

Poznań 29.12.2018

Prof. dr hab. Anna Goździcka-JózefiakInstytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Wysokińskiej, zatytułowanej
Mechanizm toksyczności nanocząstek lantanowców wobec wybranych komórek układu odpornościowego,
wykonanej pod kierunkiem dra hab. Wojciecha Kałasa
w Laboratorium Immunologii Molekularnej Nowotworów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Nanomateriały ze względu na swoje unikatowe właściwości, jak wielkość nanocząstek, możliwości ich modyfikacji oraz właściwości biologiczne i fizykochemiczne znalazły zastosowanie w nanodiagnostyce, nanofarmakologii i nanoonkologii. Materiały te stosowane w celach biomedycznych, nie powinny być toksyczne dla organizmu oraz wywoływać odpowiedzi immunologicznych, natomiast winny być dobrze rozpuszczalne w płynach fizjologicznych, a po spełnieniu swojej funkcji – łatwo usuwane z organizmu. Skuteczność działania nanomateriałów zależy także od ich oddziaływania na komórki i struktury wewnątrzkomórkowe, szlaki przekazu sygnału w komórce, na co wpływa wielkość nanocząstek, potencjał elektrokinetyczny Zeta, czy materiał jakim są pokryte.

Szczególny typ nanocząstek stanowią nanocząstki up-konwertujące, wykazujące właściwości luminescencyjne i magnetyczne, stosowane w kontrastach w obrazowaniu struktur wnętrza organizmu metodą rezonansu magnetycznego (MRI), pozwalające na poprawę kontrastu i lepsze obrazowanie. Składnikiem powszechnie stosowanym w MRI jest gadolin, którego toksyczność względem komórek nie została do końca poznana. Ponadto, gadolin, jak również inne metale ziem rzadkich, jest szeroko wykorzystywany w przemyśle oraz w przedmiotach towarzyszących nam w życiu codziennym. Konsekwencje oddziaływania na organizm metali ziem rzadkich nie są do końca wiadome.

Dane zawarte w literaturze przedmiotu są sprzeczne i wskazują, że jony lantanowców nie są toksyczne dla komórek, z kolei inne sugerują, że mogą indukować zmiany w mitochondriach, zmieniać strukturę i przepuszczalność błony mitochondrialnej, powodować wzrost poziomu wolnych rodników, czy wpływ cytochromu. Zmiany te zależą od typu komórki oraz miejsca lokalizacji nanocząstek w komórce. Z powyższych względów cel badań wytyczony przez mgr inż. Edytę Wysokińską w recenzowanej pracy – zmierzający do poznania mechanizmu toksyczności nieopłaszczonych cząstek fluorku gadolinu domieszkowanego jonami lantanowców(erbu i iterbu) wobec wybranych komórek układu odpornościowego – uważam za słuszny i w pełni uzasadniony.

W badaniach Doktorantka wykorzystwała nanocząstki gadolinu domieszkowane erbem i iterbem o różnych rozmiarach i zbliżonej wartości potencjału Zeta, których toksyczność badała względem komórek pozyskanych z linii komórek ludzkich i mysich. Komórki ludzkie pochodziły z: promieloblastycznej komórki z krwi obwodowej (linia HL-60), mięśni gładkich aorty (linia TG/HA-VSMC), nabłonka żyły pępowinowej (linia HUVEC), białaczki monoblastycznej wyizolowanej z chłoniaka (linia U-937), ostrej białaczki monocytarnej wyizolowanej z krwi obwodowej (linia THP-1), ludzkich keratynocytów (linia CCD1106), ludzkich monocytów oraz z makrofagów pochodzących ze śledziony (linia MD), jak również z krwi obwodowej (linia S.C.). Stosowane w badaniach komórki mysie stanowiły mysie makrofagi i monocyty pochodzące z wodobrzusza (linia J774A.1 i RAW264.7) oraz mysie embrionalne fibroblasty (linia NIH3T3).

Pani mgr inż. Edyta Wysokińska do komórek hodowanych w odpowiednich mediach dodawała nanocząstki, gdzie następnie, po różnym czasie inkubacji, analizowała ich wnikanie do komórki, wpływ na żywotność komórek, proliferację, apoptozę, zmiany w strukturze błony komórkowej, aktywność kaspaz, odsetek komórek w sub-G1, zmiany w potencjale błonowym komórek oraz dokonała oceny stresu oksydacyjnego, określała liczbę mitochondriów i zmiany wewnątrzkomórkowego pH. Ponadto, z komórek traktowanych nanocząstkami izolowała białka i rozdzielała je za pomocą techniki elektroforezy. Białka po rozdzieleniu w żelu PAA przenosiła na błonę PVDF (poli(fluorku winylidenu), po czym identyfikowała z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciw białku Bax, Bcl-2, CHOP, LC3Bi.

W swoich badaniach Doktorantka wykorzystwała najnowsze metody badawcze, z zastosowaniem najnowszych technik mikroskopowych i cytometrii przepływowej, które zostały odpowiednio dobrane do wytyczonych celów badawczych. Wszystkie doświadczenia były starannie zaplanowane i konsekwentnie realizowane. Wyniki badań mgr inż. Edyta Wysokińska dokładnie udokumentowała oraz opracowała statystycznie.

Swoje badania Doktorantka rozpoczęła od analizy wpływu upkonwertujących nanocząstek gadolinu, domieszkowanych erbem i iterbem, na komórki z wybranych linii komórkowych: ludzkich monocytarno-makrofagowych S.C. i MD, mysich monocytarno-makrofagowych J774A.1 i RAW264.7, komórki pochodzące z białaczek ludzkich, komórki endotelialne (HUVEC), kerarynocyty (CCD 1106 KERTr), komórki mięśni gładkich aorty (TG/HA-VSMC) oraz fibroblasty mysie (NIH3T3). W badaniach stosowała sferyczne nieopłaszczane nanocząstki $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ o średnicy 3,5nm (S1) i 16,6nm (S2) oraz niesferyczne o średnicy 250nm i 103 nm (S3). Wszystkie nanocząstki miały również określoną średnicę hydrodynamiczną oraz potencjał Zeta.

Toksyczność nanocząstek względem komórek pochodzących z różnych linii komórkowych Doktorantka badała, określając aktywność mitochondrialnych dehydrogenaz, stosując test MTS oparty na zdolności dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania pomarańczowej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (MTT lub MTS) do formazanu, będącego kolorowym produktem powyższej reakcji. Wyniki tych badań wykazały, że stosowane w badaniach nanocząstki gadolinu w różnych stężeniach (od 1 ug/ml do 100 ug/ml) nie są toksyczne dla większości badanych komórek, natomiast są toksyczne dla mysich makrofagów w linii: RAW264.7 i J774A.1. w granicach stężeń od 1 ug/ml do 4,02 ug/ml. Ponadto, toksyczność nanocząstek była odwrotnie proporcjonalna do ich wielkości.

Na podstawie wyników tych analiz Doktorantka do dalszych badań nad mechanizmem toksyczności nanocząstek gadolinu domieszkowanych erbem i iterbem wybrała przede wszystkim komórki mysich makrofagów RAW 264.7 i J774A.1, dla których nanocząstki okazały się najbardziej toksyczne. Następnie Pani mgr inż. Edyta Wysokińska

ska wykazała, że za obserwowaną toksyczność nanocząstek gadolinu nie są odpowiedzialne jony gadolinu i fluoru, które mogą być z nich uwalniane, jak również rozpuszczalniki użyte podczas ich syntezy. Kolejne badania przeprowadzone przez Doktorantkę z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego i fluorescencyjnego wykazały, że badane cząstki gadolinu domieszkowane erbem i iterbem w komórkach mysich makrofagów J774A.1 i RAW 264.7. lokalizowały się w pobliżu błony komórkowej oraz wewnątrz komórki, natomiast nanocząstki S2 i S3 wnikały do komórki, ale nie lokalizowały się w jądrze komórkowym. Podobnie nanocząstki te lokalizowały się w keratynocytach oraz komórkach śródbłonna, które nie były dla tych komórek toksyczne, ale nie wnikały do komórek S.C. Wyniki tych badań zostały przedstawione na zdjęciach wykonanych skaningowym mikroskopem elektronowym przy napięciu 10kV i 30kV lub fluorescencyjnym.

Pod wpływem nanocząstek zawartych w komórkach mysich makrofagów Doktorantka stwierdziła wzrost zakwaszenia w lizosomach, zależnego od rodzaju nanocząstek (najwyższe dla S1 i podobne dla S2 oraz S3), jak też czasu inkubacji, które zdaniem Doktorantki mogły być przyczyną obserwowanych zmian cytotoksycznych w badanych komórkach. Potwierdzenie tej sugestii stanowiły wyniki badań Doktorantki, w których komórki przed ekspozycją na nanocząstki były inkubowane z Bafilomycyną A1 (BA1), inhibitorem wakuolarniej H⁺ATPazy lub lizosomotropową zasadą – chlorkiem amonu. W komórkach takich mgr inż. Edyta Wysokińska stwierdziła redukcję cytotoksyczności pod wpływem nanocząstek S1, jak również spadek apoptozy. W badanych komórkach Doktorantka nie obserwowała natomiast zmian w poziomie białka CHOP, po 6 godzinach ich inkubacji z nanocząsteczkami. Białko to jest jednym z markerów stresu w retikulum endoplazmatycznym. Badane nanocząstki powodowały wzrost ilości anionodnika ponadtlenkowego, natomiast nie zmieniały ilości rodników hydroksylowych oraz anionów peroksynitrylu ONOO⁻.

Na podstawie wyników tych badań mgr inż. Edyta Wysokińska przystąpiła do realizacji dalszych badań, których celem było sprawdzenie, w jaki sposób nanocząstki wpływają na funkcjonowanie mitochondriów. Analiza białek proapoptotycznych i antyapoptotycznych zależnych od mitochondriów w komórkach traktowanych badanymi nanocząsteczkami gadolinu wykazała spadek poziomu antyapoptycznego białka Bcl-2 oraz wzrost proapoptycznego białka Bax, który był zależny od stężenia nanocząstek. Wyniki te sugerowały, że obserwowane zmiany mogą wpływać na potencjał błonowy mitochondriów, co Doktorantka postanowiła zanalizować stosując swoisty barwnik Jc-1, gromadzący się w mitochondriach oraz cytometrię przepływową. W obu badanych komórkach linii J774A.1 i RAW 254.7 nanocząstki S1 powodowały spadek potencjału błony mitochondrialnej, natomiast nanocząstki S2 nie miały wpływu na potencjał błony mitochondrialnej w komórkach J774A.1, ale obniżały go w komórkach RAW264.7. Podobne zmiany obserwowano w komórkach pod wpływem nanocząstek S3. Równocześnie uszkodzeniom mitochondriów pod wpływem nanocząstek towarzyszył wzrost ich liczby w komórce. Obserwowane zmiany w badanych komórkach pod wpływem nanocząstek skłoniły Doktorantkę do podjęcia dalszych badań nad ich wpływem na autofagię tych komórek oraz apoptozę. Do badania autofagii wykorzystano analizę białka LC3B, które podczas tego procesu ulega przemianie i translokacji w komórce. W wyniku inkubacji komórek z nanocząsteczkami stwierdziła zmiany w poziomie obu form tego białka – cytoplazmatycznej i lipidowej, co może wpływać na przebieg autofagii. Badane nanocząstki indukują także apoptozę w traktowanych nimi komórkach, która jest zależna od kaspazy 3 i 7. Najwyższy odsetek komórek apoptotycznych Doktorantka stwierdziła w komórkach traktowanych nanocząsteczkami S2.

Wieloetapowe badania mgr inż. Edyty Wysokińskiej na komórkach różnych linii wykazały wysoką toksyczność nanocząstek gadolinu domieszkowanych względem mysich makrofagów linii Raw264.7 i J77A.1. Ponadto, Doktorantka określiła kolejność zdarzeń za to odpowiedzialnych. Dane te wskazują, że ów proces jest indukowany zmianami w zakwaszeniu lizosomów pod wpływem nanocząstek, co kolejno prowadzi do zaburzenia mitochondrialnej homeostazy, procesu autofagii oraz indukcji apoptozy zależnej od kaspaz.

Dla licznych komórek linii komórkowych nanocząstki te nie były toksyczne, co prawdopodobnie wynika z niskiej efektywności w nich endocytozy. Toksyczność nanocząstek można obniżyć, opłaszczając je PEG lub krzemionką.

Wyniki badań Doktorantki oceniam bardzo wysoko. Stanowią efekt wielu pracochłonnych analiz, starannie zaplanowanych i konsekwentnie realizowanych. Postawiony na wstępie pracy cel badań został w pełni zrealizowany. Doktorantka wykazała się znajomością i umiejętnością wykorzystania różnorodnych technik badawczych. Na uwagę zasługuje także Jej umiejętność współpracy z innymi badaczami. Proponowane przez mgr inż. Edytę Wysokińską wieloetapowe badania stanowią w mojej ocenie dobry schemat postępowania, który będzie można stosować do sprawdzania toksyczności innych nanocząsteczek. Część wyników tych badań Doktorantka opublikowała w *Toxicology in vitro* w 2016 roku, natomiast pozostałe znajdują się na etapie przygotowań i uważam, że niebawem zostaną zaprezentowane w publikacjach o szerokim zasięgu międzynarodowym.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Edyty Wysokińskiej została przedstawiona w formie 103-stronicowego wydruku komputerowego, o typowym układzie dla tego typu prac. Część doświadczalną poprzedza krótkie streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz wstęp, w którym Doktorantka doskonale wprowadza czytelnika w zagadnienia stanowiące przedmiot Jej dalszych badań. Cel badań Doktorantka przedstawia w sposób jasny i zrozumiały. Dobrze opisane są również metody badawcze stosowane w pracy, chociaż Autorka nie ustrzegła się w nich żargonu laboratoryjnego, jak np. komórki zbierane przez trypsynę (s. 34), czy drobnych niejasności, że np. Żel po transferze barwiono roztworem błękitu Coomassie w celu skontrolowania poprawności rozdziału białek (s. 32). Uważam, że chodziło o sprawdzenie transferu białek z żelu na błonę. Komórki, moim zdaniem, nie były odrywane od podłoża, ale łagodnie oddzielane za pomocą trypsynizacji. Na niejasności te zwracam uwagę z obowiązku recenzenta, jakkolwiek nie mają one wpływu na moją wysoką ocenę merytoryczną pracy mgr inż. Edyty Wysokińskiej.

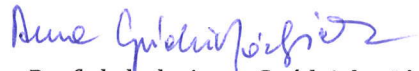
Na uwagę zasługuje część doświadczalna pracy. Wyniki badań zostały przedstawione przez Doktorantkę na licznych fotografiach oraz schematach, a efekty z poszczególnych ich etapów są krótko podsumowane w każdym podrozdziale, co znacznie ułatwia lekturę pracy. Część tę kończą jasno sprecyzowane wnioski. Wyniki własnych badań mgr inż. Edyta Wysokińska dyskutuje z najnowszymi danymi z literatury przedmiotu, a dyskusja rozprawy obrazuje znakomitą znajomość Autorki badanych zagadnień. Pracę kończy spis literatury. Wszystko to sprawia, że rozprawę doktorską mgr inż. Edyty Wysokińskiej czyta się z dużym zainteresowaniem i przyjemnością.

Reasumując, recenzowana rozprawa doktorska dotyczy bardzo ważnych i znaczących dla nanotechnologii, jak również nanomedycyny zagadnień. Doktorantka prowadząc wieloetapowe analizy wpływu nanocząstek na komórki układu odpornościowego wskazała, jakie mogą być przyczyny ich cytotoksyczności, przedstawiając równocześnie sposoby ich badania. Biorąc pod uwagę zakres badań Doktorantki oraz

sposób ich realizacji, uważam, że rozprawa ta ma nie tylko istotne znaczenie poznawcze, ale również aplikacyjne.

W mojej ocenie, praca doktorska Pani mgr inż. Edyty Wysokińskiej spełnia wszystkie kryteria określone w Ustawie MNiSW z 18.03.2011 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (DzU nr 204). Z powyższych względów zwracam się zatem do Wysokiej Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Edyty Wysokińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną rozprawy oraz jej znaczenie aplikacyjne, zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda o wyróżnienie ocenianej pracy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak