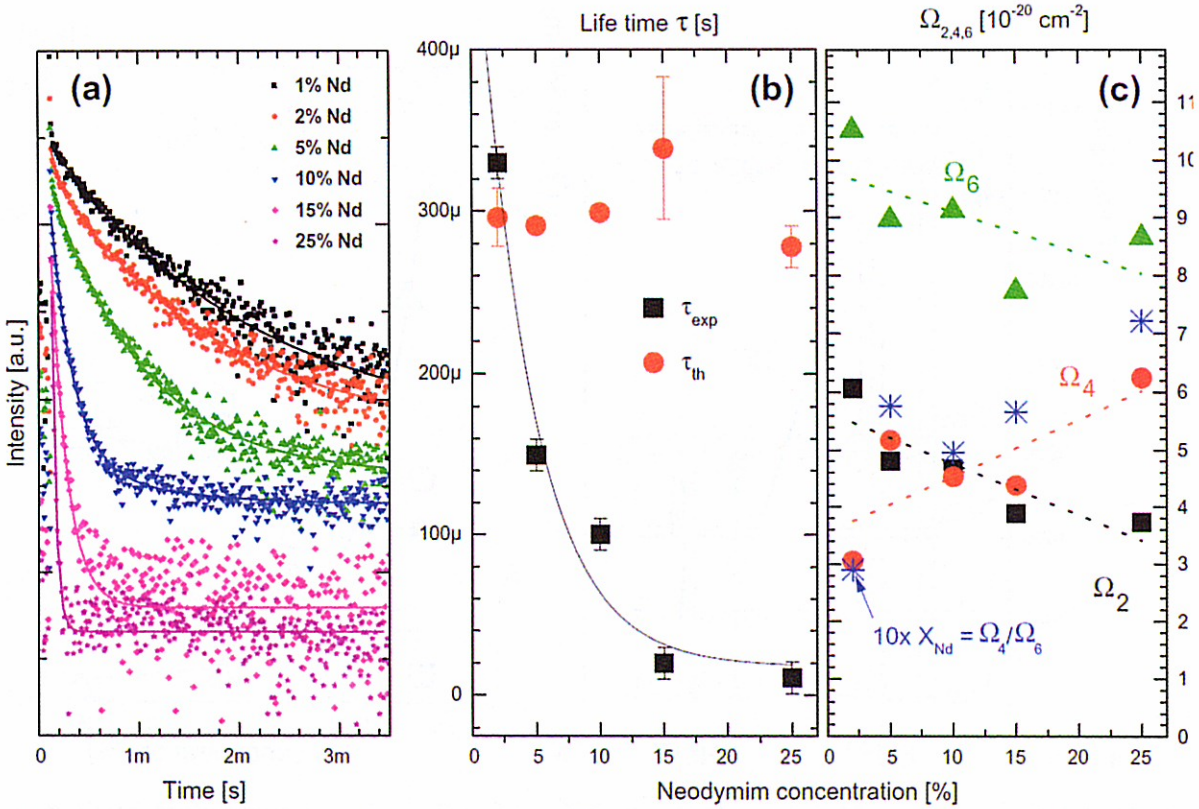

Fig.12. *(a) Krzywe zaniku luminescencji oraz (b) teoretyczne (■) i eksperymentalne (●) czasy zaniku luminescencji z poziomu $^4F_{3/2}$ jonu Nd^{3+}; (c) parametry Judda-Ofelta Ω_2 (■), Ω_4 (●), Ω_6 (▲) i parametr spektroskopowy Nd^{3+} (✳) w nanokoloidalnej zawiesinie NaYF4 w funkcji koncentracji domieszki jonów Nd^{3+}* ***(Rysunek 6 z pracy H8).***

Parametr Ω_2 zależy od krótkodystansowych efektów takich jak kowalencyjność i lokalna struktura matrycy. Wzrost tego parametru może być związany z wzrostem kowalencyjności wiązania między lantanowcem a sąsiednimi jonami. W litraturze zauważono redukcję tego parametru podczas transformacji matrycy szklanej zawierającej stałą koncentrację jonów Nd^{3+} do ceramiki szklanej. Parametry Ω_4 i Ω_6 opisują oddziaływania długo-zasięgowe i w szkłach korelują z takimi parametrami jak lepkość czy zasadowość matrycy. Zmiany parametrów Ω_2 i Ω_4 są zgodne z podobnymi obserwacjami przy przejściu ze szkieł tlenkowych (mniej kowalentnych) do fluorkowych ceramik szklanych (bardziej kowalencyjnych). Jednak w naszym przypadku procedura syntezy oraz faza uzyskanych materiałów była identyczna dla całej serii koncentracyjnej. Ponadto uzyskane materiały wykazywały fazę krystaliczną bez fazy amorficznej. Tak więc zaobserwowane związki parametrów Judda-Ofelta w funkcji koncentracji jonów Nd^{3+} mogą sugerować, że to różnice promienia jonowego między jonami Nd^{3+} i Y^{3+} prowadzą do deformacji struktury matrycy. Ten wniosek potwierdzono również delikatnym przesunięciem refleksów XRD w stron niskich kątów (Fig. 1 w **H8**). Nie znaleziono korelacji zmian parametru spektroskopowego z eksperymentalnymi widmami luminescencji.

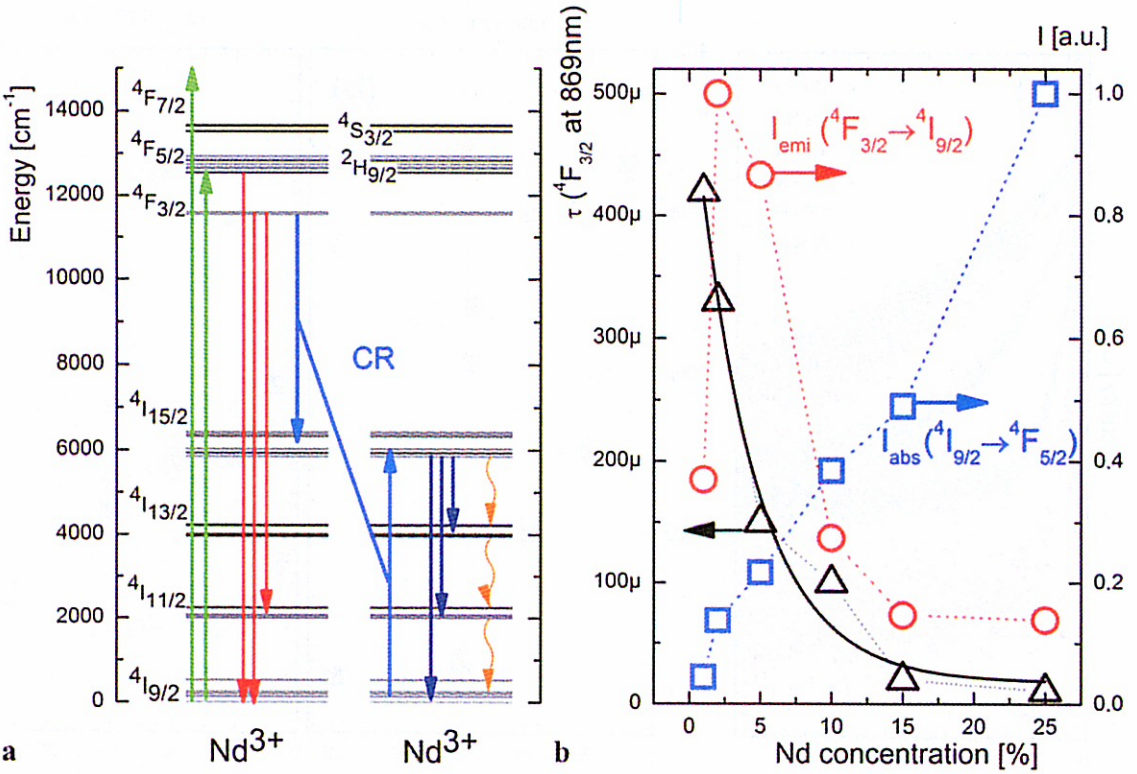

Fig.13. *(a) Diagram poziomów energetycznych jonów Nd^{3+} : strzałki oznaczają wzbudzenie (zielone), luminescencję (czerwone), depopulację w wyniku relaksacji krzyżowej (błękitne), emisję w zakresie IR (granatowe) i nie-proministą relaksację (pomarańczowe); (b) porównanie zależności koncentracyjnej czasów życia luminescencji poziomu $^4F_{3/2}$ (czarna punkty), znormalizowanej względnej intensywności emisji $^4F_{3/2}\rightarrow{}^4I_{9/2}$ (czerwone punkty) i absorpcji $^4I_{9/2}\rightarrow{}^4F_{5/2}$ (niebieski punkty)* ***(Rysunek 3 z pracy H9).***

Z punktu widzenia materiałów laserowych, zwiększenie przekroju czynnego na absorpcję w matrycy laserowej pozwoliłoby zminiaturyzować lasery. Jednak ze względu na wydajną relaksację bezpromienistą (CR) w matrycach domieszkowanych jonami Nd^{3+}, która uniemożliwia uzyskanie inwersji obsadzeń i uzyskanie akcji laserowej, koncentracja domieszki Nd^{3+} w typowych prętach laserowych nie przekracza 1.1 % (np.dla YAG). W przypadku naszych prac, istotne było dobranie odpowiedniej koncentracji jonów Nd^{3+} by z jednej strony uzyskać wydajną CR, a z drugiej zachować możliwie wydajną luminescencję. Na podstawie teoretycznych szacunków w oparciu o prawo przerwy energetycznej wykazano również, że w przypadku materiałów fluorkowych prędkość procesów niepromienistych $\Sigma W_{JJ} = 6.9 \times 10^5\ s^{-1}$ dla przejść między poziomami $^4I_{J=15/2-i} \rightarrow {}^4I_{J=13/2-i}$ (i = 0, 1, 2) a zastosowanie innych matryc o większej energii dostępnych fononów mogłoby pozwolić na zwiększenie sprawności nano-grzania. W matrycach tlenkowych takich jak $Y_3Al_5O_{12}$ czy YVO_4, o energii odcięcia rzędu ~ 700 cm^{-1} ($Y_3Al_5O_{12}$) w porównaniu do fononów ~ 400 i 560 cm^{-1} ($LiYF_4$) przejścia niepromieniste mogłyby osiągnąć prędkość rzędu $2.3 \times 10^{10}\ s^{-1}$, czyli ponad 3.3×10^4 raza więcej niż dla badanych matryc fluorkowych. Mimo, że istnieją metody syntez jednorodnych zawiesin koloidalnych nanoluminoforów tlenkowych, to jednak większość badań biomedycznych dotyczy nanoluminoforów fluorkowych.

Po badaniach strukturalnych i spektroskopowych przeprowadzono eksperymenty mające na celu weryfikację przeprowadzonych obliczeń. Skonstruowano specjalną kuwetę, w której zatopiono termoparę T, którą zasłonięto przed bezpośrednim oświetleniem światłem laserowym. W kuwecie umieszczono kolejno wszystkie zsyntezowane nanokoloidalne zawiesiny i badano napięcie termopary w funkcji czasu po włączeniu wzbudzenia laserowego (514.5 nm z lasera Ar+, pasmo absorpcji $^4I_{9/2}\rightarrow{}^4G_{7/2}+{}^2K_{13/2}+{}^4G_{9/2}$). Mimo słabego dopasowania linii wzbudzającej do pasm absorpcji Nd^{3+}

uzyskano potwierdzenie przewidywań. W porównaniu do próbki niedomieszkowanej (stanowiącej odniesienie), dla próbki domieszkowanej najwyższą koncentracją Nd^{3+} uzyskano po 125 sekundach wzbudzania wiązką CW wzrost temperatury 0.5 mL zawiesiny koloidalnej o 32°C (Fig.14). Równocześnie, maksymalna uzyskiwana temperatura grzania wykazywała monotoniczną funkcję koncentracji domieszki.

Biorąc pod uwagę, że współczynnik absorpcji badanej zawiesiny przy długości fali lasera użytego w przeprowadzonych eksperymentach, tj. α(514.5 nm) wynosi 0.12 cm^{-1} , a dla 796 nm wynosi około 7.5 raza więcej, tj. α(796 nm) = 0.89 cm^{-1} oraz uwzględniając, że skuteczna hypertermia wymaga wzrostu temperatury jedynie o 6°C, możliwe jest obniżenie intensywności wzbudzenia do wartości poniżej 15–25 mW (47–80 W/cm^2), co stanowi wartość jedynie o rząd wielkości gorszą niż w przypadku równoważnych eksprymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem nanokoloidalnego złota. Wadą nanocząstek złota jest jednak fakt, że ni wykazują on luminescencji a procedura syntezy wykorzystuj toksyczne substratu. Niepodważalną zaletą przedstawionego w pracy [**H10**] rozwiązania jest jednak uzyskanie nanogrzania oraz luminescencji z tej samej nanocząsteczki.

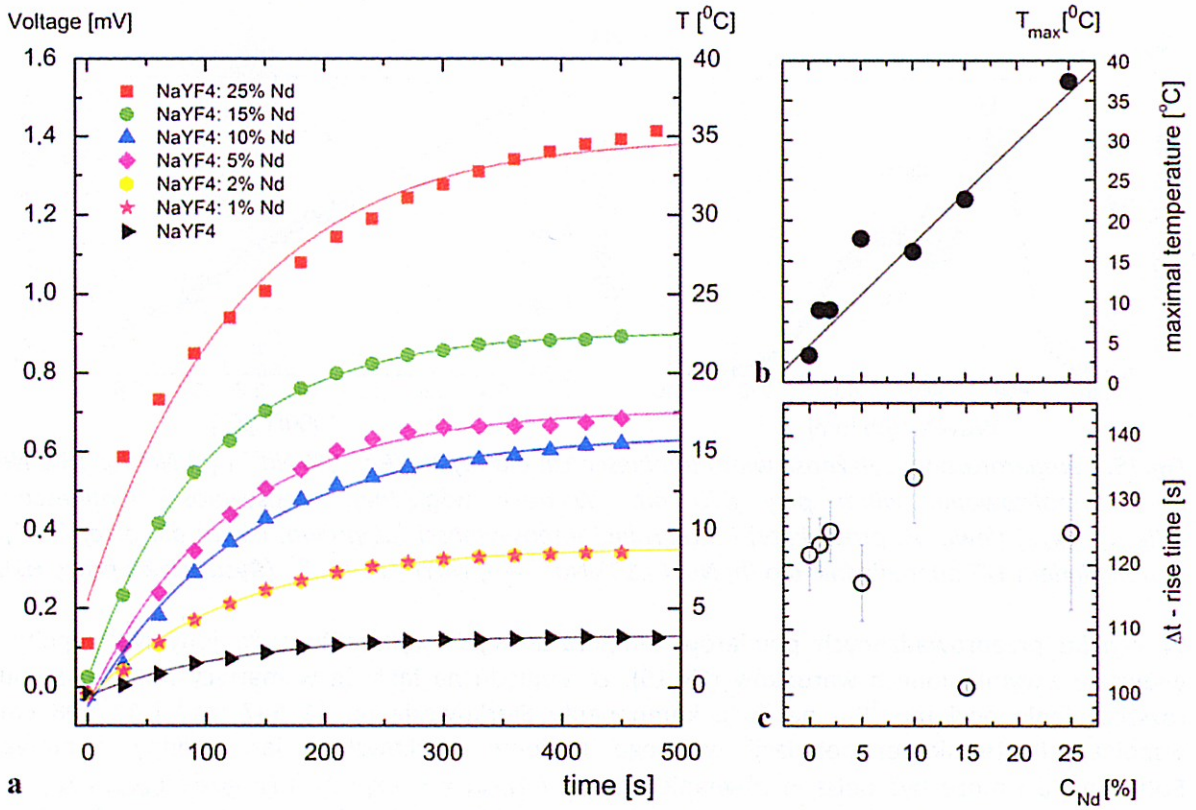

Fig.14. *(a) Profile czasowe narostu temperatury próbki w funkcji czasu po rozpoczęciu naświetlania oraz w funkcji koncentracji domieszki jonów Nd^{3+} w nankrystalitach α-$NaYF_4$ zawieszonych w chloroformie, (b) maksymalna temperatura T_{max} [°C] i (c) czas narostu Δt [s] przedstawiono w funkcji koncentracji domieszki* ***(Rysunek 4 z pracy H9).***

W literaturze obserwuje się znaczne zainteresowanie nanotermometrią, tzn. opracowaniem metod bezdotykowego mapowania temperatury zarówno dla obiektów makro- (np. turbiny, śruby statków) jak i mikro- (np. komórki) rozmiarowych. Zaproponowano wiele różnych fosforów czułych w różnych zakresach temperaturowych i użytecznych do tworzenia takich map. Najczęściej bazują one na temperaturowych zmianach parametrów spektroskopowych, takich jak zmiany bezwzględnej lub względnej intensywności luminescencji, zmiany czasów zaniku luminescencji, przestrojenie maksimum emisji itp. Ze względu na niejednorodność mapowanych obiektów, korzystne jest stosowanie metod umożliwiających samo-normalizację, jak ma to miejsce w przypadku pomiarów

czasów życia czy zmiany intensywności jednego pasma emisji względem innego. Dodatkowym warunkiem przydatności określonego materiału w biologii jest możliwość wzbudzania jego luminescencji w zakresie NIR, a także odpowiednio duża zmiana badanych cech w relatywnie wąskim zakresie zmian temperatury 30-40°C z dokładnością minimum 0.1 °C.

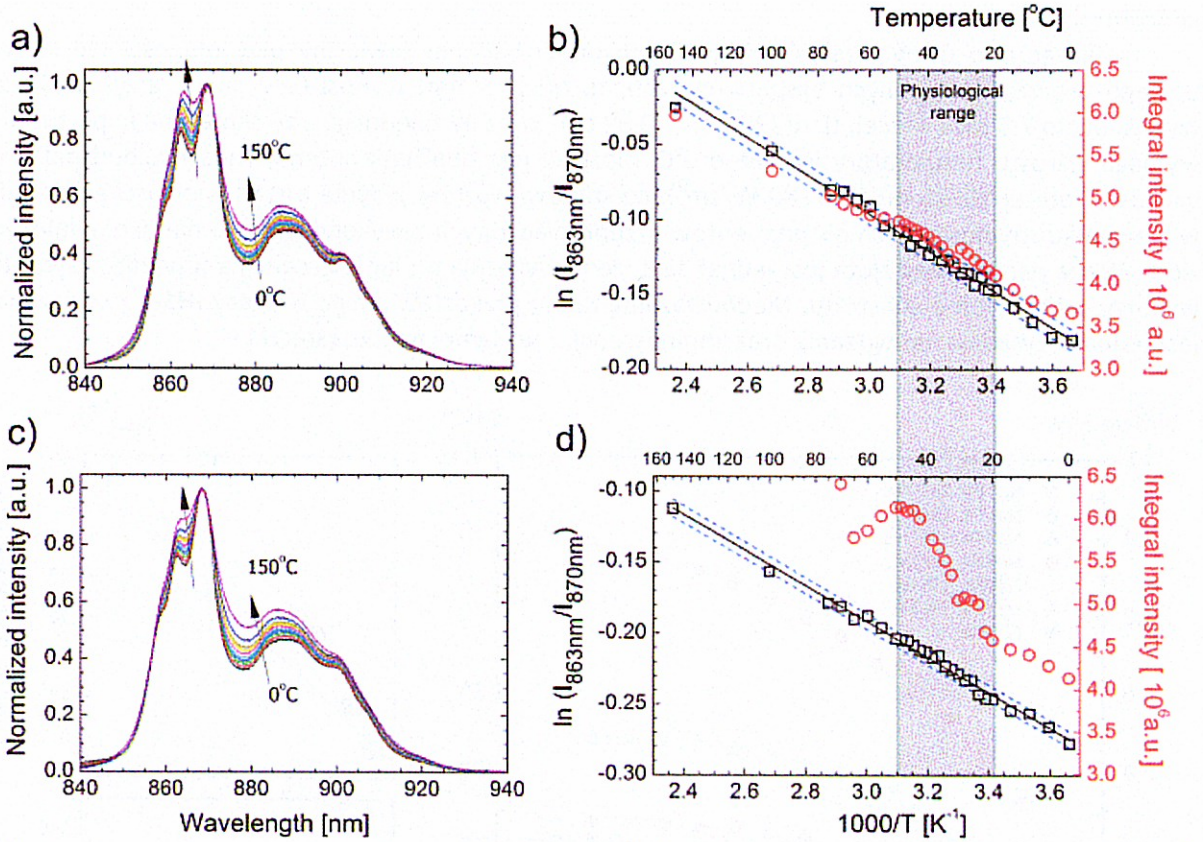

Fig.15. *Temperaturowa zależność widm luminescencji dla (a) $NaYF_4$: 10% Nd^{3+} i (c) $NaYF_4$: 15% Nd^{3+} po znormalizowaniu widm przy 870 nm. Wykresy względnej intensywności luminescencji $ln(I_{863nm}/I_{870nm})$ (lewa oś, prostokąty) i integralnej intensywności (oś prawa, kółka) dla przejść $^4F_{3/2}/^4I_{9/2}$ względem 1/T odpowiednio dla (b) $NaYF_4$:10%Nd^{3+} i (d) $NaYF_4$:15%Nd^{3+}* ***(Rysunek 2 z pracy H10).***

W wyniku przeprowadzonych pomiarów temperaturowych wykazaliśmy, że jony Nd^{3+} spełniają wszystkie z wymienionych warunków (Fig.15). Ze względu na fakt, że w matrycy $NaYF_4$ następuje rozszczepienie poziomu $^4F_{3/2}$ na dwie komponenty Starkowskie na 11 587 cm^{-1} i 11 508 cm^{-1}, współczynnik termicznej populacji wyższego poziomu Starkowskigo jest zgodny z prawem Boltzmann'a i może być opisane równaniem I_{863nm} / I_{870nm} = C exp(-ΔE/kT), gdzie I_{863nm} i I_{870nm} są intensywnościami luminescencji przy 863 nm i 870 nm; C jest stałą zależną od degeneracji poziomu, prędkości emisji spontanicznej oraz energii fononów i generalnie uzyskiwana jest w wyniku kalibracji; ΔE jest różnicą energii między poziomami Starkowskimi (60 cm^{-1} dla $NaYF_4$), k jest stałą Boltzmann'a, a T temperaturą bezwzględną. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono ponadto, że parametr I_{863nm} / I_{870nm} uległ zmianie o 15% w wyniku zmian temperatury od 0 °C do 150 °C, co pozwala oszacować czułość proponowango nanotermometru na 0.1 % K^{-1} – wartość wystarczającą do mapowania temperatury w biologii i medycynie.

Plazmoniczne wzmocnienie sprawności konwersji energii górę

Jak wspomniano, wydajność kwantowa konwersji energii w górę jest niewielka i w przypadku nanoluminoforów wynosi poniżej 0.01 % dla najbardziej wydajnych par lantanowców, tj. Yb/Er i Yb/Tm. Mimo, że wydajność tych „dwu-fotonowych" procesów jest większa niż procesów nieliniowych, nadal trwają poszukiwania sposobów wzmocnienia tych zjawisk. W tym celu, w pracy **[H11]** zweryfikowano możliwości wzmocnienia luminescencji anty-Stokesowskiej za pomocą plazmonów metalicznych (ang. MEF – metal enhanced fluorescence) (Fig.16). W tym celu zsyntezowano nanokoloidalne kryształy $NaYF_4$ (UCNP, średnica ~25 nm) domieszkowane jonami Yb% i Tm^{3+} oraz nanopręciki złota (Au NP rozmiar ~8 x ~23 nm), których pasmo absorpcji plazmonowej wzdłużnej pokrywało się z przejściem $^3H_4 \leftrightarrow {}^3H_6$ jonu Tm^{3+}. Efekt wzmocnienia / tłumienia badano rejestrując zarówno intensywność względną jak i czasy życia luminescencji jonów Tm^{3+} w funkcji względnej koncentracji UCNP:Au NP.

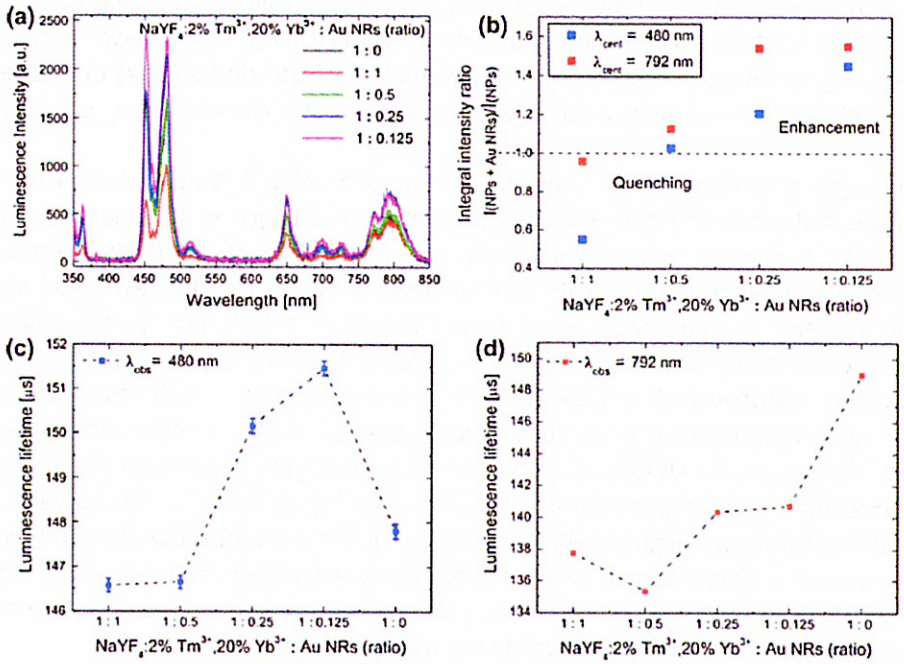

Fig.16. *Pomiary wzmocnienia MEF emisji anty-Stoksowskiej w domieszkowanych jonami Yb^{3+} i Tm^{3+} nanokrystalitach koloidalnych $NaYF_4$ przez nanokoloidalne krystality złota (a) widma luminescencji, stosunek intensywności emisji anty-Stokesowskiej „z" i „bez" domieszki krystalitów Au, czasy życia emisji Tm^{3+} dla przejść z poziomów (c) $^1G_4$ i (d) $^3H_4$.*

Wnioski z przeprowadzonych badań nie są jednoznaczne i sugerują, że w zależności od odległości obu nanokrystalitów, zjawisko MEF może być korzystne, przyczyniając się do poprawy wydajności kwantowej emisji jonów lantanowców, lub też, w związku z bezpośrednim oddziaływaniem UCNP z nanokoloidalnym złotem może odpowiadać za tłumienie emisji. Odległość między dwoma nanocząsteczkami były kontrolowane w sposób pośredni przez względne zmiany koncentracji obu nanokrystalitów. Uzyskane wzmocnienie, nie przekraczało wartości 2, podobnie jak w podobnych badaniach w literaturze. Tak więc przydatność efektów plazmonowych do wzmocnienia konwersji energii w górę w czujnikach opartych o te związki jest więc na razie kontrowersyjna, gdyż wzmocnienie jaki uzyskuje się w przypadku barwników organicznych wynosi kilkanaście-kilkast razy, a w przypadku rozpraszania Ramanowskiego nawet kilka-kilkanaście rzędów wielkości. Uzyskane wzmocnienie UPC równe 2, jedynie nieznacznie poprawia wydajność emisji lantanowców, może jednak równocześnie i w sposób niepożądany istotnie podnieść sygnał tła

Podsumowanie

Szybki rozwój nauk biologicznych wymaga ciągłego doskonalenia technik analitycznych. Dlatego też coraz większe zainteresowanie badaczy skupia się na rozwijaniu szybkich, czułych i selektywnych testów, które umożliwiają analizowanie kilku bio-składników w jednej próbce. Jedna z najbardziej wszechstronnych i czułych metod diagnostycznych wykorzystuje znaczniki fluorescencyjne i pozwala uzyskać czułość detekcji na poziomie pojedynczych molekuł i rozdzielczość przestrzennego obrazowania rzędu pojedynczych nanometrów (np.mikroskopia STED).

Choć tradycyjne barwniki organiczne, takie jak związki fluoroscencyjne, kropki kwantowe czy białka fluorescencyjne wykazują wiele przydatnych właściwości, ich luminescencja ma charakter Stokesowski, dlatego muszą być wzbudzane światłem UV (potencjalnie szkodliwym i rakotwórczym) lub niebiesko-zielonym z zakresu widzialnego. Powszechnie wiadomo, że światło krótkofalowe jest silne rozpraszane w tkankach oraz absorbowane przez wiele molekuła organicznych budujących komórki i tkanki (np. kolagen, elastyna, NADH, FAD, hemoglobina itp.), co znacznie ogranicza głębokość penetracji światła w głąb tkanek. Ponadto, szerokie pasma absorpcji i emisji tych znaczników fluorescencyjnych pokrywają się i ograniczają możliwość detekcji wieloparametrycznej (tj. detekcji wielu analitów w tej samej próbce równocześnie). Dodatkowo barwniki organiczne charakteryzują się wysoką podatnością na foto-wybielanie (foto-degradację) oraz bardzo często ich właściwości spektroskopowe zależą od lokalnego środowiska chemicznego, co często komplikuje analizy.

Obiecującą alternatywą dla tradycyjnych fluoroforów i kropek kwantowych mogą być domieszkowane lantanowcami nanokryształy (w tym konwertujące w górę nanoluminofory UCNPs). UCNPs wykazują korzystne właściwości takie jak fotostabilność, brak toksyczności i wydajną konwersja promieniowania NIR do krótszych długości fal. Pozwala to rejestrować sygnał z wysoką czułością jak również w obiektach silnie rozpraszających, takich jak tkanki. Mimo korzystnych właściwości fizyczno-chemicznych, istnieje wiele kwestii, które należy rozwiązać zanim UCNPs będą mogą być zostać zastosowane w biologii i medycynie. Jednym z nich jest optymalizacji składu i struktury, a także wzmocnienie procesu konwersji energii w górę. Innym niezbędnym warunkiem dla szerszego wykorzystania UCNPs jest dostępność komercyjnych narzędzi, które obecnie nie ma. Ponadto, domieszkowane lantanowcami koloidalne nanokrystality są syntetyzowane w roztworach zawierających hydrofobowe ligandy. Proces konwersji tych materiałów do środowiska wodnego wymaga stworzenia i optymalizacji procedur wymiany ligandów, aby zapewnić dobrą dyspersję niezaglomeryzowanych cząsteczek, a także dalszą bio-funkcjonalizację za pomocą molekuł biologicznie aktywnych takich jak przeciwciała czy fragmenty DNA.

W ostatniej z cyklu, obszernej pracy przeglądowej [**H12**] podsumowano właściwości spektroskopowe nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców, głównie nanoluminoforów konwertujących energię w górę (UCNP - ang. Up-converting nanoparticles). Dokonano systematycznego porównania różnych znaczników luminescencyjnych, opisano cechy idealnych, z punktu widzenia biologii, znaczników luminescencyjnych, opisano metody poprawy wydajności konwersji energii w górę w tym dobór rodzaju i koncentracji domieszek, dobór matrycy, architektury rdzeń-płaszcz oraz plazmonowego wzmocnienia luminescencji. Następnie opisano metody funkcjonalizacji i biofunkcjonalizacji koloidalnych zawiesin nanoluminoforów, przedstawiono liczne zastosowania nanoluminoforów domieszkowanych lantanowcami, m.in. w konstrukcji czujników, obrazowaniu (fluorescencyjnym, PET, MRI), a także w terapii fotodynamicznej i termoterapii. Na koniec, dokonano przeglądu istniejących rozwiązań technicznych do rejestracji i wizualizacji UCNP w biologii i medycynie. Faktyczny brak dedykowanej aparatury pomiarowej jest aktualnie największym wyzwaniem i ograniczeniem rozpowszechnienia tych unikalnych znaczników luminescencyjnych w zastosowaniach w biologii i teranostyce.

3 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

3a Realizowane projekty badawcze

- *Domieszkowane lantanowcami nanokoloidalne struktury typu rdzeń-płaszcz: synteza i aktywne modulowanie właściwości spektroskopowych* **NCN Sonata Bis, 2012/05/E/ST5/03901**, 2013-2018, kierownik
- *Exploitation of electrical, spectral and optical methods in biodetection and bioimaging* – **EIT+ Wrocław Research Centre**, 2011-2014, kierownik zadania badawczego
- *Domieszkowane lantanowcami nanoluminofory jako sondy w bioczujnikach,* grant **MNISW NN 507 58 49 38** (2010-2012), kierownik
- *Synteza i właściwości spektroskopowe biokompatybilnych nanokompozytów: SiO_2 i domieszkowanych lantanowcami nanofluorków jako selektywnych znaczników luminescencyjnych w zastosowaniach biologicznych,* grant **MNISW NN 507499538**, (2010-2012), badacz
- *Nano biotechnologies for health application* **NanoBioTech, FP6, action 4221** badacz, topic – development of advanced fluorescence spectroscopy methods for imaging and sensing in vitro
- *In vitro testing technologies and assay automation* **InViTech, FP6, action 4224**, badacz, topic: Noninvasive and non-destructive cytotoxicity studies in vitro

3b Lista wizyt badawczych:

2008	Gastroenterologische Molekulare Zellbiologie, Medizinische Klinik und Poliklinik B, Munster, Germany (1 tydzień) – temat: autofluorescencja in vitro
2002	University of Turku, Department of Chemistry, Department of Inorganic Chemistry Turku, Finland (2 tygodnie) – temat: domieszkowane lantanowcami szkła
1998, 2001	Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus (2 x po tygodniu), temat: lasery na ciele stałym pompowane diodą laserową
2000	Arava Laser Laboratory, Ben Gurion University of Negev, Ber Sheva, Israel (3 miesiące), temat: iterbowe lasery na ciele stałym pompowane diodą laserową

3c Nagrody i wyróżnienia

2006	zwycięzca trzeciego konkursu Politechniki Wrocławskiej za patent pt. *Sposób pomiaru stopnia zaawansowania i rozległości choroby nowotworowej oraz urządzenie do pomiaru stopnia zaawansowania i rozległości choroby nowotworowej*
2004	Gold Medal on the 53rd Word Exhibition of Innovation, Research and New Technology - Brussels Eureka for the invention in the field of medical diagnosis
2004	grant konferencyjny z Towarzystwa Naukowego Warszawskiego i FNP
2004, 2005	stypendysta Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej
1996, 1997	stypendysta Ministra Nauki

3d Recenzje, organizacja konferencji

- Członek komitetów organizacyjnych następujących konferencji:

  9.2005 *International Conference on f-elements*, Szklarska-Poręba, Poland, komitet organizacyjny

  6.2004 *International Symposium on New Trends in Photodynamic therapy and Diagnosis*,Wroclaw, Poland, sekretarz symposium

  6.2003 *Rare-earth systems*, Ladek Zdrój, Poland, komitet organizacyjny

  6.2001 *Excited State of Transition Elements*, Ladek Zdrój, Poland, komitet organizacyjny

- Recenzent w czasopismach naukowych (Optical Materials x20, J.Luminescence x5, Optics Express, ACS The Journal of Physical Chemistry, Materials Science & Engineering, Toxicology Letters, ACS Applied Materials & Interfaces x3, RSC Chemical Communications, RCS Dalton Transactions x4, polskie czasopisma naukowe etc.)
- Recenzent grantów (FNP 4x, NCN 2x)

3e Patenty

2010 *Markers for protection valuable liquid and solid materials*, zgłoszenie międzynarodowe **1600000729**, PCT/PL2010050047

2009 *Sposób wykorzystania nanokrystalicznych luminoforów do zapisu informacji oraz sposób odczytu informacji*, zgłoszenie PL **P388780**, 12.08.2009

2007 *Method of fluorescence imaging,* European Patent **P-2795/MF**, 01-06-2007

2005 *Sposób pomiaru stopnia zaawansowania i rozległości choroby nowotworowej oraz urządzenie do pomiaru stopnia zaawansowania i rozległości choroby nowotworowej / A method of assessing the stage of development and spreading of cancer and a device to assess the stage of development and spreading of cancer,* patent **P375249**, 20-05-2005

3f Dorobek publikacyjny

Dorobek naukowy habilitanta po obronie doktoratu obejmuje **48** publikacji, w tym:

- **39** prac oryginalnych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej, 10 prac pokonferencyjnych;
- **1** praca jednoautorska;
- **11** prac bez udziału promotora pracy doktorskiej;
- **33** prac dotyczących fizyko-chemii materiałów
- **15** prac dotyczących tematyki biomedycznej

Całkowity sumaryczny *impact factor* opublikowanych prac wyliczony na podstawie współczynników czasopism na rok publikacji (lub rok najbliższy dacie publikacji, w którym znany był IF) wyniósł: **108.26.** Sumaryczny *impact factor* 12 prac składających się na habilitację: **44.65**. Szczegółową list publikacji zamieszczono w załączniku nr 2.

3g Najważniejsze wystąpienia konferencyjne

2012 *Up-conversion FRET from rare earth nanophosphor to CdSe quantum dots*, **A. Bednarkiewicz**, International Summer School On Fluorescent Nano-Particles In Bio-Medicine, 16-20 July 2012, Miraflores de la Sierra, Madrid (**wykład proszony**)

2012 *Hypersensitivity of Eu^{3+} in ultrasmall nanocrystals*, **A. Bednarkiewicz**, D.Wawrzynczyk, W.Strek and M.Samoc, 8th International Conference on f-Elements, Udine ITALY August 26-31, 2012 (**wykład**)

2011 *Colloidal $NaYF_4$ Nanophosphors: Properties, Applications And Prospects*, **A. Bednarkiewicz**, Rare Earth Materials REMAT 2011 (13-15.06.2011), Wroclaw, Poland (**wykład proszony**)

2011 *Novel Strategies in FRET Based Sensing with Lanthanide Doped Up-Converting Energy Donors*, oral presentation, **A. Bednarkiewicz**, The Int. Conf. on Luminescence & Optical Spectroscopy of Condensed Matter (Univ.Michigan, Ann Arbor, USA, 24-29.06.2011) (**wykład**)

2011 *Enhancement of luminescent properties in ultrasmall NaYF4:Yb/Er nanoparticles after laser annealing,* **A.Bednarkiewicz**, IWASOM 2011 (Gdansk, Poland, 16-22.07.2011) (**wykład**)

2010 *Nano-colloidal rare earth doped luminophores: properties and bio-applications,* **A. Bednarkiewicz,** Excited States of Transition Elements and Workshop on Luminescence, (Wrocław & Piechowice, Poland 4-9.09.2010) (**wykład + 3 plakaty)**

2007 *Microscopic Fluorescence Lifetime and Hyperspectral Imaging with Digital Micromirror Illuminator,* **A. Bednarkiewicz,** European Conference on Biomedical Optics, (Munich, Germany 6.2007) (**wykład**)

2006 *Fluorescence Lifetime imagining using a digital micro-mirror device for biomolecular detection in-vivo,* **A. Bednarkiewicz,** NanoBioEurope, (Grenoble, France 2006), (**poster)**

2005 *The susceptibility of bacteria to photodynamic inactivation with lanthanide complexes of chlorin e6,* ***A. Bednarkiewicz*** European Conference on Biomedical Optics, (Munch, Germany, 06.2005) ***(wykład)***

3h Działalność popularyzatorska i dydaktyczna

- Aktualnie kieruję, jako opiekun naukowy i promotor pomocniczy trójką doktorantów zatrudnionych do realizacji projektu NAOMIS WCB EIT+ (p. Anna Ganch, p. Katarzyna Prorok, p. Małgorzata Misiak). Wszystkie doktorantki są na 2 roku studiów doktoranckich i nie mają jeszcze otwartych przewodów doktorskich;
- Byłem promotorem lub opiekunem pomocniczym kilku prac magisterskich (A. Darecki Politechnika Wrocławska 2012 r., D. Mosio Politechnika Wrocławska 2010 r., D. Wawrzynczyk Uniwersytet Wrocławski 2011 r., K. Jakubczyk Politechnika Wrocławska 2005 r., J. Lewandowski Politechnika Wrocławska 2005 r., P. Gacek Politechnika Wrocławska 2005 r., K. Mokrzycka Uniwersytet Wrocławski 2012 r. itd.) dotyczących tematyki spektroskopii lantanowców, laserów na ciele stałym, bio-spektroskopii i medycznych zastosowań laserów. Byłem również opiekunem 9 praktyk, staży i prac inżynieryjnych. Dwójka spośród moich studentów magistrantów otrzymała nagrody za najlepsze prace magisterskie:
  - Mgr Dominika Wawrzyńczyk – nagroda Polskiego Towarzystwa Fizycznego za 2011 rok, za pracę magisterską pt.*Nanokoloidy NaYF4 domieszkowane jonami neodymu Nd^{3+} - synteza, właściwości spektroskopowe oraz zastosowanie w termoterapii,* 2010 r.
  - Mgr inż. Paweł Gacek – nagroda Stowarzyszenia Elektryków Polskich za pracę magisterską pt.*Opracowanie, wykonanie, testowanie urządzenia do pomiaru stopnia nagromadzenia*

foto-uczulacza w metodzie fotodynamicznej leczenia raka, 2005 r.

- W latach 2002-2005 byłem wykładowcą specjalistycznych kursów medycznych dotyczących zastosowania laserów w diagnostyce i terapii medycznej;
- Wykładowca na Festiwalu Nauki we Wrocławiu (2003, 2011), Polska

3i Inne

Ekspertyza

Analiza specyficzności roztworów oznakowanych przeciwciał i rozpoznawanych substancji biologicznych w ramach zadania nr 5.5 projektu POIG.01.03.01-02-002/08 *Czujniki i sensory do pomiarów czynników stanowiących zagrożenia w środowisku – modelowanie i monitoring zagrożeń*

4 Przebieg pracy naukowej

4a Okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

W swojej pracy magisterskiej pt. „Generacja drugiej harmonicznej z lasera neodymowego pompowanego diodą laserową" realizowanej pod kierunkiem dr inż. Przemysława Derenia w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych, Polskiej Akademii Nauk zajmowałem się uzyskaniem i badaniem zjawiska generacji na nieliniowym krysztale KTP drugiej harmonicznej z małego lasera na ciele stałym (monokryształ YAG:Nd^{3+}), który był pompowany półprzewodnikową diodą laserową. W pracy tej własnoręcznie skonstruowałem rezonator laserowy, justowałem wnękę rezonansową, uzyskałem akcję laserową a następnie drugą harmoniczną lasera Nd^{3+} na 532 nm.

W swojej pracy doktorskiej pt. ***Właściwości spektroskopowe i laserowe jonów iterbu w matrycach krystalicznych i szklanych*** realizowanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Wisław Stręka w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych, Polskiej Akademii Nauk zajmowałem się właściwościami spektroskopowymi kryształów oraz szkieł domieszkowanych i współ-domieszkowanych jonami Yb^{3+}, a także konstruowałem i badałem lasery na domieszkowanych jonami Yb^{3+} kryształach pompowane diodami laserowymi. W ramach swojej pracy doktorskiej rozwinąłem swoją widzę spektroskopową, poznałem i zastosowałem do swoich badań analizę Judd-Ofelta, modele i sposoby interpretacji czasów zaniku luminescencji, analizę zależności intensywności emisji anty-Stoksowskiej od mocy pobudzenia, a także skonstruowałem kilka laserów na ciele stałym i przebadałem ich właściwości. Badania prowadziłem głównie nad wolframianami $KY(WO_4)_2$ współ-domieszkowanymi jonami Yb^{3+} i Eu^{3+}, Yb^{3+} i Tb^{3+} oraz Yb^{3+} i Pr^{3+}, w których zademonstrowaliśmy i analizowaliśmy mechanizmy konwersji energii w górę. Szczególnie ciekawe były układy nierezonansowe Yb/Eu i Yb/Tb, które badaliśmy jako jedni z pierwszych, wykazując obecność efektów kooperatywnego oddziaływania między jonami współdomieszek. W pracy zajmowałem się również proszkami, szkłami i ceramikami YAG, które były współdomieszkowane jonami Yb^{3+} i Nd^{3+}.

Dodatkowo poszerzyłem swoją wiedzą teoretyczną i praktyczną na temat konstrukcji laserów. Skonstruowałem i przebadałem szereg laserów takich jak Yb:KGW, Yb"KYW, Yb:YAG, KYbW. Materiały te przeanalizowałem również pod kątem możliwości uzyskania, modnego wówczas, chłodzenia laserowego. Większość badań wykonałem w INTiBS PAN, eksperymenty laserowe wykonałem podczas wyjazdów badawczych w Ben Gurion University, Izrael oraz w Instytucie Fizyki Białoruskiej Akademii Nauk. Wyniki opublikowano w 7 artykułach z listy Filadelfijskiej i przedstawiono na 4 międzynarodowych konferencjach.

4b Spis publikacji przed obroną doktoratu

2003

1. On spectroscopic properties of the $KYb(WO_4)_2$: Pr^{3+} crystal, P.Deren, **A.Bednarkiewicz**, R.Mahiou i W.Strek, Molecular Physics, **101**(7), (2003) 951-960
2. Hot Emission in Nd^{3+}/Yb^{3+}:YAG nanocrystalline ceramics, **A.Bednarkiewicz**, D.Hreniak, P.Dereń i W.Stręk, J.Lumin. **102-103**, (2003) 438-444 **K**
3. Cooperative processes in Nd^{3+}/Yb^{3+} co-doped YAG nanocrystallites, **A. Bednarkiewicz**, D. Hreniak, W. Strek, Radiation Effects And Defects In Solids **158** (1-6) (2003) 31-37 **K**

...-2002

4. Laser-induced hot emission in Nd^{3+}/Yb^{3+}:YAG nanocrystallite ceramics, **A. Bednarkiewicz** i W. Strek, J. Phys. D: Appl. Phys. **35**(20), (2002) 2503-2507
5. Power dependence of luminescence of Tb^{3+} doped $KYb(WO_4)_2$ crystal, W. Strek, **A. Bednarkiewicz** i P. J. Deren, Journal of Luminescence, 92(3), (2001) 229-235
6. Cooperative processes in $KYb(WO_4)_2$ crystal doped with Eu^{3+} and Tb^{3+} ions, W. Strek, P. Deren i **A. Bednarkiewicz**, Journal of Luminescence, 87-89, (2000) 999-1001 **K**
7. Efficient up-conversion in $KYb_{0.8}Eu_{0.2}(WO_4)_2$ crystal, W. Strek, P. J. Deren, **A. Bednarkiewicz**, Y. Kalisky i P. Boulanger, Journal of Alloys and Compounds, 300-301, (2000) 180-183 **K**
8. Laser operation and Raman self-frequency conversion in Yb : KYW microchip laser A.S.Grabtchikov, A.N.Kuzmin, V.A.Lisinetskii, V.A.Orlovich, A.A.Demidovich, M.B.Danailov, H.J.Eichler, **A. Bednarkiewicz** W.Strek, A.N.Titov Applied Physics B-Lasers And Optics **75** (6-7), (2002) 795-797
9. Up-conversion in $KYb(WO_4)_2$: Pr^{3+} crystal, P.J.Deren, R.Mahiou, W.Strek, **A. Bednarkiewicz**, G.Bertrand; Optical Materials **19** (1) 2002, 145-148 K
10. Spectroscopic studies of chromium-doped silica sol-gel glasses, W.Strek, P.Deren, E. Lukowiak, **A. Bednarkiewicz** et al. Source: Journal Of Non-Crystalline Solids **288 (**1-3) (2001) 56-65
11. Spectroscopic studies of samarium doped CdF2 crystal L.Bryja, R.Kudrawiec, J.Misiewicz, W.Strek, P.Deren, **A. Bednarkiewicz,** Journal Of Alloys And Compounds **300** (2000), 230-233 **K**
12. Emission properties of nanostructured Eu^{3+} doped zinc aluminate spinels, W.Strek, P.Deren, A.Bednarkiewicz, et al. Journal Of Alloys And Compounds **300** (2000) 456-458 **K**
13. Optical properties of Nd^{3+}-doped silica fibers obtained by sol-gel method, W.Strek, E.Pawlik, P.Deren, et al. A.Bednarkiewicz, et al. Journal Of Alloys And Compounds **300** (2000) 459-463 **K**

Publikacje spoza listy Filadelfijskiej:

1. Oddziaływanie światła laserowego z tkanką, **A. Bednarkiewicz** i W.Strek, w *Fotodynamiczna Diagnostyka i Terapia* " ed. H.Podbielska, A.Sieron and W.Strek, (PL) Urban&Partner 2003, 33-88
2. In vitro human atherosclerotic plaque recognition by photosensitizer mono-L-aspartyl chlorin e6 Assisted Light Induced Fluorescence (PALIF) D. Bialy, A. Derkacz, M. Wawrzynska, **A. Bednarkiewicz** et al. Laser Technology Vii: Applications Of Lasers Book Series: Proceedings Of The Society Of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) 5229 (2003) 127-131 **K**
3. In vitro photodynamic diagnosis of coronary artery atherosclerosis D.Bialy, A.Derkacz, M. Wawrzynska, **A. Bednarkiewicz** i W. Strek, Frontiers In Coronary Artery Disease, (2003) 115-119, **K**
4. In vitro photodynamic diagnosis of atherosclerotic wall changes with use of mono-l-aspartyl chlorin e6, D. Bialy, A. Derkacz, M. Wawrzynska, **A. Bednarkiewicz**, P. Ziolkowski, H. Nowosad, W. Strek, Polish Cardiology, 23 (2002) 175-178
5. Medium power ytterbium lasers, **A. Bednarkiewicz**, J. Kalisky, W. Stręk, *Proc.* SPIE Vol. 5230(2003) 139-142, Laser Technology VII: Progress in Lasers; Wieslaw L. Wolinski, Zdzislaw Jankiewicz, Ryszard S. Romaniuk; Eds.
6. Comparison of CW and Q-switched laser action in Yb-doped KYW and KGdW crystals, **A.Bednarkiewicz**, A.Kuzmin, W.Strek, et al. Laser Technology Vii: Progress In Lasers Book Series: Proceedings Of The Society Of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) **5230, (**2003) 127-131
7. In vitro photodynamic diagnosis of atherosclerotic wall changes with use of mono-l-aspartyl chlorin e6, D.Bialy, A.Derkacz, M.Wawrzynska, **A.Bednarkiewicz**, W.Strek European Heart Journal **23** (2002) 175-175 **K**
8. Yb : KYW microchip laser performance: fundamental frequency generation and Raman self-frequency conversion A.S.Grabtchikov, A.Kuzmin, V.A.Lisinetskii et al., Advanced Solid-State Lasers, Proceedings Book Series: Osa Trends In Optics And Photonics **68**, (2002) 394-396

4c Praca naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Pod koniec doktoratu zainteresowałem się nanoluminoforami i ich właściwościami spektroskopowymi. Pierwsze doniesienia literaturowe sugerowały odmienne cechy fizykochemiczne w porównaniu do ich mono- czy też mikro-krystalicznych odpowiedników. Po doktoracie nawiązałem współpracę z dr Mirosławem Karbowiakiem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, który zatrudnił mnie do realizacji swojego grantu badawczego dotyczącego syntezy i badania właściwości nanomateriałów domieszkowanych jonami lantanowców. Na potrzeby realizacji tego projektu wykonywałem pomiary i interpretacje właściwości spektroskopowych m.in. fluorków typu $(Na,K)GdF_4$. Równocześnie badałem tlenkowe nanomateriały luminescencyjne w zespole Prof. dr hab. Wiesława Stręka. Te pierwsze prace zdeterminowały moje zainteresowania naukowe w kolejnych latach i stanowią podstawę mojego wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Drugim wątkiem, który przewija się w moich zainteresowaniach naukowych zarówno przed jak i po obronie pracy doktorskiej, jest oddziaływanie światła z materią żywą, a także wykorzystanie zjawisk luminescencji w naukach biologicznych i medycynie. Owocem tych dosyć chaotycznych wówczas badań, było kilka tematów badawczych realizowanych z panią prof. dr hab. Haliną Podbielską (PWr Wrocław, biofizyk), dr hab. Zuzanną Drulis-Kawą (UWr Wrocław, mikrobiolog), dr n.med Dariuszem Białym (AM, Wrocław, kardiolog), prof. dr hab. Piotrem Ziółkowskim (AM,Wrocław, histopatolog) czy też dr inż. Jarosławem Jarońskim (PWr, MediCom Sp.J.). Prace o wykrywaniu płytki sklerotycznej w naczyniach krwionośnych, oddziaływaniu światła z tkankami, nie-onkologicznych zastosowaniach terapii fotodynamicznej, fotodynamicznej terapii antybakteryjnej, fotodynamicznej terapii nowotworów skóry, konstrukcji sond światłowodowych do dozymetrii światła w terapii fotodynamicznej, które powstawały w latach 2002-2005 mocno mnie zaangażowały i zaintrygowały. Mimo wielu przeciwności związanych z brakiem dedykowanej aparatury pomiarowej czy też koniecznością żmudnego wypracowywania metod eksperymentalnych, pomiarowych i analitycznych, tematyka bio-spektroskopii stawała mi się coraz bliższa. W związku z tym postanowiłem poszukać stażu po-doktorskiego, w którym mógłbym zrealizować swoje pasje naukowe. Jesienią 2005 rozpocząłem staż w ramach stypendium Mari Curie w Joint Research Center (JRC) Komisji Europejskiej w Institute of Health and Consumer Protection (IHCP), Ispra, Włochy w grupie profesora Maurica Whelan'a. Tematyką, którą zajmowałem się przez 3 lata były alternatywne metody monitorowania toksyczności, obrazowanie typer-spektralne i obrazowanie czasów, a także analiza globalna i przestrzennie modulowana terapia fotodynamiczna.

Nowe, alternatywne do testów na zwierzętach, metody badania cytotoksyczności związków chemicznych. Wykorzystano do tego celu fluorescencję endogennych chromoforów tkankowych uczestniczących w metabolizmie komórkowym, tj. NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) oraz FAD^+ (Flavin Adenine Dinucleotide). Zredukowana forma NADH bierze udział w reakcjach redox komórek dostarczając elektronów do wielu reakcji biochemicznych. Obecność NADH w cyklu Krebsa odgrywa również istotną rolę w regulacji procesów apoptozy czy syntezy ATP. Flawiny FAD są również niezmiernie istotne w cyklu fosforylacji oksydacyjnej i produkcji ATP. Udało się zademonstrować, że autofluorescencja tych związków oraz wyznaczony w ten sposób potencjał redox komórek, pozwala w sposób ilościowy mierzyć toksyczność zaaplikowanych związków. Wykazano również, że w zależności od rodzaju użytej toksyny, kinetyczne profile potencjału redox różniły się. Przykładowo, substancja odpowiedzialne za degradację błon komórkowych (np.SLS), dawała inny charakter zmian krzywych koncentracyjnych (ang. dose response curves), niż zachowanie (np. stromość, charakter zmian itp.) związków uszkadzających DNA. Prace te zaowocowały dwoma publikacjami w *Toxicology In Vitro* (IF=2.77) i *Pancreas* (IF=2.39).

Nowe metody bio-pomiarowe – wiele procesów biologicznych bada się za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, która umożliwia poznanie nie tylko morfologii, ale i funkcjonowania żywych komórek i organizmów. Stosowane w tym celu barwniki organiczne dobiera się tak, by w sposób specyficzny reagowały na określony substrat np. pH, lipidy, jony Ca^+ itp., czy też polarność ośrodka. Dystrybucję tych substratów mierzy się mapując określone cechy spektroskopowe, np. intensywność pasma emisji lub też stosunek intensywności dwóch pasm emisji. Ze względu na obecność sygnału tła korzystnie jest mierzyć albo pełne widma fluorescencji albo, ze względu na heterogeniczny charakter próbek biologicznych, czasy zaniku fluorescencji. Uzyskane w ten sposób obrazy hyper-spektralne (ang. Hyper Spectral Imaging- HSI) oraz obrazy czasów zaniku fluorescencji (ang. Fluorescence Lifetime Imaging – FLIM) uzyskuje się zwykle za pomocą drogich i złożonych mikroskopów konfokalnych. W ramach mojego zadania, zbudowałem na bazie odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego system do rejestracji obrazów HSI i FLIM, wykorzystując

(a) Przestrzenny modulator światła (ang. SLM – Spatial Light Modulator) w postaci projektora DMD (ang. Digital Micromirror Device),
(b) Ultrafioletowe piko-sekundowe źródła światła oraz
(c) Detektor w postaci miniaturowego spektrofotometru (dla HSI) lub fotopowielacza (dla FLIM) pracującego z przystawką do zliczania fotonów (TCSPC – ang.Time Correlated Single Photon Counting).

Przy tak dużej ilości danych pomiarowych, pojawia się również konieczność optymalizacji procedur analizy danych, gdyż każdy pixel zawiera informację o pełnym widmie luminescencji, lub kilkaset punktów pomiarowych intensywności w funkcji czasu po impulsie wzbudzającym. Ze względu na unikalne cechy projektora DMD, tj. możliwość równoczesnego oświetlania wielu punktów na próbce i brak limitu na czas pojedynczej akwizycji (ang. dwell time), możliwe było zaproponowanie i implementację algorytmu globalnego fitowania danych pomiarowych w oparciu o analizę składowej Hue obrazu z kamery kolorowej. Podejście to pozwoliło zaproponować algorytm, który pozwala przyspieszyć analizę dużych zbiorów danych. Badania te zaowocowały 2 publikacjami (*J.Biomedical Optics* IF=3.16, Applied Optics IF=1.75) oraz jednym patentem europejskim (P-2795/MF).

Opracowanie metody selekcji komórek wątrobowych z linii komórkowej będącej kokulturą komórek wątrobowych i biliarnych. Wprowadzenie nowych substancji chemicznych do powszechnego użytku wymaga zbadania toksyczności tych substancji. Celem tych testów jest badanie zarówno toksyczności pierwotnej jak i wtórnej. Przykładem toksyczności wtórnej jest powstawanie bardzo silnego utleniacza N-acetylo-4-benzo-chinonoiminy podczas metabolizowania paracetamolu w wątrobie przez cytochrom P450. O ile sam paracetamol jest powszechnie stosowanym lekiem przeciwbólowym o korzystnych właściwościach, po podaniu go w zbyt dużych dawkach zaburzeniu ulega gospodarka wolnorodnikowa w wątrobie, prowadząc do nieodwracalnego uszkodzenia hepatocytów. Badania toksyczności wtórnej są możliwe jedynie na zwierzętach, jednak na świecie trwają poszukiwania alternatywnych metod badania na liniach komórkowych. Jednym z przykładów są badania hepatotoksyczności na linii komórkowej HepaRG. Ta Linia komórkowa jest jednak bi-potentna, tzn. w wyniku namnażania się komórek powstają zarówno hepatocyty jak i komórki biliarne w niekontrolowanej proporcji jednych do drugich. Obecność komórek biliarnych istotnie utrudnia ilościową analizę toksyczności wtórnej. Stosowanie typowego sortowania komórek w fazie ciekłej jest jednak niemożliwe, gdyż w tych warunkach komórki ulegają de-dyferencjacji i po wysianiu powtórnie dzielą się na komórki hepatyczne i biliarne. Jedynym sposobem na pozbycie się komórek biliarnych jest ich usunięcie z dojrzałej hodowli komórkowej in-situ. Dokonano tego podając δ-ALA tj. kwas delta aminolwulinowy będący prekursorem protoporfiryny IX, znanego w terapii fotodynamicznej fotouczulacza. W celu selektywnego usunięcia komórek biliarnych, zmodyfikowałem fluorescencyjny mikroskop odwrócony montując przestrzenny modulator światła z lampą UV. Stworzony program pozwolił zarejestrować obraz hodowli komórkowej, w sposób automatyczny zidentyfikować obszary wzrostu komórek biliarnych, a następnie naświetlić te obszary odpowiednią dawką światła UV by aktywować proces fotodynamiczny. Uzyskano w ten sposób hodowle komórek

HapRG bez obecności komórek biliarnych. Badania te zaowocowały jedną publikacją w Journal of Biomedical Optics (IF=3.16).

Po powrocie do Polski zostałem powtórnie zatrudniony w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych, Polskiej Akademii Nauk na stanowisku adiunkta w zespole prof. dr hab. Wiesława Stręka. Prócz badań własnych, uczestniczę w badaniach prowadzonych przez grupę, a także pomagam kolegom z grupy w realizacji ich zadań badawczych (dr R. Wiglusz, dr D. Hreniak, dr hab. M. Mączka). Po moim powrocie do INTiBS w 2010 roku, powstało w ten sposób 8 prac [1,5,7,9,14,15,19,20 z Załącznika nr 2], a kolejne 3 są w recenzji. Prace te dotyczą spektroskopii nanomateriałów i ceramik domieszkowanych jonami lantanowców, m.in.:

- białej szeroko-spektralnej emisji światła wyniku konwersji energii w górę w domieszkowanych jonami Yb^{3+} lub Nd^{3+} czterofosforanach $LiLa_{1-x}(Yb/Nd)_xP_4O_{12}$ [1, 14, 15, 19];
- wykorzystania jonu Eu^{3+} jako sondy luminescencyjnej w nanokrystalicznych matrycach hydroksyapatytów [20], spineli $ZnAl_2O_4$ [7], wanadianów YVO_4 [9] oraz niskotemperaturowo syntezowanych $LaAlO_3$.

Równocześnie rozpocząłem starania by połączyć obie dyscypliny naukowe tj. syntezy i charakteryzację nanomateriałów luminescencyjnych z wiedzą inżynieryjną i bio-medyczną. Mimo dobrze ocenionych wniosków ale finalnie nieudanych próbach zdobycia finansowania (European Research Center (ERC) (2008) – rola: wnioskujący; „Dolnośląskie Centrum Badawcze Materiałów Funkcjonalnych i Biokompatybilnych" we Wrocławiu POIG.02.02.00-02-013/09 w 2009 – rola: koordynator) w roku 2010 uzyskałem dwa granty, w których badałem i badam różne aspekty związane z syntezami, funkcjonalizacją, spektroskopią i potencjałem wykorzystania nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców do diagnostyki bio-medycznej. W ramach grantu *Domieszkowane lantanowcami nanoluminofory jako sondy w bioczujnikach* (grant MNISW NN 507 58 49 38, 2010-2012), badałem podstawowe właściwości spektroskopowe nanoluminoforów domieszkowanych lantanowcami (np. bezpromienisty transfer FRET, przejścia nadczułe w jonach Ln^{3+}, struktury core-shell) pod kątem możliwości zastosowania ich jako elementów aktywnych w konstrukcji bioczujników. Również w 2010 roku mój pomysł wykorzystania sond luminescencyjnych w biologii został zakwalifikowany do finansowania przez Wrocławskie Centrum Badań EIT+ jako projekt pod nazwą Nanoparticle Assisted Molecular Imaging and Sensing. Projekt ten jest aktualnie w realizacji i od niedawna posiada laboratoria chemiczne i bio-spektroskopowe. W ramach badań, wraz z nowoutworzoną grupą rozwijam zainteresowania związane z obrazowaniem hyperspektralnym i obrazowaniem czasów życia, rozwijam również metody bezmaskowej fotolitografii oraz optymalizuję sprawność kwantową sond luminescencyjnych pod kątem wykrywania hybrydom produkujących przeciwciała monoklonalne. W związku z kierowaniem projektem jestem aktualnie promotorem pomocniczym dla trzech doktorantek.

4d Współpraca naukowa

Aktualnie, w związku z badaniami nad syntezą, optymalizacją właściwości spektroskopowych nanoluminoforów domieszkowanych lantanowcami i ich zastosowaniem w diagnostyce biomedycznej, prowadzę bardzo bliską współpracę z dwoma zespołami badawczymi we Wrocławiu:

- Zespół prof. dr hab. Andrzeja Gamiana (dr Jacek Rybka, dr Tomasz Lipiński, dr Jakub Siednienko) z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnych, Polskiej Akademii Nauk

- Zespół prof. dr hab. Marka Samocia (dr Marcin Nyk, mgr Dominika Wawrzyńczyk) z Wydziału Chemii Fizycznej i Teoretycznej, Politechniki Wrocławskiej

Moja obecna współpraca zagraniczna, w związku z względnie nową tematyką badawczą, dopiero się rozwija i aktualnie wiąże się z kontaktami naukowymi, przesłaniem próbek i planowaniem wspólnych badań z:

- Dr Daniel Jaque – Madrid University, Hiszpania,
- Prof. Tero Soukka – Turku University, Finlandia,
- Prof. John Cappobianco – Concordia University, Kanada,
- Prof. Kishan Dolakia - University of St Andrews, Wielka Brytania

Występuję również jako partner w konsorcjum naukowym *Photon upconverting luminescent nanomaterials*, które zostało zaproszone do II etapu selekcji grantów Europejskich COST, mających umożliwić swobodną współpracę między europejskimi naukowcami w najciekawszych i najbardziej obiecujących dyscyplinach naukowych.