

mgr Karolina Zajdel

Ocena funkcjonalności i cytotoksyczności luminescencyjnych nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ do zastosowań bio-medycznych

Rozprawa na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Małgorzata Frontczak-Baniewicz

Promotor pomocniczy: dr n. fiz. Bożena Sikora



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2022

Streszczenie

Współczesna medycyna wymusza potrzebę intensyfikacji badań w zakresie poszukiwania nowych rozwiązań diagnostycznych i terapeutycznych. Największe nadzieje pokłada się w nowatorskich strategiach opartych na wykorzystaniu nanostruktur. W celu zapewnienia bezpieczeństwa biologicznego nowo opracowanych nanocząstek, ich unikalne właściwości muszą przewyższać ich działanie toksyczne. Dlatego poszukuje się nanomateriałów wielofunkcyjnych, charakteryzujących się niską cytotoksycznością. W ostatnim czasie, na szczególną uwagę zasługują nanocząstki konwertujące energię w górę (ang. *up-converting nanoparticles*, UCNPs) domieszkowane jonami lantanowców.

UCNPs to nowa generacja nanomateriałów o bardzo interesujących właściwościach luminescencyjnych, a mianowicie, posiadających zdolność do zamiany niższej energii promieniowania (długości fal np. bliskiej podczerwieni NIR) w energię wyższą (krótsze długości fal, np. UV lub VIS) w nieliniowym procesie optycznym, zwanym konwersją energii w górę (ang. *up-conversion*, UC). Zdolność do konwersji energii w górę pozwala na wykorzystanie nanocząstek jako bio-znaczyków lub bio-czujników, a także ich obserwację w komórkach i tkankach oraz monitorowanie procesów, w których uczestniczą. Zaletami UCNPs jest również ich stosunkowo niska cytotoksyczność, doskonała fotostabilność, odporność na wyświecanie oraz to, że długość fali ich wzbudzenia nie powoduje auto-fluorescencji związków organicznych zawartych w materiale biologicznym.

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.

Pierwszym etapem badań była synteza nanokrystalicznych fluorków domieszkowanych wybranymi jonami lantanowców iterbu (Yb^{3+}) oraz erbu (Er^{3+}). Otrzymane metodą współstrącania nanocząstki posiadały heksagonalną strukturę, niewielki rozmiar (~ 20 nm), dobrą dyspersję w fizjologicznych roztworach wodnych i wykazywały intensywną luminescencję (zieloną i czerwoną) pod wpływem promieniowania NIR, zależną od zastosowanego jonu aktywatora (Er^{3+}). 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.

W dalszej części pracy weryfikowano możliwość zastosowania zsyntetyzowanych nanocząstek w badaniach biologicznych. 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 $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ do komórek przeprowadzono analizę mikroskopowo-elektronową oraz przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Obserwacje wykazały efektywną internalizację nanocząstek przez komórki i umożliwiły określenie ich dokładnej lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Transport nanocząstek przez błony komórkowe był bardzo dynamicznym procesem i były one z łatwością pobierane przez obie linie komórkowe (widoczna internalizacja po 30 min). UCNPs dostawały się do komórek na drodze endocytozy i zawsze występowały zamknięte w strukturach pęcherzyków. 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 nasiloną tylko dla bardzo wysokich stężeń (100 $\mu\text{g/ml}$), znacznie przewyższających ustalone, optymalne do badań stężenie (1 $\mu\text{g/ml}$), określone na podstawie analizy mikroskopowo-elektronowej.

Ponadto, ekspozycja na wybrane stężenia UCNPs wykazała brak istotnej indukcji wybranych markerów stresu oksydacyjnego, której nie towarzyszyły zmiany ultrastrukturalne w komórkach. Z danych literaturowych wynika, że linie nowotworowe są mniej wrażliwe na obecność nanomateriałów, nie zaobserwowano jednak znaczących różnic pomiędzy komórkami HeLa i HEK293.

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.

W toku przeprowadzonych analiz jednoznacznie można stwierdzić, że UCNPs budzą duże nadzieje związane z potencjalnymi korzyściami płynącymi z ich zastosowania w zakresie badań bio-medycznych. Uzyskane informacje uzupełniają obecny stan wiedzy odnośnie interakcji nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ z materiałem biologicznym, zachodzących na poziomie subkomórkowym. W związku z powyższym, wyniki dotyczące zarówno syntezy i charakterystyki, jak również szczegółowej analizy tych nanoobiektów w układach biologicznych *in vitro* są doskonałym punktem wyjścia do badań nad spersonalizowaną biofunkcjonalizacją UCNPs w leczeniu różnych chorób w przyszłości.