

Katedra i Zakład Biochemii
Wydział Nauk Medycznych w
Zabrze
41-808 Zabrze ul. Jordana 19
www.sum.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Michał Olk

„Synthesis and Cytotoxicity of NaYF₄ Nanoparticles Coated in a Layer of Porous Silica

Synteza i cytotoksyczność nanocząstek NaYF₄ pokrytych warstwą porowatej krzemionki

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Gamian

dr hab. n. med. Ewa Romuk,
prof. SUM tel.: (608444688)
eromuk@sum.edu.pl

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 272 23 18
fax: (+48 32) 272 23 18

biochemz@sum.edu.pl

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest pracą badawczo-eksperymentalną, w której Doktorant podjął się prób syntezy i oceny cytotoksyczności nanokryształów NaYF₄ domieszkowanych jonami erbu, iterbu i neodymu. Szerokie możliwości zastosowania nanocząstek ze zmodyfikowaną powierzchnią w różnorodnych badaniach biologicznych, między innymi w obrazowaniu, detekcji związków, śledzeniu dynamiki procesów biologicznych, transporcie leków i innych cząsteczek chemicznych, terapii fotodynamicznej i optogenetyce przemawiają za koniecznością prowadzenia szeroko zakrojonych badań w tym kierunku. Nanocząstki konwertujące energię wzbudzenia w górę (ang. upconverting nanoparticles, UCNPs), domieszkowane jonami lantanowców są przedmiotem intensywnych badań gdyż stanowią interesującą alternatywę dla obecnie stosowanych metod obrazowania oraz detekcji struktur biologicznych. Nanocząstki NaYF₄ mogłyby zastąpić klasyczne znaczniki takie jak związki organiczne czy białka fluorescencyjne ze względu na możliwość wzbudzania w głębszych fragmentach tkanki, niższy szum tła i wyższą stabilność.

Możliwości przenikania nawet 90% sygnału do tkanki na głębokość 2 centymetrów i więcej wysoko pozycjonuje wykorzystanie znaczników UC w rankingu metod obrazowania całego ciała. Przedstawione przez Doktoranta wyniki badań wytyczają

kierunek dalszych poszukiwań w zakresie nanocząstek konwertujących energię wzbudzenia w górę.

Konieczność prowadzenia szeroko zakrojonych badań w kwestii zastosowania nanocząstek NaYF_4 jest warunkowana doniesieniami o ich cytotoksyczności i innych potencjalnie szkodliwych efektach ubocznych. Praca jest odpowiedzią na wiele niewiadomych i wątpliwości związanych z wykorzystaniem nanocząstek UC.

Charakterystyka ogólna pracy

Rozprawa liczy 105 stron i składa się następujących rozdziałów: streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celów pracy, materiałów i metodyki badań, wyników, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa. Wszystkie istotne wyniki i przebieg eksperymentu autor przedstawił na 48 rycinach i wykresach. Wykaz skrótów na początku rozprawy ułatwia jej czytanie. Praca jest przejrzysta i starannie sformatowana.

Doktorant wnikliwie i szczegółowo wprowadza czytelnika w podjęty temat badawczy. Rozdział – Wstęp - stanowi bardzo ciekawe i wyczerpujące opracowanie, które może być wykorzystane do napisania pracy pogładowej. Doktorant dogłębnie analizuje rozległy i złożony temat wykorzystania nanocząstek konwertujące energię wzbudzenia w górę (ang. upconverting nanoparticles, UCNPs), domieszkowanych jonami lantanowców. Podjęty przez doktoranta temat wpisuje się w intensywnie rozwijający się trend poszukiwania nowych i wydajnych metod obrazowania oraz detekcji struktur biologicznych. Nanocząstki NaYF_4 mają jednak istotną wadę w postaci niskiej wydajności kwantowej. Wzbudzenie w widmie IR wymaga intensywnego źródła tego światła. Rozwiązaniem problemu wydaje się być zastosowanie tak zwanych powierzchniowych anten uczulających, które pochłaniając promieniowanie IR, przekazują energię bezpromieniście do nanocząstki. Ta dodatkowa energia zwiększa intensywność luminescencji. Cyjaninowe barwniki organiczne takie jak IR-806, lub kropki kwantowe nadają się do tej roli.

Założenia i cele badania zostały prawidłowo postawione i jasno sprecyzowane. Pierwszym celem była synteza nanocząstek NaYF_4 oraz płaszczka krzemionkowego na nanokryształach NaYF_4 o różnych właściwościach, takich jak różna średnica porów i grubość krzemionki. Drugim celem było badanie uzyskanej platformy jako potencjalnego systemu dostarczania cząsteczek docelowych poprzez ocenę skuteczności, z jaką krzemionka może

chronić lotny związek w postaci barwnika cyjaninowego IR-806 przed degradacją chemiczną i fotofizyczną. Trzecim, końcowym celem była ocena cytotoksyczności badanych nanocząstek na liniach komórkowych THP-1, MDA-MB-231 oraz A375.

Materiał i metody zostały opisane w sposób bardzo rzetelny i wyczerpujący. Różnorodność wykorzystanych w przeprowadzonym eksperymencie wysokospecjalistycznych technik laboratoryjnych świadczy o doskonałym opanowaniu warsztatu przez Doktoranta. Badania zostały przeprowadzone w ramach grantu SONATA 13 (2018/31/D/ST5/01328). W niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki wstępnych badań nad zasadnością zastosowania nanocząstek core@shell typu $\beta\text{-NaYF}_4\text{: Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ @ $\beta\text{-NaYF}_4\text{: Nd}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$, o wymiarach 55 nm i 96 nm, pokrytych warstwą porowatej krzemionki będącej platformą nośnikową dla potencjalnych środków terapeutycznych oraz wzmacniających luminescencję anten uczulających, takich jak wykorzystany przez Doktoranta związek IR-806.

Nanocząstki $\beta\text{-NaYF}_4\text{: 2% Er}^{3+}, 20\% \text{Yb}^{3+}$ @ $\beta\text{-NaYF}_4\text{: 30% Nd}^{3+}, 20\% \text{Yb}^{3+}$ o rozmiarze 28 nm, których syntezę przeprowadził zespół w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego PAN we Wrocławiu, zostały pokryte warstwą krzemionki poprzez zmodyfikowaną metodę Ströbera u podstaw której leży kondensacja krzemionki na drodze chemicznej degradacji prekursorowego związku TEOS w środowisku zasadowym.

Potencjalne właściwości ochronne powłoki krzemionkowej badano pod kątem trzech aspektów: ogólnej stabilności chemicznej IR-806 w czasie, stopnia degradacji pod wpływem działania światła poprzez naświetlanie promieniami UV o długości 254 i 366 nm, oceny skuteczności w zapobieganiu utleniania IR-806 przez nadtlenek wodoru jako przedstawiciela grupy reaktywnych form tlenu.

Do eksperymentów badających cytotoksyczność użyto komórek linii makrofagowo-podobnych THP-1, linii komórek nabłonkowo-podobnych MDA-MB-231 i nabłonkowo-podobnych komórek linii A375 od pacjenta z przerzutowym czerniakiem. Zastosowano nanocząstki NaYF_4 pokryte krzemionką o różnej grubości jak też nanokryształy NaYF_4 z usuniętymi ligandami kwasu oleinowego i bez otoczki krzemionkowej.

Wyniki i wyciągnięte na ich podstawie wnioski bardzo dobrze korespondują z założonymi celami pracy. Przedstawione w pracy zdjęcia i wykresy doskonale obrazują kolejne etapy przeprowadzonego eksperymentu. Doktorant wykazał, że płaszcz krzemionkowy chroni barwnik przed promieniowaniem UV lecz nie chroni przed substancjami reaktywnymi. Wykazał, że cząstki opłaszczane krzemionką o przekroju około 55 nm są cytotoksyczne, natomiast o większym przekroju, około 96 nm nie są cytotoksyczne, tak samo jak mniejsze cząstki ale bez płaszcza krzemionkowego. Nanocząstki NaYF₄ pokryte krzemionką o wielkości około 55 nm mogą nadawać się do zastosowań biologicznych. Te wyniki, wraz z danymi literaturowymi, sugerują istnienie przedziału wielkości nanocząstek w zakresie którego są one wysoce cytotoksyczne dla linii komórkowych. Uzyskane wyniki wskazują na zależność cytotoksyczności od wielkości nanocząstek z możliwością wzbudzenia w głębszych fragmentach tkanki.

Doktorant zrealizował założone cele pracy, a uzyskane wyniki i wyciągnięte na ich podstawie wnioski są bardzo interesujące. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa stanowi cenne opracowanie przyczyniające się do poszerzenia naszej wiedzy o nanocząstkach UC i stanowi kolejny cenny krok na drodze szerszego ich wykorzystania w medycynie. Należy podkreślić rzetelność i dokładność przeprowadzonych badań oraz wysoką jakość uzyskanych wyników. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska ma bardzo wysoką wartość poznawczą, a perspektywie duży potencjał aplikacyjny.

W dyskusji Doktorant omawia uzyskane wyniki w kontekście aktualnego piśmiennictwa. Doktorant dokładnie omawia wszystkie analizowane w pracy zagadnienia, wykazując się po raz kolejny znakomitą znajomością tematu. Konfrontuje swoje obserwacje z doniesieniami innych Autorów, podkreślając co jeszcze należałoby udoskonalić i w jakim kierunku prowadzić dalsze badania.

Piśmiennictwo obejmuje 256 pozycji, dobranych prawidłowo, obejmujących aktualne pozycje w poruszonym przez Doktoranta temacie. Należy podkreślić że 60% pozycji literaturowych stanowi aktualną literaturę pochodzącą z ostatnich dziesięciu lat.

Warto podkreślić, że Doktorant jest autorem publikacji w *Nanoscale Advances* (IF 5.598) i dwóch komunikatów jako pierwszy autor, na konferencjach zagranicznych.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja zawiera oryginalną i nowatorską koncepcję naukowo-badawczą. Doktorant bardzo dobrze opanował warsztat pracy eksperymentalnej, wykazał się bardzo dużą zdolnością posługiwania się różnorodnymi technikami laboratoryjnymi: metodami syntezy chemicznej, wytwarzaniem nanocząstek, metodami spektroskopowymi, mikroskopii elektronowej, technikami pracy z komórkami. Praca wymagała od Doktoranta bardzo szerokiej wiedzy, wnikliwości i poświęcenia ogromu czasu. Mam nadzieję, że będzie to wstęp do dalszych wytrwałych badań Pan mgr Michał Olka, które będą prezentowały podobnie wysoki poziom zaangażowania, rzetelności i dokładności jak przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska.

Przedstawiona praca w pełni odpowiada kryteriom stawianym przed kandydatami do stopnia doktora, spełnia warunki określone w art.187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.)

W związku z tym mam zaszczyt zwrócić się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk z wnioskiem o dopuszczenie mgr Michała Olka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorstwo uzyskanych wyników oraz złożoność i olbrzymi wkład pracy Doktoranta zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk z wnioskiem o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku

PROFESOR SUM BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Biochemii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach


dr hab. n. med. Ewa Romuk, prof. SUM



Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

WZROSTAJĄCY SIĘ WYKORZYSTANIE REZERWY
ENERGETYCZNEJ WYKORZYSTANIE REZERWY
ENERGETYCZNEJ WYKORZYSTANIE REZERWY

WZROSTAJĄCY SIĘ WYKORZYSTANIE REZERWY
ENERGETYCZNEJ WYKORZYSTANIE REZERWY