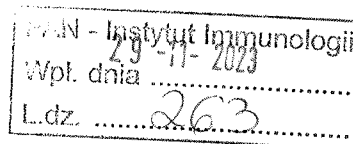




WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki



Łódź, 21.11.2023

Prof. dr hab. Antoni Różalski
Katedra Biologii Bakterii
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Michała Olk**

pt. „Synthesis and cytotoxicity of NaYF₄ nanoparticles coated in a layer of porous silica”

Rozprawa doktorska mgr Michała Olk powstała w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Andrzeja Gamiana oraz Promotora pomocniczego dr Katarzyny Prorok z Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu. Praca została wykonana w dwóch ww. jednostkach. Syntezę nanocząstek i ich pochodnych oraz ich badania chemiczne wykonano w INTiBS PAN, a badania cytotoksyczności tych produktów w IiTD PAN we Wrocławiu.

Celem pracy Doktoranta było uzyskanie zmodyfikowanych lantanowcami nanocząstek NaYF₄, opłaszczonych warstwą krzemionki, z zaadsorbowanym barwnikiem cyjaninowym IR-806 i zbadanie ich trwałości oraz cytotoksyczności.

Nanocząstki konwertujące energię w górę (zjawisko zwane up-konwersją), znajdują zastosowanie w różnych dziedzinach nauki i techniki, także w biologii i medycynie m.in. do diagnostyki i obrazowania oraz terapii fotodynamicznej. Nanocząstki domieszkowane lantanowcami charakteryzują się lepszymi właściwościami w tym względzie. Ich wykorzystanie w połączeniu z zastosowaniem ww. barwnika jako anteny pochłaniającej widmo bliskie podczerwieni, stwarza możliwości uzyskania lepszych znaczników luminescencyjnych, potrzebnych w badaniach biologicznych i medycznych. Mgr Michał Olk podjął się zadania uzyskania takich nanocząstek i zbadania ich właściwości, w tym cytotoksyczności. Ten niekorzystny efekt działania nanocząstek jest znany od dawna i próby uzyskania nanocząstek i pochodnych o mniejszej cytotoksyczności są warte zabiegów.

Mgr M. Olk materiał matrycowy zbudowany z NaYF₄ opłaszczył porowatą powłoką krzeminkową o różnej średnicy porów i grubości. Następnie zbadał na ile platforma ta może służyć jako podstawa skutecznie chroniąca barwnik cyjaninowy IR-806 przed degradacją chemiczną i pod wpływem światła. Barwnik ten może być stosowany jako antena molekularna do wytwarzania nanosąd. W kolejnym etapie pracy zajął się ustalaniem możliwości zastosowania *in vivo* nanocząstek NaYF₄ opłaszczonych krzemionką. Zbadał ich cytotoxycyżność na wybranych liniach komórkowych. Cele te zrealizowano w trzech zadaniach badawczych:

- 1) Syntezie pokrytych krzemionką nanocząstek β -NaYF₄: 2% Er³⁺, 20% Yb³⁺@ β -NaYF₄:30% Nd³⁺, 20% Yb³⁺,
- 2) Ocenie właściwości protekcyjnych powłoki krzemionkowej dla barwnika IR-806,
- 3) Badaniach cytotoxycyżności nanocząstek NaYF₄ powleczonych krzemionką z wykorzystaniem kultur tkankowych.

Oceniana rozprawa doktorska mgr M. Olk została napisana w języku angielskim. Ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich i składa się z następujących rozdziałów: Wstępu, Celu badań, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków i Literatury. Rozdziały te uzupełniają Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów oraz Spisy rycin i tabel.

W obszernym Wstępie Autor przedstawił proces up-konwersji i historię jego badań, ilustrując struktury - kubiczną i heksagonalną oraz tę ostatnią z wymienionych z naniesioną powłoką z lantanowcami. W dalszej części Wstępu Mgr M. Olk przedstawił modyfikację nanocząstek NaYF₄ m.in. zastąpienie kwasu oleinowego przez ligand o różnej strukturze i właściwościach; opłaszczenie powierzchni nanocząstki z kwasem oleinowym przez naniesienie innej amfifilnej cząsteczki, co daje podwójną warstwę; utlenienie powierzchniowego kwasu oleinowego; usunięcie kwasu oleinowego; modyfikację powierzchni nanocząstki przez jej opłaszczenie obojętnym lub kwaśnym polimerem, po usunięciu kwasu oleinowego; zastosowanie metody „layer-by-layer assembly” tj. przez naniesienie dwóch warstw opłaszczających o różnych ładunku; związanie przez kwas oleinowy makrocyklicznych cząstek np. cyklodekstryn jako elementów układów „host-guest” (gospodarz-gość) funkcjonującego w układach biologicznych i przyłączenie do nich ligandów z hydrofobowymi lub aromatycznymi pieścieniami; silinizację tj. opłaszczenie warstwą krzemionki. W kolejnym fragmencie Wstępu Autor wymienił możliwe wykorzystanie nanocząstek konwertujących energię w górę. Mogą być wykorzystane: jako bioczujniki, do ujawniania i śledzenia zmian w komórkach i tkankach oraz biomolekuł, do dostarczania

leków i molekuł, w terapii fotodynamicznej oraz optogenetyce, gdzie zmodyfikowana nanocząstka up-konwertująca odgrywa rolę induktora światłoczułego białka, tworzącego kanał jonowy w błonie cytoplazmatycznej komórki, do której uprzednio wprowadzono gen kodujący to białko. We Wstępie przedstawiono też zagadnienie wzmocnienia właściwości luminescencyjnych nanocząstek barwnikiem uczulającym oraz możliwości wykorzystania tego zjawiska. W literaturze jest często podnoszony problem cytotoksyczności i szkodliwych skutków ubocznych stosowania up-konwertujących nanocząstek. To ogranicza wdrażanie zastosowania takich produktów w medycynie. Zagadnienie to również podnosi Doktorant w części teoretycznej pracy. Pisze o procesach absorpcji nanocząstek przez komórki, o ich dystrybucji w organizmie i akumulacji w tkankach. Mgr M. Olk zwraca też uwagę na zjawisko apoptozy, które należy uwzględnić w badaniach nanocząstek, bowiem zjawisko ich endocytozy zależnej od kaweolin i klatryn jest powiązane ze szlakami apoptycznymi.

Przeгляд informacji zaprezentowanych we Wstępie świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta do podjętych badań doświadczalnych. Wykazał się dobrą znajomością literatury, przedstawiając kompleksowo metody otrzymywania i modyfikacji nanocząstek konwertujących energię w górę, a także możliwości ich zastosowania oraz ograniczeń w tym zakresie, wynikających z ich cytotoksyczności i innych działań wobec makroorganizmu.

W pracy doktorskiej wykorzystano techniki adekwatne do realizacji postawionych celów badawczych. Nanocząstki NaYF_4 otrzymano na drodze termicznej dekompozycji (termolizy) i modyfikacji powierzchni przez wprowadzenie lantanowców. Uzyskano nanocząstki $\beta\text{-NaYF}_4: 2\%\text{Er}^{3+}, 20\% \text{Yb}^{3+}@\beta\text{-NaFY}_4:30\%\text{Nd}^{3+}, 20\% \text{Yb}^{3+}$, które pokryto warstwą krzemionki. Warstwa ta miała pełnić rolę ochronną dla barwnika IR-806 zaadsorbowanego do powierzchni kompleksu nanocząstki z krzemionką. Zbadano stabilność tego kompleksu w czasie, wpływu UV oraz zapobieganie utlenianiu IR-806 przez działanie nadtlenu wodoru. Porównano działanie tych czynników na IR-806 związany z nanocząstkami oraz w pozostały w roztworze wodnym. Cytotoksyczność otrzymanych produktów badano posługując się liniami komórkowymi: THP-1 (linia komórek monocytarno-makrofagowych), MDA-MB-231 (linii ludzkiego gruczolaka piersi), A375 (ludzka linia komórkowa nowotworu skóry) i SKOV (linia komórkowa ludzkiego raka jajnika). Linie komórkowe uzyskano z macierzystego instytutu. W badaniach zastosowano test MTT i cytometrię przepływową.

Przeprowadzono 194 syntezy nanocząstek, 21 jeden syntez uznano za udane. Otrzymane nanocząstki z osadzonym na nich barwnikiem IR-806 były badane pod kątem ich

stabilności w czasie 2, 6 i 13 dni. Porównano stabilność barwnika w tych warunkach w roztworze. Ustalono, iż po dwóch tygodniach 21% optycznie aktywnego barwnika IR-806 pozostało w roztworze, podczas gdy 74% barwnika było związane z krzemionką. 7-miesięczny okres przechowywania nanocząstek w ciemni pokazał podobną zależność, 16% barwnika osadzonego na krzemionce wykazywało aktywność, podczas gdy barwnik w roztworze praktycznie uległ degradacji. Mgr M. Olk badał fotostabilność uzyskanych produktów po ich ekspozycji na działanie światła w zakresie UV o długości fali 254 i 366 nm w czasie 20, 60, 120 i 200 minut. Wykazał, iż po 200 min. naświetlania, barwnik IR-806 w wodzie w całości uległ degradacji, natomiast w tych warunkach 27% cząsteczek barwnika związanego z krzemionką degradacji nie uległo. Inaczej było z wpływem H_2O_2 na badane produkty. Wykazano, iż powłoka krzemionkowa nie chroni barwnika IR-806 przed działaniem nadtlenu wodoru. Barwnik w formie wolnej oraz związanej był w jednakowym stopniu degradowany. Badaniami cytotoksyczności objęto nanocząstki $NaYF_4$ pokryte krzemionką o różnej wielkości, nanokryształy $NaYF_4$ z usuniętymi ligandami oleinowymi oraz nanocząstki bez otoczki krzemionkowej. W analizach użyto je w stężeniach w zakresie 20-200 $\mu g/ml$. Wykazano działanie proliferacyjne nanocząstek $NaYF_4$ i tych produktów modyfikowanych lantanowcami w stosunku do linii THP-1. Takiego efektu nie zaobserwowano w badaniach na liniach MDA-MB-231. Nanocząstki opłaszczane krzemionką o grubości 55 nm okazały się być cytotoksyczne. Żywotność komórek linii THP-1 w hodowli po stymulacji takimi nanocząstkami spadła do odpowiednio 16% i 49 % dla linii THP-1 i MDA-MB-23, w porównaniu do kontroli. Takiego efektu nie obserwowano, kiedy badano komórki stymulowane nanocząstkami o grubości 96 nm. Nie wykazano też dodatkowego efektu cytotoksycznego preparatów nanocząstek z barwnikiem IR-806 osadzonym na krzemionce. Wyniki analizy cytometrycznej potwierdziły wyniki badań cytotoksycznych wyżej przedstawionych. Nanocząstki $NaYF_4$ o grubości 55 nm pokryte krzemionką były zdolne indukować apoptozę już po 24 godzinach inkubacji z linią THP-1, co pogłębiło się po dłuższej inkubacji w okresie do 48 godzin. Doktorant konkluduje tę obserwację sugestią, iż jest przedział wielkości nanocząstek w zakresie którego, są one wysoce cytotoksyczne lub charakteryzują się mniejszą cytotoksycznością. W dyskusji określa tę wielkość na 50 nm.

Dyskusja wyników jest krótka, ale uwzględnia najważniejsze problemy związane z realizacją rozprawy doktorskiej i otrzymanych wyników. Wnioski znajdują potwierdzenie w uzyskanych danych. Bibliografia bogata, zestawienie literatury w liczbie 256 pozycji obejmuje najnowsze publikacje, które zostały zacytowane właściwie.

Otrzymane przez mgr M. Olk dane znacząco wzbogacają naszą wiedzę nie tylko o nanocząstkach jako takich, sposobach ich modyfikacji i analizie, ale przede wszystkim problemach ich wykorzystania w szeroko rozumianych badaniach biologicznych, czy w praktyce w medycynie. Poniżej uwaga i pytania do Doktoranta.

1. Niektóre sformułowania w Streszczeniu w języku polskim są niezbyt zręczne (str. 7: „...metody takie mikroskopie i spektroskopie są jednymi z najbardziej popularnych technik”; „...nanocząstki...stały się przedmiotem intensywnych badań w ciągle rozwijającym się polu poszukiwań”; str. 10: „eksperymenty sugerują”). Oczywiście praca jest przygotowana w języku angielskim, moja uwaga więc nie powinna być odebrana jako poważny zarzut.
2. Stabilność nanocząstek sprawdzano w czasie 2, 6, 13 dni i po 7 miesiącach. Dlaczego wybrano takie przedziały czasowe badań, czy wynika to z danych literaturowych ?
3. W Dyskusji Autor wskazuje na potrzebę dalszych badań nanocząstek. Badania miałyby na celu opracowanie bardziej efektywnej metody syntezy nanocząstek, czy wyjaśnienia mechanizmów zaangażowanych w ich cytotoksyczność oraz uzyskania takich produktów, które mogłyby być wykorzystane w diagnostyce, czy terapii. Proszę o informację czy Doktorant będzie prowadził takie badania i jeśli, to jakim kierunku kontynuacja badań będzie przebiegała.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Michała Olk pt. „Synthesis and cytotoxicity of NaYF₄ nanoparticles coated in a layer of porous silica” spełnia warunki określne w art. 187 ust.1-4 Ustawy „Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce” (Dz.U. 2018, poz 1668z późn. zm) i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Antoni Poświatki

