



**Łukasiewicz**

PORT  
Polski Ośrodek  
Rozwoju  
Technologii

dr hab. inż. Jakub Siednienko  
Zespół Badawczy Bioinżynierii

Wrocław dn. 21 grudnia 2023

## Ocena

### rozprawy doktorskiej mgr Michała Olka

#### pt. „Synteza i cytotoksyczność nanocząstek NaYF<sub>4</sub> pokrytych warstwą porowatej krzemionki.”

wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Andrzeja Gamiana oraz promotora pomocniczego dr Katarzyny Prorok

w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Celem naukowym, przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej Pana mgr Michała Olka, była synteza i charakterystyka właściwości fizykochemicznych oraz określenie stabilności nanomateriałów opłaszczonych krzemionką, opartych o jony pierwiastków ziem rzadkich oraz ocena ich toksycznego działania na wybrane linie komórkowe pod kątem określenia potencjalnego zastosowania w aplikacjach biologicznych i medycznych.

W tym aspekcie naukowcy szczególną nadzieję wiążą z zastosowaniem nanocząstek do obrazowania komórek i tkanek jako nośników leków, czy w celowanej terapii przeciwnowotworowej. Niestety, pomimo imponującej liczby przeprowadzanych badań w laboratoriach na całym świecie i nadal pojawiających się nowych doniesieniach naukowych, wciąż pozostaje wiele otwartych pytań. Nie posiadamy pełnej wiedzy na temat oddziaływań nanocząstek z materiałem biologicznym. Dotąd, nie zidentyfikowano wszystkich skutków ubocznych ekspozycji na nanocząstki, mechanizmów zaangażowanych w ich pobieranie przez komórki, a także mechanizmów ich usuwania z organizmu.

W tym świetle tematyka podjęta w niniejszej rozprawie doktorskiej odnosi się do zagadnień aktualnych i stanowi uzupełnienie najnowszych informacji współczesnej nanotechnologii.

Recenzowana rozprawa została napisana w języku angielskim, liczy 105 stron maszynopisu w układzie typowym dla rozpraw doktorskich i jest bardzo zwięzła. Doktorant cytuje 256 pozycji piśmiennictwa obejmującego również najnowsze doniesienia. Pracę poprzedza spis treści i poręczny wykaz stosowanych skrótów, choć nie zawiera on kilku skrótów wykorzystywanych w treści maszynopisu (np. PDT czy PS, który w tekście odnosi się zarówno do phosphatidylserine i photosensitizer). We wstępie Doktorant zwięźle wprowadza czytelnika

### Strona 1 z 3

w tematykę nanocząstek konwertujących energię w górę (UCNPs), następnie wyczerpująco opisuje wykorzystywane do modyfikacji powierzchni metody, a ich zrozumienie ułatwiają przygotowane przez doktoranta ryciny. W kolejnych rozdziałach autor przechodzi do opisu zastosowania nanocząstek konwertujących energię w górę do: bioobrazowania, biosensoryki, śledzenia dostarczania leków i cząsteczek, terapii fotodynamicznej oraz optogenetyki. Wstęp pracy zamyka rozbudowany rozdział dotyczący cytotoksyczności i biokompatybilności badanych przez Doktoranta nanocząstek NaYF<sub>4</sub>.

W dalszej części pracy Doktorant definiuje cel badań i jasno precyzuje trzy założenia badawcze. Rozdział „Materiały i metody” przedstawia procedury badawcze opisane w sposób rzetelny i wyczerpujący. Następujące po sobie rozdziały „Wyniki” i „Dyskusja” stanowią najistotniejszą część pracy, w której Doktorant przedstawił rezultaty przeprowadzonych eksperymentów, a następnie omawia je w Dyskusji w bardzo zwięzły sposób. Moim zdaniem w dyskusji zabrakło szerszej polemiki z licznie dostępnymi publikacjami naukowymi. Część merytoryczną pracy podsumowuje pięć wniosków, popartych wynikami przeprowadzonych eksperymentów.

Podsumowując ocenę formalną pracy – rozprawa została przygotowana starannie i rzetelnie (choć Doktorant nie ustrzegł się kilku pomyłek edytorskich i błędnie przywołanej ryciny 23 zamiast 26) i w pełni umożliwia zapoznanie się z warsztatem naukowym Doktoranta. Napisana jest poprawnym językiem naukowym, rzeczowo przedstawione są zagadnienia teoretyczne oraz wyniki badań.

Z uwagi na różnorodność właściwości chemiczne oraz fizyczne nanocząstek, w tym nanokryształów NaYF<sub>4</sub>, wymagają one indywidualnego podejścia dla określania ich wpływu na modelowe układy biologiczne, narządy czy całe organizmy. Kluczową rolę pełnią tu: skład chemiczny, rozmiar oraz modyfikacja powierzchni. Celem pracy podjętej przez Doktoranta było zbadanie zasadności wykorzystania nanocząstek core@shell typu  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>: Er<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> @  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>: Nd<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> do aplikacji biologicznych. Genezą podjętych eksperymentów były wcześniejsze badania dr Katarzyny Prorok z INTiBS PAN we Wrocławiu opisujące sposób syntezy badanych UCNP oraz ich charakterystykę. Do badań Doktorant wykorzystał nanocząstki o średnicy 55 i 96 nm pokryte porowatą krzemionką z antenami wzmacniającymi fluorescencję w postaci barwnika IR-806.

Potencjalne ochronne właściwości powłoki krzemionkowej zostały przebadane w trzech aspektach: 1) wpływu na ogólną stabilność chemiczną IR-806 w czasie, 2) degradację IR-806 pod wpływem promieniowania UV, 3) skuteczności w ochronie przed utlenianiem IR-806 przez nadtlenek wodoru. W dwóch pierwszych Doktorant potwierdził istotny wpływ powłoki krzemionkowej na hamowanie degradacji IR-806, powłoka nie chroniła natomiast przed chemiczną degradacją barwnika.

Następnie Doktorant skupił się na badaniach cytotoksyczności zmodyfikowanych nanocząstek NaYF<sub>4</sub> wykorzystując w tym celu ludzkie linie komórkowe: monocytarną - THP-1 oraz nabłonkową - MDA-MB-231 i A375. W oparciu o otrzymane wyniki potwierdzające zależność toksyczności badanych nanocząstek od ich rozmiaru Doktorant wysnuł wniosek, że zakres, skupiony wokół średnicy 55 nm NaYF<sub>4</sub> jest najbardziej toksyczny dla linii komórkowych, co powinno być uwzględniane podczas projektowania testów biologicznych.



Reasumując wyniki badań otrzymane przez Doktoranta, uważam, że cele badań wytyczone na wstępie pracy zostały zrealizowane, a otrzymane wyniki dostarczają wiedzy na temat nowych możliwości wykorzystania nanocząstek NaYF<sub>4</sub>.

Pomimo, iż wyniki zaprezentowane w pracy są przejrzyste, a ich rezultaty pozwoliły Doktorantowi na weryfikację sformułowanych w celu pracy hipotez badawczych lektura rozprawy nasunęła mi jednak następujące pytania:

1. W rozdziale materiały i metody, w sekcji „hodowle komórkowe” Doktorant opisuje standardowe warunki hodowli linii THP-1, następnie w sekcji „ocena cytotoksyczności” znajduje się informacja o różnicowaniu THP-1 (komórek monocytarnych) w kierunku makrofagów estrem forbolu (PMA). Nie ma na ten temat żadnej informacji w opisie badań cytometrycznych oraz w opisie wyników prezentujących zdjęcia z odwróconego mikroskopu świetlnego komórek THP-1 traktowanych UNCPs (str. 83). Rodzi się zatem pytanie, czy wszystkie komórki były różnicowane? Jeżeli nie, to zasadnym wydaje się pytanie czym spowodowane było takie zaplanowanie eksperymentów? Moim zdaniem pobudzone nieswoistym różnicowaniem w kierunku makrofagów i adherentne THP-1 mają inne właściwości pochłaniania cząstek niż spoczynkowe monocyty.

2. Drugie pytanie pozostaje w związku z punktem 1 i dotyczy obrazowania komórek po ekspozycji na nanocząstki. Z uwagi na właściwości fluorescencyjne badanych nanocząstek, dodatkowo obsadzonych barwnikiem IR-806 stosownym wydaje się zobrazowanie ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Dlaczego nie zaplanowano takich eksperymentów? Szczególnie interesujące wydaje się to w aspekcie adherentnych linii nabłonkowych A375 oraz MDA-MB-231

3. Ostatnie pytanie związane jest z wynikami analizy cytometrycznej aneksyny V w komórkach THP-1, wskazujących na zależność aktywacji szlaków apoptotycznych od rozmiaru nanocząstki. Z uwagi na fakt, że komórki THP-1 są komórkami stosunkowo małymi (średnica 2-10 µm) proszę o zaproponowanie hipotetycznych mechanizmów indukcji śmierci komórki po interakcji cząstki z powierzchnią komórki lub po jej wnikięciu do wnętrza komórki.

Powyższe pytania czy uwagi nie umniejszają w moim poczuciu dużej wartości przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej

W mojej ocenie, rozprawa doktorska Pana mgr Michała Olka spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 1-4 *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.).

Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgr Michała Olka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Jakub Siednienko

### Strona 3 z 3

