

Prof. Dr hab. inż. Artur Podhorodecki
Zespół Nanostruktur Koloidalnych, Katedra Fizyki Doświadczalnej,
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wroclawska

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Zajdel pt.
" Ocena funkcjonalności i cytotoksyczności luminescencyjnych nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ do
zastosowań bio-medycznych"**

Przedłożona do oceny praca dotyczy tematyki związanej z rozwojem nanomateriałów nieorganicznych do diagnostyki medycznej. Praca ta ma wysoce interdyscyplinarny charakter i zawiera wyniki badań z zakresu fizyki, chemii, inżynierii materiałów, biologii oraz medycyny.

Ocena tematyki podjętych badań

Autorka słusznie zauważa, że w tematyce tej wciąż pozostaje wiele otwartych pytań i nie posiadamy pełnej wiedzy na temat oddziaływań nanocząstek nieorganicznych z materiałem biologicznym. Jak dotąd, nie zidentyfikowano wszystkich skutków ubocznych ekspozycji układów biologicznych na nanocząstki, mechanizmów zaangażowanych w ich pobieranie przez komórki, a także mechanizmów ich usuwania z organizmu bądź też ich neutralizacji. W mojej opinii, problemem jest też brak spójnej metodologii oraz wspólnych standardów, do których odnosić by można wyniki podobnych badań otrzymane dla różnych nanomateriałów. Uważam, że tematyka poruszana w pracy jest bardzo aktualna. Dyskutowane w pracy zagadnienia są nie tylko ciekawe i aktualne ale także ważne. Jest to także tematyka badawcza, w której nadal można znaleźć przestrzeń na własny rozwój badawczy i mieć swój własny wkład do dziedziny. W mojej ocenie, wyniki otrzymane w ramach przedłożonej do oceny pracy z całą pewnością stanowią istotny wkład do dziedziny badań związanych z badaniami oddziaływań nanomateriałów nieorganicznych z układami biologicznymi. Nie są mi znane żadne prace przeglądowe z tak systematyczną i wnikliwą analizą procesu internalizacji nanocząstek z konwersją promieniowania w górę (UPC), w szczególności z wykorzystaniem metod mikroskopii elektronowej.

Podejmowana przez autorkę pracy tematyka jest także tematyką stosunkowo nową, bardzo obszerną oraz wielodziedzinową, przez co tematyką dość złożoną i trudną w realizacji ze względu na trudności w interpretacji otrzymywanych wyników i poszukiwanie relacji przyczynowo-skutkowych. Prowadzenie tego rodzaju badań wymaga od badacza dość specyficznych umiejętności i predyspozycji, w szczególności umiejętności pracy w interdyscyplinarnym zespole oraz umiejętności wychodzenia poza ograniczające stereotypy myślowe charakterystyczne dla różnych dziedzin. Osoby podejmujące się tego rodzaju badań nie tylko powinny posiadać widzę z zakresu biologii, chemii i fizyki materiałów ale również dobrze rozumieć metody pomiarów oraz aspekty medyczne, rozumiejąc jaka jest realna potrzeba wykorzystania rozwijanych przez nie materiałów. Podsumowując, jest to także bardzo ambitna i wymagająca tematyka badawcza.

Ocena celu pracy

Jak autorka pisze: Celem naukowym rozprawy doktorskiej była synteza i charakterystyka właściwości fizykochemicznych (morfologicznych i spektroskopowych) otrzymanych nanomateriałów opartych o jony pierwiastków ziem rzadkich, oraz ocena ich toksycznego działania i funkcjonalności w układach biologicznych na poziomie *in vitro*, pod kątem określenia możliwości aplikacyjnych w naukach biologicznych i medycznych.

Aby osiągnąć ten cel autorka przeprowadziła syntezę nanocząstek, modyfikację ich powierzchni, badania cytotoksyczności komórek (stosując wiele różnych testów), badania nad internalizacją nanocząstek do komórek (wykorzystując różnego rodzaju sposoby blokowania różnych mechanizmów wchłaniania nanocząstek przez komórki) wykorzystując wiele technik pomiarowych oraz opracowując wiele własnych protokołów tak, aby uzyskać wiarygodne, ilościowe i powtarzalne wyniki.

W mojej opinii nie jest to najlepszy opis celu tej pracy, ponieważ tak zdefiniowany cel nasuwa podczas jej czytania wiele pytań, na które nie znajduje się w niej jasnych odpowiedzi. Uważam, że cel pracy powinien być jeden i bardziej precyzyjnie zdefiniowany. Po przeczytaniu pracy uważam, że głównym celem pracy były **podstawowe badania oddziaływań nanomateriałów nieorganicznych z komórkami**, w szczególności nanocząstek UCNPs z komórkami HeLa i HEK293 oraz w szczurzym modelu organotypowej hodowli skrawków hipokampa (OHSC). Uważam, że ten cel pracy został zrealizowany w sposób bardzo profesjonalny i na bardzo wysokim poziomie. Uważam, że w tym zakresie praca Pani Karoliny Zajdel wnosi największy wkład do dziedziny i właśnie w tym zakresie autorka wykazała się największą kreatywnością. Na podstawie wyników otrzymanych w tym zakresie uważam, że **praca zasługuje także na wyróżnienie**.

Autorka jako najważniejsze swoje osiągnięcia, uzupełniające istniejący stan wiedzy, wskazała (str.23):

1. Opracowanie szczegółowej dokumentacji ultrastrukturalnej dotyczącej analizy wpływu obecności nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ na komórki w dwóch modelach *in vitro*, z uwzględnieniem ich subkomórkowej lokalizacji;
2. Opisanie mechanizmów pobierania nanocząstek przez komórki HeLa;
3. Opracowanie modelu efektywnego podania nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ w organotypowej hodowli skrawków hipokampa oraz wykazanie, że są one internalizowane przez komórki w obrębie tkanki hipokampa;
4. Wykazanie, że badany typ nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ spełnia cechy atrakcyjnego narzędzia pod kątem przyszłych zastosowań nano-biotechnologicznych i bio-medycznych, ze względu na relatywnie niską cytotoksyczność i bardzo dobre właściwości luminescencyjne w materiale biologicznym.

Trzy pierwsze osiągnięcia idealnie wpisują się w cel jakim mogłyby być jedynie badania podstawowe oddziaływań nanomateriały – komórki. Nie uważam jednak aby w pracy znajdowały się wyniki potwierdzające osiągnięcie zawarte w punkcie czwartym.

Ocena merytoryczna wykonanej pracy

Praca napisana jest w bardzo przejrzysty i precyzyjny sposób. Po jej przeczytaniu jestem pod dużym wrażeniem dojrzałości zawartej w niej dyskusji merytorycznej oraz opracowanej metodologii i logice prowadzonych badań. Ilość pracy włożonej w uzyskanie przedstawionych rezultatów jest ogromna, prowadzona dyskusja jest bardzo dojrzała i poparta wiarygodnymi i dobrze zaplanowanymi badaniami, poziom nowości wyników otrzymanych w części dotyczącej zastosowań biologicznych w zupełności spełnia oczekiwania stawiane rozprawą doktorskim. Poziom wyników w części dt. syntezy materiałów świadczy o dobrze opanowanym rzemiośle w zakresie syntezy nanocząstek UCNPs. Wyniki te przedstawiają jakość nie odbiegającą od standardów światowych. Podsumowując, praca z całą pewnością spełnia wymagania stawiane rozprawą doktorskim i zasługuje na wyróżnienie.

W dalszej części recenzji dokładniej omówione zostaną główne osiągnięcia prezentowane w pracy oraz moje uwagi oraz komentarze dotyczące zawartych w pracy wyników oraz wniosków. Jakakolwiek jednak krytyka zawarta w tej części nie ma wpływu na moją pozytywną opinię nt. pracy oraz nt. mojego przekonania o wysokich kompetencjach Pani Karoliny Zajdel oraz jej predyspozycjach do pracy naukowej.

Pracę można podzielić na dwie części. Część pierwsza zawiera wprowadzenie do tematyki pracy, opis użytych metod eksperymentalnych oraz opis syntezy, modyfikacji i właściwości stosowanych w dalszej części pracy nanostruktur. W drugiej części pracy zawarte są wyniki dotyczące badań oddziaływania nanocząstek UCNPs z komórkami.

Część I

Opis treści zawartej w części pierwszej

Otrzymane nanocząstki UCNPs $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ zostały scharakteryzowane pod kątem morfologicznym, strukturalnym i optycznym, za pomocą metod i technik fizykochemicznych, takich jak: transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS), spektroskopia luminescencyjna (PL), spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS), dyfraktometria rentgenowska (XRD). Przeprowadzono również pomiary wartości ich potencjału powierzchniowego.

Mocne strony:

- Wstęp jest napisany w bardzo przystępny i precyzyjny sposób. Szczególnie wartościowe w tej części są tabele 1 oraz 2 o charakterze porównawczym cech różnego rodzaju nanocząstek pod kątem ich zastosowania w medycynie.
- Praca zawiera bardzo rzetelne i precyzyjne opisy prowadzonych eksperymentów, świadcząc o bardzo dobrym przygotowaniu metodologicznym autorki do prowadzonych badań.
- W ramach prowadzonych badań zostało opracowanych wiele procedur dt. preparatyki próbek, co jest kluczowe dla prowadzenia wiarygodnych serii pomiarów.
- Otrzymane nanocząstki charakteryzowały się wąską dystrybucją rozmiaru, dość niewielkim rozmiarem (ok. 20 nm) oraz pożądaną, ze względu na właściwości optyczne, heksagonalną fazą krystalograficzną.

Pytania recenzenta:

- Prośba o padanie czystości roztworu koloidalnego po procesie czyszczenia tj. wt.% wolnych ligandów oraz podanie informacji o stabilności takiego koloidu po tym procesie.
- Autorka pisze, że „*Opracowana synteza była efektywna i powtarzalna (str.57)*”. Prośba o informację nt. dystrybucji HRTEM, widma DLS oraz informację o PLQY (lub chociaż stosunku emisji czerwonej do zielonej) dla nanocząstek wykonanych w funkcji wykonanych syntez (np. w odstępie > 24h).
- Odnosząc się do powyższego zdania ze str. 57 prośba o informację o efektywności syntezy. Jaka była i jak była liczona efektywność syntezy?
- Jedną z głównych zalet nanocząstek UCNPs, o której autorka także pisze we wstępie, jest możliwość obrazowania multimodalnego. Cecha ta jest chyba jedną z dwóch, razem z odcięciem się od autofluorescencji, realnych zalet tego rodzaju nanocząstek w zastosowaniach biologiczno-medycznych. Dziwi zatem opracowanie protokołów syntezy nanocząstek do multimodalnego obrazowania *in vivo* bez Gd³⁺. Jaki był zatem powód wyboru kompozycji bez gadolinu?
- Autorka pokazała świetnej jakości nanocząstki UCNPs, które zsyntezowała we współpracy z Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Laboratorium to pochwalić może się wynikami podobnej jakości nanostrukturami otrzymanymi już znacznie wcześniej np. *Nanoscale* 2017, 9, 14259. Interesującym byłoby wskazanie czy w ramach realizacji doktoratu autorka wniosła jakiś własny znaczący wkład do rozwoju istniejących protokołów syntezy – jaki?
- Jak liczona była gęstość mocy? Jako moc wysłana czy jako moc zaabsorbowana przez układ? I dlaczego tak.
- W pracy stosowano moc lasera w zakresie 1.3 – 15 W/cm². Czy nie są to już moce powodujące uszkodzenia tkanek? Jakie są normy dt. dopuszczalnych mocy laserów NIR stosowanych klinicznie? Informacja ta może być istotna, ponieważ pośrednim celem pracy jest opracowanie znacznika do badań *in vivo*.
- Strona 57: *‘W związku z tym, jedną z głównych strategii dotyczących modyfikacji powierzchni nanocząstek jest usunięcie z ich powierzchni liganda organicznego.’* Nie zgodzę się, że jest to główna strategia – jest to raczej najrzadziej spotykana strategia. Takie podejście powoduje silną agregację nanocząstek po czasie. Dlatego prośba o przedstawienie wyników DLS dla takich cząstek (po usunięciu ligandów) w funkcji czasu np. po usunięciu ligandów, po 24 h, po kilku dniach.
- Autorce udało się uzyskać bardzo wysokiej jakości pokrycie SiO₂ tj. bardzo cienkie. Tak cienkie pokrycia są jednak często niestabilne w czasie i często powodują ‘klejenie się’ nanocząstek UCNPs w agregaty. Na stronie 82: Rycina 14, zamieszczone zdjęcia sugerują tworzenie się mostków krzemionkowych pomiędzy płaszcami poszczególnych nanocząstek, co w konsekwencji prowadzi do tworzenia się klastrów jakie są widoczne na Rycinie 14. To jest bardzo niepożądana sytuacja. Chcąc bowiem takie materiały stosować w praktyce mamy

bowiem nawet mikrometrowe klasterki, które z pewnością będą stanowiły zagrożenie dla organizmu. Prośba o przedstawienie wyników DLS dla nanocząstek pokrywanych warstwą SiO₂.

- Strona 87: 'Przeprowadzone pomiary wykazały, że nanocząstki charakteryzują się wysoką wydajnością konwersji energii w górę, która przekłada się na ich intensywną, zieloną i czerwoną luminescencję.' Co to znaczy wysoka konwersja, czyli jaka? Prośba o podanie wydajności kwantowej emisji.
- Strona 89: 'Pomiary potencjału zeta dla nanocząstek przyjmowały wartość dodatnią, która wynosiła $\sim 44,74 \pm 1,5$ mV ($\zeta = 45$ mV). Prośba o podanie których to cząstek dotyczyło. Przed czy po funkcjonalizacji?

Wnioski zawarte w części pierwszej:

- Otrzymane metodą współstrącania nanocząstki posiadały heksagonalną strukturę, niewielki rozmiar (~ 20 nm), dobrą dyspersję w fizjologicznych roztworach wodnych i wykazywały intensywną luminescencję (zieloną i czerwoną).
- Potencjał zeta analizowanych nanocząstek po usunięciu liganda kwasu oleinowego był dodatni ($44,7 \pm 1,5$ mV).

Część II

Opis treści zawartej w części drugiej

W tej części pracy przeprowadzono badania wewnątrzkomórkowej akumulacji i toksyczności *in vitro* wobec komórek linii HeLa i HEK293 oraz w szczurzym modelu organotypowej hodowli skrawków hipokampa (OHSC). W celu identyfikacji mechanizmów internalizacji nanocząstek UCNPs do komórek przeprowadzono analizę mikroskopowo-elektronową oraz przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Badania internalizacji przeprowadzono przy użyciu kilku inhibitorów.

Komentarz: Przy zdefiniowanym jak we wstępie celu pracy, recenzent ma problem z logiką prowadzonych w pracy badań. Autorka planuje wykorzystać swoje nanomateriały do badań medycznych (multimodalne znaczniki *in vivo*), jednak zawarte w pracy badania zaczynają się od końca, zamiast od początku. Jest to niestety powszechny problem lub pułapka, w którą wpadają także doświadczeni badacze chcący aby ich badania podstawowe miały użyteczny charakter. Jak pisze autorka we wstępie, docelowym zastosowaniem dla tego rodzaju nanocząstek jest obrazowanie *in vivo* i to raczej rozumiane jako obrazowanie wielomodowe tzn. przy wykorzystaniu różnych technik obrazowania. W mojej ocenie, nanocząstki UCNPs w obrazowaniu *in vitro* przegrywają z innymi nanomateriałami. Jeżeli autorka jest innego zdania, w pracy powinny się znaleźć argumenty eksperymentalne potwierdzające przewagę nanocząstek UCNPs nad np. kropkami kwantowymi w obrazowaniu *in vitro*. Zastosowanie nanocząstek UCNPs w pewnych specyficznych przypadkach obrazowania *in vivo* może rzeczywiście dawać przewagę nad innymi materiałami. Pierwszym zatem eksperymentem, po zsyntezowaniu tego rodzaju nanocząstek powinno być sprawdzenie czy takie nanocząstki są w stanie sprostać tak trudnym wymaganiom spektralnym jak obrazowanie światła widzialnego wychodzącego z głębi tkanek i przy jakich warunkach jest to możliwe? Jeżeli nie, do dalsze badania nad toksycznością takiego materiału na poziomie komórkowym czy badania wchłaniania

nanocząstek przez komórki nie mają większego sensu - w kontekście uczynienia z UPC narzędzia diagnostycznego, nie w kontekście badań podstawowych. W takim przypadku, należy tak optymalizować materiał aby odpowiedź była TAK. Dopiero tak zoptymalizowany materiał powinien być poddany szczegółowym badaniom toksyczności – krok po kroku, zaczynając od immunotoksyczności i kończąc na cytotoksyczności. Niestety, w większości przypadków zaczyna się tego rodzaju badania od sprawdzania cytotoksyczności, której brak czyni nanomateriał '*...promising for medical in vivo applications*'. Trudność jaka często pojawia się w zaplanowaniu tego rodzaju badań jest taka, że należy od samego początku dobrze wiedzieć jakie jest końcowe przeznaczenie znacznika. Wiadomym jest bowiem, że różne tkanki mają różne właściwości optyczne, a obrazowane obiekty mogą być na różnej głębokości. Różne mogą być także mechanizmy dostarczania to tego miejsca nanocząstek, a co za tym idzie różne bariery biologiczne do pokonania (różne ligandy). Dlatego w mojej ocenie cytotoksyczność powinna być badana na samym końcu testowania przydatności nanomateriału do zastosowań medycznych. Zanim bowiem dojdzie się do cytotoksyczności musimy uporać się z niekontrolowanym *body clearance*, immunotoksycznością, niekontrolowaną biodystrybucją nanocząstek i wieloma rodzajami toksyczności wynikającymi z agregacji nanocząstek z uwagi na degradację ich organicznej powierzchni, która może być efektem ciśnienia krwi, różnych środowisk (pH) przez jakie przychodzi przechodzić nanocząstka czy różnych barier biologicznych w organizmie jakie intencjonalnie lub nieintencjonalnie przyjdzie im pokonać.

Możliwości kontroli i wymogi jakie muszą spełnić nanocząstki, gdy wprowadzane są do komórek na szalce pod mikroskopem, są zdecydowanie inne, niż te gdy podajemy je dożylnie czy doustnie i dotrzeć one muszą samodzielnie do badanych komórek.

Kolejny problem jaki ma recenzent z tym rodzajem badań, to sam fakt badania pokonywania bariery komórkowej przez nanocząstki UCNPs oraz badania ich cytotoksyczności w kontekście planowanej docelowej aplikacji. Jeżeli tego rodzaju nanocząstki stosowane mają być do obrazowania *in vivo* np. nowotworów, to przecież nie będziemy ich używać do badania *in vivo* mitochondriów w pojedynczych komórkach nowotworowych np. w jelicie, tylko raczej do identyfikacji masy nowotworowej oraz granic nowotworu. Dla takiego zatem zastosowania tak należy zaprojektować nanocząstki (ligandy, ładunek powierzchniowy, kształt, rozmiar) aby nanocząstki nie wchodziły do komórek - bo po co? W mojej opinii samo wchodzenie takich nanocząstek do komórek eliminuje je z zastosowań *in vivo* bo stwarza dodatkowe poważne ryzyka – m.in. cytotoksyczności. Wchodzenie nanocząstek do komórek, bez ich uszkodzenia czy zaburzenia procesów wewnątrzkomórkowych, potrzebne jest do badań nad biologią komórki, które są badaniami *in vitro* i dla których jest wiele innych lepszych znaczników.

Komentarz ten jest wynikiem zbyt szeroko zdefiniowanego celu pracy, o czym była mowa we wstępie. Gdyby podkreślono, że celem pracy są podstawowe badania oddziaływania nanocząstek nieorganicznych z komórkami, powyższy komentarz nie miałby zastosowania.

Mocne strony pracy:

- Zastosowanie unikalnej i świetnie dopasowanej do celu badań techniki do analizy procesów przenikania nanocząstek przez błony komórkowe.
- Bardzo dobrze opracowane i dostosowane procedury/metodologia prowadzonych badań toksyczności oraz przechodzenia nanocząstek przez błony komórkowe.
- Skomplikowany proces przenikania nanocząstek przez błony komórkowe został opisany w bardzo przejrzysty i przekonujący sposób.

Pytania recenzenta:

- Jeżeli w badaniach *in vitro* stosując wysokiej klasy mikroskop konfokalny, należało podać 10 micro g to jakie będą stężenia nanocząstek jakie należy podać do krwioobiegu tak, aby nanocząstki były widoczne w obrazowaniu *in vivo*? Jak te stężenia się mają do obecnych norm stosowanych dla klinicznego stosowania nanomateriałów np. Fe_2O_3 czy SiO_2 ?
- Nie do końca jasna jest dla mnie rola badań przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego. Zabrakło mi tutaj głębszej dyskusji w jakim stopniu mikroskopia fluorescencyjna uzupełnia badania TEM i jakie są zalety wykorzystania w obrazowaniu komórek tą techniką przy wykorzystaniu nanocząstek UCNPs. Czy poza tym, że obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego potwierdzają, że nanocząstki UCNPs są gdzieś w komórkach wynika coś więcej?
- Strona 135, Rycina 72. Prośba o wnikliwszy komentarz co z niej wynika? Czy można zobaczyć zdjęcia Z-skan potwierdzające co weszło do środka, a co jest na powierzchni?
- Zabrakło mi też w tej części zwięzłego podsumowania, co praktycznego wynika z tych badań nad transportem nanocząstek do wnętrza komórki. Prośba o komentarz.
- Autorka pisze, że nie było istotnych zmian strukturalnych po wprowadzaniu UPC do komórek. Ze zdjęć HTEM widać jednak, że UCNPs formowały agregaty w komórkach. W jaki sposób zaburza to pracę komórki, np. komunikację pomiędzy organellami itp.? Agregaty te stanowią istotny % objętości komórki więc trudno uwierzyć, że nie mają one wpływu na funkcjonowanie komórki.
- Jak planowane jest dostarczanie nanocząstek UCNPs do komórek neuronowych w obrazowaniu *in vivo*? Prośba o komentarz w tej kwestii i dlaczego ma się to udać.
- Na ile sam proces wykonania pomiaru HRTEM ma wpływ na zmiany w morfologii oraz zachowaniu komórek?

Wnioski zawarte w pracy w części drugiej:

- Na podstawie obserwacji mikroskopowo-elektronowych stwierdzono, że interakcje nanocząstek UCNPs z komórkami przebiegały według tego samego, powtarzalnego schematu (UCNPs internalizowane były na drodze endocytozy, następnie transportowane w pęcherzykach endocytarnych do endosomów wczesnych, endosomów późnych, a w końcu lizosomów i zostawały usuwane z komórki). Wyniki były powtarzalne bez względu na długość czasu ekspozycji komórek na UCNPs.
- Pokazano, że pobieranie nanocząstek było procesem zależnym od energii, a jego zahamowanie znacząco ograniczało ich pobieranie przez komórki HeLa.
- Pokazano, że UCNPs, aby wejść do komórek mogły wykorzystywać kilka szlaków endocytarnych jednocześnie.

- Zaobserwowano dwa główne mechanizmy endocytozy, przebiegającej z udziałem klatryny oraz z udziałem kaweoli. Bardziej efektywne działanie w hamowaniu tego procesu wykazywała danylokadaweryna, niż powszechnie stosowana chloropromazyna.
- Obecność nanocząstek obserwowano w zagłębieniach błony komórkowej, we wczesnych endosomach, w późnych endosomach przemieszczających się okolicę około jądrową oraz w lizosomach.
- Obserwacje mikroskopowo-elektronowe wykazały, że nanocząstki były przekazywane z endosomów do lizosomów, co może wskazywać na mechanizm obronny komórki, w celu usunięcia nanocząstek z jej wnętrza.
- Nie zaobserwowano dowodów na akumulację nanocząstek w innych organellach komórkowych np. mitochondriach, co może sugerować brak znaczącego zakłócenia w funkcjach biologicznie związanych z metabolizmem komórki.
- Obecność roztworu sacharozy obniżyła internalizację UCNPs o ~30% w porównaniu do komórek kontrolnych.
- UPC nie ulegały rozkładowi, ani też nie uwalniały ze swojej struktury jonów pierwiastków lantanowców po internalizacji przez komórki HeLa.
- Prowadzono również badania wpływu inhibitorów takich jak: nystatyna, cytochalazyna D, genisteina i nokodazol na internalizację UCNPs. Nystatyna w ~50% hamowała endocytozę z udziałem kaweoli (okres inkubacji 30 minut).
- Istotnym wynikiem było także obniżenie internalizacji UCNPs w komórkach po 1-godzinnej inkubacji z nystatyną, genisteiną, M β cD, chloropromazyną, nokodazolem, cytochalazyną D oraz amilorydem.
- UCNPs nie wykazały także istotnego wpływu na żywotność komórek HeLa w zakresie stężeń 0,1-10 μ g/ml. Żywotność komórek obniżyła się o ~17,6% przy najwyższym stosowanym stężeniu nanocząstek UCNPs, które wynosiło 50 μ g/ml i efekt ten był istotny statystycznie.
- Pokazano, że wpływ analizowanych nanocząstek UCNPs na indukcję reaktywnych form tlenu (ROS) oraz nadtlenków jest nieznaczny.
- Przy wyższych stężeniach nanocząstek (ok. 10 μ g), obserwowano w neuronach zwiększoną liczbę lizosomów, co sugeruje, że ich duże stężenie może wpływać na indukcję procesów autofagii w komórkach.
- Obserwacje wykazały efektywną internalizację nanocząstek przez komórki i umożliwiły określenie ich dokładnej lokalizacji wewnątrzkomórkowej. UCNPs gromadziły się jedynie w wybranych organellach komórkowych jak endosomy wczesne, endosomy późne oraz lizosomy, a następnie usuwane były na drodze egzocytozy. Ponadto, doświadczenia z wykorzystaniem wybranych

chemicznych inhibitorów endocytozy potwierdziły jej udział w internalizacji UCNPs i pomogły wytypować kilka mechanizmów w nią zaangażowanych. Głównym mechanizmem internalizacji UCNPs w komórkach HeLa była endocytoza za pośrednictwem klatryny.

- Wykazano, że cytotoksyczność analizowanych UCNPs względem komórek prawidłowych i nowotworowych (badana testami MTT, PrestoBlue, Live/Dead), wyrażana obniżeniem żywotności komórek, była niewielka i zależała od stężenia nanocząstek. Odpowiedź komórkowa (zmiany ultrastrukturalne związane z degeneracją mitochondriów) była nasilona tylko dla bardzo wysokich stężeń (100 µg/ml), znacznie przewyższających ustalone, optymalne do badań stężenie (1 µg/ml), określone na podstawie analizy mikroskopowo-elektronowej.
- Ponadto, ekspozycja na wybrane stężenia UCNPs wykazała brak istotnej indukcji wybranych markerów stresu o. Badania *ex vivo* umożliwiły opracowanie efektywnego modelu podania UCNPs do hodowli skrawków hipokampa. Przeprowadzone obserwacje potwierdziły efektywną internalizację UCNPs do komórek hipokampa, ich dystrybucję oraz gromadzenie się w endosomach i lizosomach. Barwienie jodkiem propidyny i analiza TEM nie potwierdziły nasilonego, negatywnego wpływu UCNPs na przeżywalność i morfologię skrawków. ksydacyjnego, której nie towarzyszyły zmiany ultrastrukturalne w komórkach.
- Pokazano dowody sugerujące, że nanocząstki na początku pobierane mogą być szybko, po czym po osiągnięciu swojego maksimum wysycenia, pobierane są dużo wolniej lub wcale.

Podsumowując, bazując na zawartych w pracy wynikach eksperymentalnych oraz na dyskusji merytorycznej zawartej w pracy stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi związane z uzyskaniem stopnia doktora. W związku z tym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego, Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Zajdel do dalszych etapów procedury doktorskiej w celu uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych.

Ponadto, ze względu na obszerność przeprowadzonych badań, ich interdyscyplinarność i wyraźny indywidualny wkład do badań nad oddziaływaniem nanocząstek nieorganicznych z komórkami, przy wykorzystaniu unikalnego podejścia mikroskopii elektronowej wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem,


A.Podhorodecki

