

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt. *Wykorzystanie zaawansowanych metod spektroskopowych do badania wpływu nanocząstek tlenków żelaza na organizmy żywe*

Nanocząstki (*ang.* nanoparticles, NP), najczęściej definiowane jako obiekty o średnicy mieszczącej się w zakresie 1 – 100 nm, mogą posiadać unikalne właściwości fizyczne, chemiczne, strukturalne oraz magnetyczne, które czynią je niezwykle atrakcyjnymi z punktu widzenia zastosowań biomedycznych. Z drugiej strony, ze względu na rozmiary porównywalne ze strukturami komórkowymi, NP mogą z łatwością pokonywać naturalne bariery biologiczne chroniące organizm i w konsekwencji powodować niepożądane skutki zdrowotne. Największy potencjał do zrewolucjonizowania klinicznych metod diagnostycznych i terapeutycznych przypisuje się, ze względu na przewidywaną biokompatybilność, biodegradowalność oraz łatwość syntezy, nanocząstkom tlenków żelaza (*ang.* iron oxide nanoparticles, IONP). Jak dotąd badania dotyczące toksyczności IONP były prowadzone dla dawek porównywalnych lub dużo większych niż klinicznie stosowane u ludzi. Co więcej, ograniczały się one głównie do analizy zmian histopatologicznych, funkcjonalnych czy mutacji genetycznych w narządach narażonych na działanie NP. Niezbędne wydaje się zatem uzupełnienie wiedzy na temat zmian zachodzących na poziomie molekularnym w tkankach organizmów poddanych ekspozycji na IONP.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była weryfikacja możliwości wykorzystania nowoczesnych metod spektroskopowych, jakimi są spektroskopia fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (*ang.* total reflection X-ray fluorescence, TXRF) i mikrospektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (*ang.* Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR), do oceny wpływu nanocząstek tlenków żelaza na organizmy żywe. W eksperymentach wykorzystano dwa rodzaje IONP: nanocząstki magnetytowe pokryte glikolem polietylenowym (PEG-IONP) oraz nanocząstki maghemitowe pokryte D-mannitolem (M-IONP). Badania prowadzono na szczurach szczepu Wistar płci męskiej. Zwierzęta poddano dożylniej ekspozycji na niskie dawki badanych nanocząstek. Zastosowanie spektroskopii TXRF umożliwiło ocenę zmian w poziomie Fe, Cu, Ca i Zn w wybranych narządach zwierząt w różnych okresach czasowych od podania PEG-IONP oraz M-IONP. Mikrospektroskopia FTIR, z kolei, pozwoliła na określenie długofalowych zmian w zawartości i/lub strukturze lipidów, białek oraz związków zawierających grupy fosforanowe u szczurów, które otrzymały M-IONP.

Analiza pierwiastkowa wykazała, że dożylnie podanie nawet tak niewielkich dawek nanocząstek tlenków żelaza może prowadzić do istotnych zmian w zawartości Fe, Cu, Ca i Zn w badanych narządach w przypadku obydwu zastosowanych typów IONP. Ocena zmian w poziomie Fe umożliwiła określenie ich biodystrybucji oraz farmakokinetyki w organizmach zwierząt eksperymentalnych. Badane nanocząstki różniły się średnicą hydrodynamiczną (PEG-IONP 35 nm z rdzeniem 30 nm, M-IONP 100 nm z rdzeniem 10 nm) stąd zaobserwowano różną ich biodystrybucję, a także czas pozostawania w organizmie. W świetle otrzymanych wyników PEG-IONP, ze względu na rozmiar uniemożliwiający usunięcie na drodze filtracji nerkowej, a także zastosowanie otoczki z glikolu polietylenowego zapobiegającej wychwyceniu w wątrobie i dalszemu metabolizmowi, pozostawały w organizmie znacznie dłużej niż M-IONP. M-IONP natomiast wykazały typową dla nanocząstek tendencję do szybkiego gromadzenia w wątrobie, gdzie uległy dalszej dekompozycji do wolnych jonów Fe. Z drugiej strony, uwzględniając dużą rozpuszczalność

D-mannitolowej otoczki w ośrodkach wodnych i biorąc pod uwagę zmiany biochemiczne zaobserwowane w nerkach, nie można wykluczyć, że część nanocząstek straciła otoczkę na krótko po wstrzyknięciu, a w konsekwencji, została wydalona z organizmu drogą renalną. Również odpowiedź biologiczna na dożylne podanie nanocząstek, której ocenę umożliwiła analiza zmian w zawartości Cu, Ca i Zn, była różna dla każdego z typów IONP. W przypadku PEG-IONP zaobserwowano, iż głównymi mechanizmami odpowiedzi biologicznej były aktywacja miedziozależnej ceruloplazminy, uczestniczącej w metabolizmie Fe w organizmie, a także mobilizacja Zn, który m. in. hamuje działanie receptora MNDA zapobiegając napływowi jonów  $Ca^{2+}$  do dotkniętych stresem oksydacyjnym tkanek. Z kolei dożylne podanie M-IONP indukowało aktywację miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej, kluczowej dla przywrócenia zaburzonej przez stres oksydacyjny równowagi redoks w tkance.

Dzięki zastosowaniu mikrospektroskopii FTIR możliwe było wykrycie długofalowych anomalii w akumulacji oraz strukturze głównych makromolekuł biologicznych w tkance wątroby oraz nerki zwierząt poddanych ekspozycji na niską dawkę M-IONP. Mimo braku długotrwałych zmian pierwiastkowych w wątrobie zwierząt poddanych działaniu M-IONP, zaobserwowano u nich spadek zawartości białek, a także wzrost stopnia nienasycenia lipidów. Znacznie więcej zmian biochemicznych znaleziono natomiast w nerkach, mimo iż w narządzie tym nie ujawniły się anomalie pierwiastkowe sugerujące gromadzenie M-IONP ani wystąpienie stresu oksydacyjnego. Otrzymane wyniki wykazały, że podanie M-IONP doprowadziło do zmiany gęstości tkanki nerki, o czym mogły świadczyć jednoczesne wzrosty bezwzględnych zawartości białek, lipidów oraz związków zawierających grupy fosforanowe. Zaobserwowano również, towarzyszące alteracji długości łańcucha lipidowego, jego stopnia nasycenia lub rozgałęzienia anomalie w strukturze tłuszczu. Analiza biochemiczna wykazała ponadto, iż zmiany w zawartości tłuszczu były znacznie bardziej zintensyfikowane niż zmiany w akumulacji białek.

Uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wyniki stanowią istotne uzupełnienie wiedzy na temat oddziaływania nanocząstek tlenków żelaza na organizmy żywe, jednocześnie udowadniając duże możliwości nowoczesnych metod spektroskopowych w dziedzinie nanotoksykologii.

Kraków, 17.10.2018 r.