



**Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski**

Karol P. Steckiewicz

***„Wpływ modyfikacji mikrocząstek i nanocząstek
na ich aktywność cytotoksyczną i właściwości
przeciwbakteryjne w badaniach in vitro”***

Rozprawa doktorska

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: prof. dr hab. Iwona Inkielewicz - Stępiak
Kierownik Katedry i Zakładu Patofizjologii Farmaceutycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2020

SPIS TREŚCI

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/ LIST OF PAPERS INCLUDED IN THE DOCTORAL DISSERTATION	5
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	6
I. WYKAZ SKRÓTÓW	7
II. WPROWADZENIE	10
III. CELE PRACY	16
IV. MATERIAŁY I METODY	17
V. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	19
VI. PODSUMOWANIE	26
SUMMARY IN ENGLISH	28
I. LIST OF ABBREVIATIONS	29
II. INTRODUCTION	31
III. AIM OF THE STUDY	37
IV. MATERIALS AND METHODS	38
V. DESCRIPTION OF PUBLICATIONS INCLUDED IN THE DOCTORAL THESIS	40
VI. CONCLUSION	47
WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA / BIBLIOGRAPHY	49
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/ PAPERS INCLUDED IN THE DOCTORAL DISSERTATION	56

Pracę dedykuję pamięci mojej babci Reginy.

Pragnę serdecznie podziękować wszystkim, bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.

Mojej promotor Pani prof. Iwone Inkielewicz - Stępiak za okazane zaufanie i poświęcony czas.

Pani dr Ewelinie Barcińskiej za pomoc w stawianiu pierwszych naukowych kroków i okazane wsparcie.

Współautorom prac wchodzących w skład mojej rozprawy doktorskiej za owocną współpracę.

Koleżankom i kolegom z Katedry i Zakładu Chemii Medycznej oraz panu prof. Michałowi Woźniakowi za towarzyszenie mi w mojej drodze naukowej.

Moim najbliższym, rodzicom i rodzeństwu za wszystko, a w szczególności za to, że nigdy we mnie nie wątpili.

Mojej rodzinie i przyjaciołom za okazane wsparcie, wyrozumiałość i cierpliwość.

**WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ /
LIST OF MANUSCRIPTS INCLUDED IN THE DOCTORAL DISSERTATION**

Steckiewicz KP, Inkielewicz-Stępiak I.

Modified nanoparticles as potential agents in bone diseases: cancer and implant-related complications

Nanomaterials. 2020; 10:658

IF₂₀₁₉: 4,324

<https://www.mdpi.com/2079-4991/10/4/658>

Steckiewicz KP, Barcińska E, Malankowska A, Zauszkiewicz-Pawlak A, Nowaczyk G, Zaleska-Medynska A, Inkielewicz-Stępiak I.

Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in *in vitro* model: evaluation of the safety of use and anti-cancer potential

J Mater Sci Mater Med. 2019; 30(2):22

IF₂₀₁₉: 2,489

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-019-6221-2>

Steckiewicz KP*, Barcińska E*, Sobczak K, Tomczyk E, Wójcik M, Inkielewicz-Stępiak I.

Assessment of anti-tumor potential and safety of application of glutathione stabilized gold nanoparticles conjugated with chemotherapeutics

Int J Med Sci. 2020;17(6)

IF₂₀₁₉: 2,523

*Wskazani autorzy mają jednakowy wkład w przygotowanie publikacji.

*These authors contributed equally to this work.

<https://www.medsci.org/v17p0824.htm>

Steckiewicz KP, Zwara J, Jaśkiewicz M, Kowalski S, Kamysz W, Zaleska-Medynska A, Inkielewicz-Stępiak I.

Shape-depended biological properties of Ag₃PO₄ microparticles: evaluation of antimicrobial properties and cytotoxicity in *in vitro* model - safety assessment of potential clinical usage

Oxid Med Cell Longev. 2019; 2019:6740325.

IF₂₀₁₉: 5,076

<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/6740325/>

Łączna wartość wskaźnika oddziaływania (IF): **14.412**

Badania będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora były częściowo finansowane w ramach Grantu „Wspieramy rozwój” Cedrob SA (kierownik: Karol Steckiewicz)

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

I. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

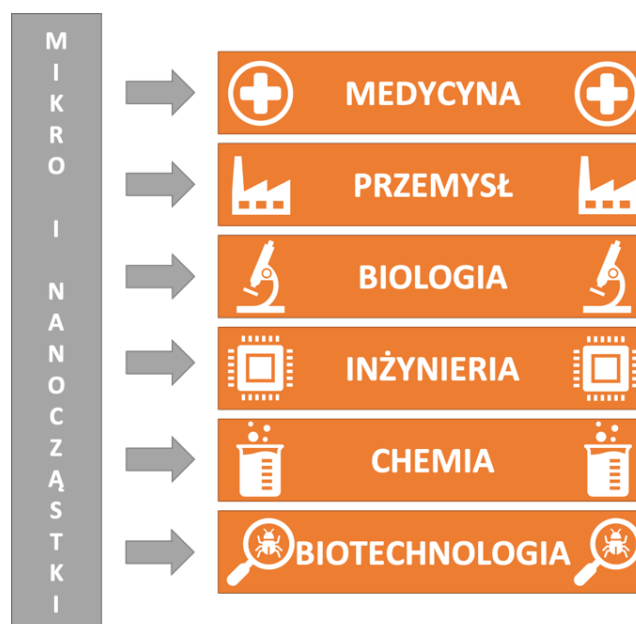
143B	linia komórkowa kostniakomięsaka
AgNPs	nanocząstki srebra
ATCC	(ang. <i>American Type Cell Culture</i>), Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych
AuNPs	nanocząstki złota
AuNPs-GSH	nanocząstki złota stabilizowane glutationem
AuNPs-GSH-CTA	nanocząstki złota stabilizowane glutationem i sprzężone z cytarabiną
AuNPs-GSH-DOX	nanocząstki złota stabilizowane glutationem i sprzężone z doksorubicyną
AuNPs-GSH-GEM	nanocząstki złota stabilizowane glutationem i sprzężone z gemcytabiną
b-SOMPs	(ang. <i>branched silver orthophosphate microparticles</i>), mikrocząstki fosforanu (V) srebra w kształcie rozgałęzionym
Bax	białko proapoptotyczne
Bcl-2	białko antyapoptotyczne
BrdU	5-bromo-2-deoksyurydyna
c-SOMPs	(ang. <i>cubic silver orthophosphate microparticles</i>), mikrocząstki fosforanu (V) srebra w kształcie sześciennym
C2C12	linia komórkowa mysich mioblastów
CTA	cytarabina
DCF-DA	dioctan 2,7'-dichlorodihydrofluoresceiny
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
DOX	doksorubicyna
ECDC	(ang. <i>European Collection of Authenticated Cell Culture</i>), Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych
GEM	gemcytabina
GPX4	peroksydaza glutationowa 4
GSH	glutation
HA-NPs	nanocząstki hydroksyapatytu
HDF	linia komórkowa fibroblastów skóry

hTERT-HPNE	linia komórkowa nietransformowanych nowotworowo komórek przewodu trzustkowego
IC ₅₀	stężenie inhibitora hamujące w 50%
IUPAC	(ang. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>), Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
MBEC	(ang. <i>minimal biofilm eradication concentration</i>), minimalne stężenie eradykujące biofilm
MC3T3-E1	linia komórkowa mysich preosteoblastów
MG-63	linia komórkowa kostniakomięsaka
MIC	(ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>), minimalne stężenie hamujące
MMP1	metaloproteinaza 1
MMP3	metaloproteinaza 3
MPs	mikrocząstki
MRSA	(ang. <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>), gronkowiec złocisty (<i>Staphylococcus aureus</i>) oporny na metycylinę
MTT	bromek 3-(4,5-dimetyltiazol-2-ilo)-2,5-difenyloterazoliowy
NF-κB	(ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>), jądrowy czynnik transkrypcyjny κB
NPs	nanocząstki
NR	(ang. <i>neutral red</i>) czerwień obojętna
p16-ARC	(ang. <i>actin-related protein 2/3 complex subunit 5</i>), białko kompleksu związanego z aktyną
PANC1	linia komórkowa nowotworu trzustki
PEG	(ang. <i>poly (ethylene glycol)</i>), poli (tlenek etylenu)
PI	jodek propidyny
rd-SOMPs	(ang. <i>rhombic dodecahedral silver orthophosphate microparticles</i>), mikrocząstki fosforanu (V) srebra w kształcie dwunastościennym
ROS	(ang. <i>reactive oxygen species</i>), reaktywne formy tlenu
s-SOMPs	(ang. <i>spherical silver orthophosphate microparticles</i>) mikrocząstki fosforanu (V) srebra w kształcie sferycznym
Saos-2	linia komórkowa kostniakomięsaka

SOD1	cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa, cynkowo - miedziowa
SOD2	mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa, manganowa
SOD3	zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa, cynkowo - miedziowa
SOMPs	<i>(ang. silver orthophosphate microparticles)</i> , mikrocząstki fosforanu (V) srebra
t-SOMPs	<i>(ang. tetrapod silver orthophosphate microparticles)</i> mikrocząstki fosforanu (V) srebra w kształcie tertrapodalnym
TEM	transmisyjny mikroskop elektronowy
th-SOMPs	<i>(ang. tetrahedral silver orthophosphate microparticles)</i> mikrocząstki fosforanu (V) srebra w kształcie czworościennym

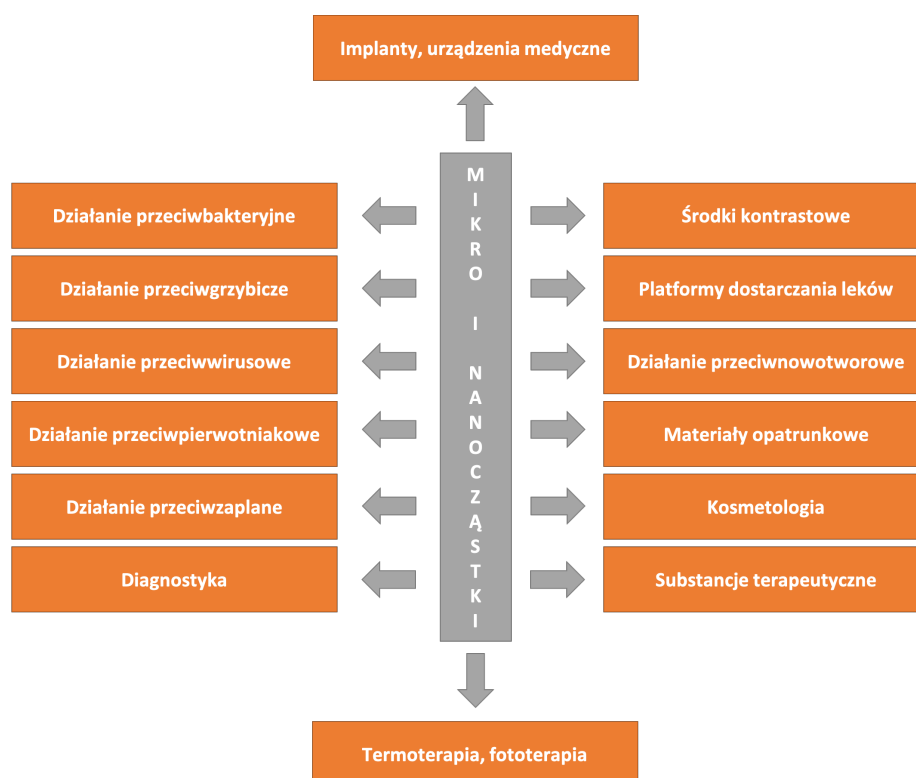
II. WPROWADZENIE

Nowoczesne biomateriały takie jak mikrocząstki (MPs) i nanocząstki (NPs) dzięki swoim unikalnym właściwościom mogą być wykorzystywane w profilaktyce i leczeniu chorób człowieka. Badania na temat MPs i NPs są nową, prężnie rozwijającą się dziedziną nauki, na co wskazuje rosnąca liczba doniesień literaturowych. Do końca 2019 roku w bazie PubMed indeksowano ponad 230 000 artykułów o tej tematyce, z wyraźnym wzrostem ich liczby w ostatnim dziesięcioleciu. Obserwuje się również znaczny wzrost liczby produktów z dodatkiem NPs, co przekłada się również na wzrost wartości tej gałęzi gospodarki [1,2]. Należy pokreślić, że właściwości NPs są zdecydowanie lepiej poznane niż właściwości MPs. Jednakże, podział na mikrocząstki i nanocząstki ma charakter umowny, a w terminologii naukowej nie ma jasnych kryteriów rozdziału między nimi. Celem ujednoczenia nazewnictwa stosowałem wytyczne Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC), zgodnie z którymi mikrocząstkami nazywamy struktury, których rozmiar mieści się w zakresie od 10^{-7} m do 10^{-4} m, a nanocząstkami takie, których rozmiar mieści w zakresie od 10^{-9} m do 10^{-7} m [3]. Natomiast według Komisji Europejskiej (zalecenie 2011/696/UE), nanomateriały to takie produkty, w których 50% rozkładu liczbowego wielkości cząstek ma jeden lub więcej wymiarów w zakresie 1 nm. - 100 nm. [4]. Jednakże, od powyższej definicji są pewne wyjątki takie jak fulereny, płytki grafenowe oraz jednościenne nanorurki węglowe, o co najmniej jednym wymiarze poniżej 1 nm. [4]. Zatem MPs i NPs są większe od cząsteczek organicznych (takich jak DNA czy białka), ale mniejsze od wirusów, bakterii czy komórek eukariotycznych. Niewielkie rozmiary w sposób znaczący wpływają na zmianę ich właściwości fizyko-chemicznych, w odniesieniu do odpowiedników w skali makro. Mikrocząstki i nanocząstki wykazują szereg korzystnych właściwości, m.in.: wysoki stosunek pola powierzchni do objętości, zdolność penetrowania przez błony komórkowe i bariery biologiczne oraz wysoką reaktywność [5]. Należy również wspomnieć o wielokierunkowych możliwościach funkcjonalizacji MPs i NPs, co znacznie zwiększa możliwości zastosowania ich w aspekcie biomedycznym [5]. MPs i NPs znajdują zastosowanie w biologii, chemii, medycynie, ochronie środowiska, genetyce, biotechnologii czy przemyśle [5–8] (Rycina 1.).



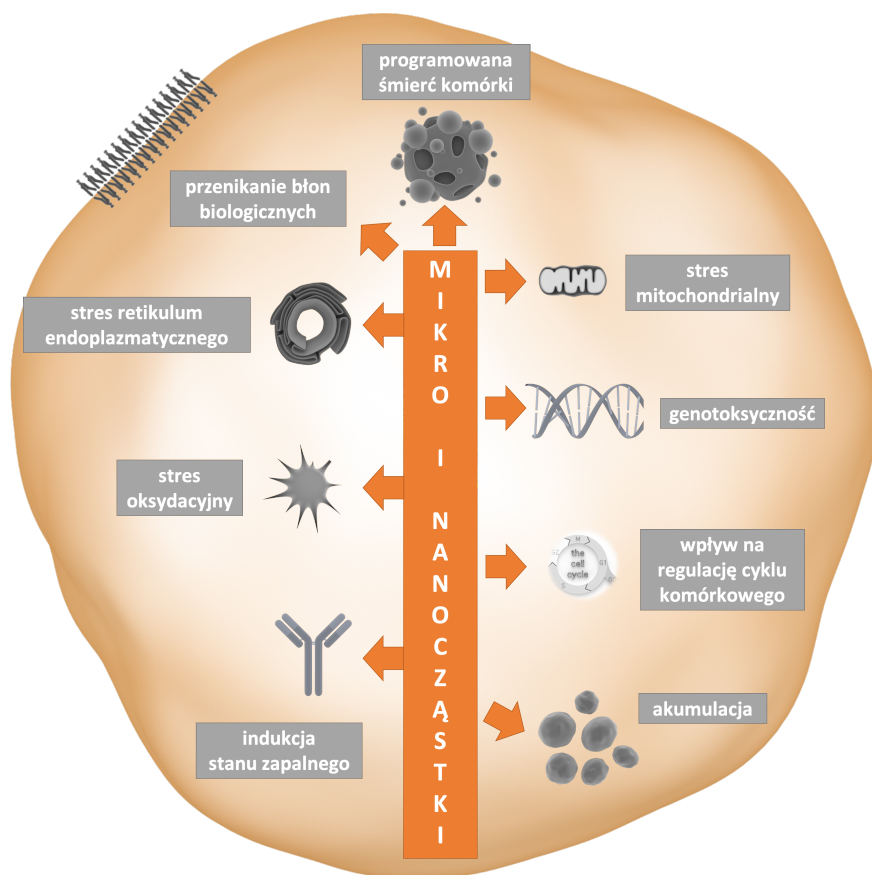
Rycina 1. Zastosowanie praktyczne mikrocząstek i nanocząstek [9]

W badaniach wchodzących w skład mojej pracy doktorskiej wykorzystałem mikrocząstki i nanocząstki metali szlachetnych i ich związków. Nanocząstki srebra (AgNPs) wykazują silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe, antyagregacyjne i fibrynolityczne [10–12]. Warto podkreślić, że AgNPs charakteryzuje aktywność przeciwbakteryjna również przeciwko biofilmowi i szczepom wielolekoopornym [6, 13]. Korzystne cechy warunkują wielokierunkowe zastosowanie nanocząstek, czego dowodem jest fakt, że AgNPs stanowią 30% NPs produkowanych w celach komercyjnych [14]. Nanocząstki złota (AuNPs) również charakteryzują się właściwościami przeciwnowotworowymi, ponadto są wykorzystywane w immunoterapii, diagnostyce obrazowej oraz jako biosensory [15–19]. AuNPs dodatkowo znalazły zastosowanie w diagnostyce chorób, np. gruźlicy [20]. AuNPs i AgNPs są również wykorzystywane jako platformy dostarczania leków [21, 22]. Mikrocząstki, np. fosforanu (V) srebra, tlenku miedzi (II) czy tlenku srebra również wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe [23–26]. Zarówno MPs, jak i NPs posiadają szereg korzystnych właściwości biologicznych co przekłada się na możliwość ich biomedycznego wykorzystania (rycina 2).



Rycina 2. Potencjalne zastosowanie mikrocząstek i nanocząstek w naukach biomedycznych

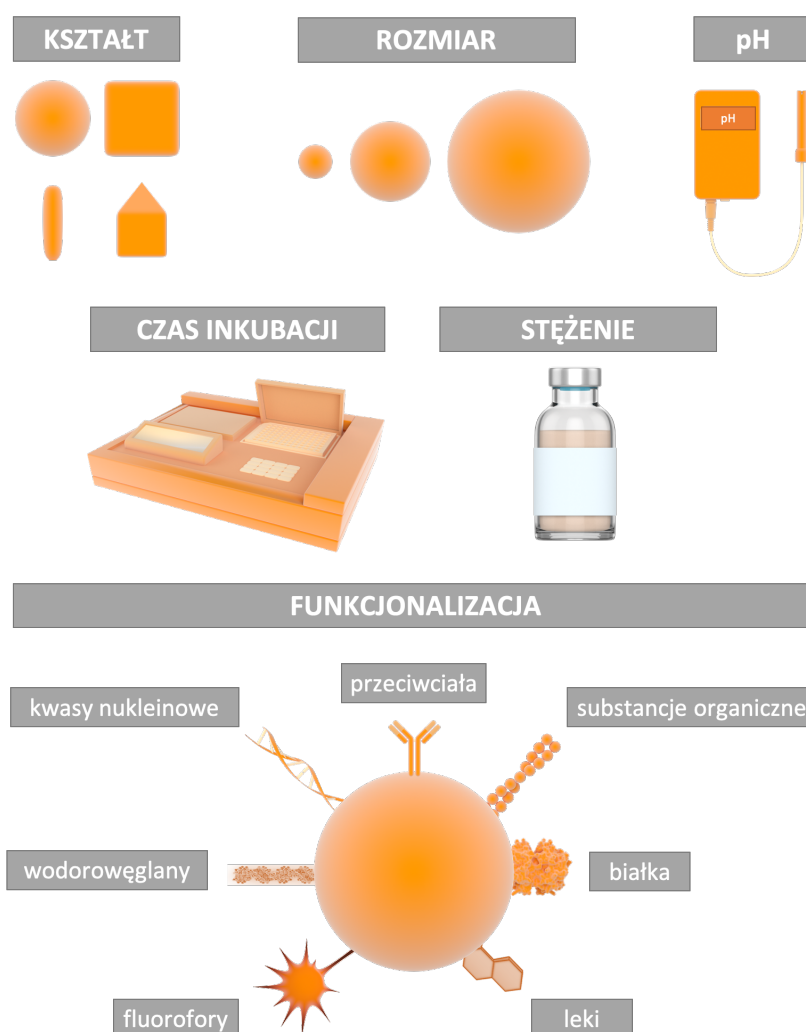
Niestety, nie do końca poznane działanie toksyczne i trudne do przewidzenia zagrożenia dla zdrowia człowieka ogranicza zastosowanie kliniczne MPs i NPs. Dotychczasowe badania dowodzą, że zarówno AgNPs, jak i AuNPs mogą być cytotoksyczne względem ludzkich osteoblastów, komórek fibroblastów dziąseł, progenitorowych komórek neuronalnych czy makrofagów [27–31]. Indukowanie stresu oksydacyjnego jest jednym z głównych mechanizmów cytotoksyczności NPs metali, jednakże działanie prozapalne czy powodowanie zaburzeń w wewnątrzkomórkowej puli wapnia jest również opisywane [28, 29, 32]. W efekcie ekspozycja na działanie NPs może prowadzić do śmierci komórki na drodze apoptozy, nekroptozy, nekrozy lub autofagii [33–39]. Mechanizmy cytotoksyczności MPs nie są dobrze poznane. Wykazano, że mikrocząstki hydroksyapatytu są cytotoksyczne względem ludzkich makrofagów, a mikrocząstki krzemionki względem komórek nowotworu piersi [40, 41]. Jednym z opisanych mechanizmów cytotoksyczności mikrocząstek jest indukcja stresu oksydacyjnego i wpływ na regulację cyklu komórkowego [42, 43]. Podsumowanie wybranych mechanizmów cytotoksyczności MPs i NPs na poziomie molekularnym i komórkowym przedstawiłem na rycinie 3.



Rycina 3. Wybrane mechanizmy cytotoksyczności mikrocząstek i nanocząstek na poziomie komórkowym i molekularnym

Zarówno korzystne właściwości jak i toksyczność MPs i NPs zależą od wielu czynników. Funkcjonalizacja MPs i NPs może wpłynąć na poprawę ich profilu bezpieczeństwa jednocześnie nie upośledzając ich korzystnych właściwości. Szereg czynników moduluje właściwości MPs i NPs, a do najlepiej poznanych należą ich: rodzaj, wielkość, kształt, czas inkubacji, stężenie, pH środowiska oraz właściwości powierzchni. Ponadto właściwości biologiczne MPs i NPs zależą od rodzaju narażonych na ich działanie komórek. Podsumowanie czynników wpływających na właściwości MPs i NPs przedstawiłem na rycinie 4. Wielu autorów wskazuje, że im mniejsze MPs i NPs tym większa jest ich cytotoksyczność [30, 42, 44]. Jednakże, pojawiają się prace wykazujące wyższą cytotoksyczność MPs i NPs o większych rozmiarach [45]. Podobnie, wraz ze wzrostem stężenia i czasu inkubacji, obserwowany jest wzrost cytotoksyczności [46–48]. Również kształt wpływa na cytotoksyczność NPs i MPs, aczkolwiek ze względu na możliwość przyłączenia substancji biologicznie czynnych do powierzchni MPs i NPs o kształcie sferycznym, są one obecnie coraz częściej wykorzystywane [49]. Do powierzchni biomateriałów kowalencyjnie lub niekowalencyjnie można przyłączyć

między innymi fluorofory, leki, przeciwciała, kwasy nukleinowe, białka, wodorowęglany czy substancje organiczne takie jak poli(tlenek etylenu), (PEG) lub zredukowany glutation (GSH) [50, 51]. Funkcjonalizacja MPs i NPs za pomocą GSHa lub PEGu znacznie zwiększa ich biokompatybilność. Ponadto, PEG poprawia rozpuszczalność w wodzie i zapobiega opłaszczeniu przez białka, co wydłuża czas półtrwania w krwioobiegu [30]. Natomiast GSH ma silne właściwości antyoksydacyjne, co zmniejsza cytotoksyczność wynikającą z indukcji stresu oksydacyjnego przez MPs i NPs [30, 52]. Sugeruje się, że przyłączenie chemioterapeutyków do nanocząstek pozwala na stworzenie biomateriałów o lepszych właściwościach przeciwnowotworowych niż same leki (lepsza zdolność penetrowania guza nowotworowego, przełamywanie mechanizmów lekooporności) [53–55]. Podobnie połączenie nanocząstek z antybiotykami pozwala na osiągnięcie synergistycznego efektu przeciwdrobnoustrojowego [56, 57].



Rycina 4. Podsumowanie wybranych czynników wpływających na właściwości biologiczne mikrocząstek i nanocząstek

Mimo niezaprzecznego rozwoju medycyny jaki dokonał się w ostatnich dekadach, wciąż nie znaleziono efektywnego sposobu leczenia wielu chorób. Dzięki swoim unikalnym właściwościom, MPs i NPs mogą znaleźć zastosowanie kliniczne. Ponadto, zastosowanie farmaceutyków w skali mikro i nano pozwala na zmniejszenie dawek leku, co przekłada się na obniżenie kosztów terapii jak i jej skutków ubocznych [58, 59]. Choroby nowotworowe i zakażenia, które związane są z postępowaniem cywilizacyjnym i wydłużaniem się średniej długości życia człowieka, są ogromnym wyzwaniem współczesnej medycyny. W ramach badań wchodzących w skład mojej rozprawy doktorskiej, podjąłem próbę odpowiedzi na pytanie jak funkcjonalizacja mikrocząstek i nanocząstek wpływa na ich właściwości przeciwbakteryjne i cytotoksyczne względem komórek nowotworowych. W Polsce i innych krajach rozwiniętych nowotwory stanowią drugą, po chorobach układu sercowo-naczyniowego, przyczynę zgonów [60]. Badania prowadziłem z użyciem modeli komórkowych trzech nowotworów: raka piersi, raka trzustki oraz kostniakomięsaka. Choroby te są ważnymi problemem zarówno z epidemiologicznego, jak i ekonomicznego punktu widzenia. Nowotwór piersi jest najczęstszą chorobą nowotworową kobiet [60]. Nowotwór trzustki charakteryzuje się niskim odsetkiem 5-cio letnich przeżycia (ok 6%), a jego leczenie jest kosztowne (>65 tys. USD/pacjenta) [61, 62]. Natomiast kostniakomięsak to trzeci najczęstszy nowotwór populacji pediatrycznej, jednakże może on wystąpić w każdym wieku [63]. Leczenie chemiczne tych nowotworów rzadko pozwala na całkowite wyleczenie, zaś leczenie chirurgiczne jest okaleczające. Ponadto każda z tych metod obarczona jest powikłaniami, które znacząco obniżają jakość życia pacjenta.

Infekcje stanowią częsty problem medyczny, szacuje się że 3-5% pacjentów poddanych operacjom ortopedycznym i nawet 40% pacjentów z wszczepionymi sztucznymi materiałami do układu krążenia boryka się z zakażeniami związanymi z implantami, a tylko w USA roczne koszty leczenia powikłań związanych z implantacjami szacuje się na 3,3 miliarda USD [64, 65].

Dotychczasowe dane literaturowe nie pozwalają w sposób jednoznaczny określić wpływu modyfikacji mikrocząstek i nanocząstek na ich właściwości biologiczne. W związku z tym, konieczne są szczegółowe badania na temat wpływu właściwości fizykochemicznych MPs i NPs na ich aktywność względem komórek prokariotycznych i eukariotycznych (zarówno nowotworowych, jak i nietransformowanych nowotworowo).

III. CELE PRACY

Cel główny:

Ocena wpływu modyfikacji (kształtu, rozmiaru, funkcjonalizacji) nanocząstek i mikrocząstek na ich właściwości biologiczne: cytotoksyczność, właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz potencjalną aktywność przeciwnowotworową w badaniach *in vitro*.

Cele szczegółowe:

- 1) Ocena wpływu kształtu nanocząstek złota na ich selektywną aktywność cytotoksyczną względem komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami nietransformowanymi nowotworowo.
- 2) Ocena potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych sferycznych nanocząstek złota sprzężonych z glutationem i funkcjonalizowanych chemioterapeutykami (doksorubicyną, gemcytabiną, cytarabiną).
- 3) Ocena wpływu kształtu mikrocząstek fosforanu (V) srebra na ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe i cytotoksyczność.
- 4) Ocena cytotoksycznych efektów oddziaływania nanocząstek i mikrocząstek z nietransformowanymi nowotworowo i nowotworowymi komórkami kości.

IV. MATERIAŁY I METODY

Mikrocząstki i nanocząstki

Nanocząstki złota w kształcie gwiazd, prętów i sfer zostały zsyntezowane przez zespół chemików z Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Adriany Zaleskiej-Medynskiej.

Mikrocząstki fosforanu (V) srebra w kształcie: tetrapodalnym, sferycznym, czworościennym, sześciennym, rozgałęzionym oraz dwunastościennym zostały zsyntezowane przez zespół chemików z Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Adriany Zaleskiej-Medynskiej.

Nanocząstki złota stabilizowane glutationem i sprzężone z chemioterapeutykami (doksorubicyną, gemcytabiną lub cytarabiną) zostały zsyntezowane przez zespół chemików z Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr. Michała Wójcika.

Hodowle komórkowe

W badaniach wykorzystano linie komórkowe: ludzkich płodowych osteoblastów (hFOB1.19), mysich preosteoblastów (MC3T3-E1), trzy linie komórkowe kostniakomięsa (143B, MG63, Saos-2), fibroblastów skóry (HDF), mysich mioblastów (C2C12), ludzkiego raka epitheloidalnego komórek trzustkowych (PANC-1), komórek przewodu trzustkowego (hTERT-HPNE), gruczolakoraka piersi (MCF7) oraz komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego (MCF10A). Linie komórkowe hFOB1.19, MC3T3-E1, 143B, MG63, Saos-2, HDF, PANC-1, hTERT-HPNE, MCF7, oraz MCF10A pochodziły z American Type Culture Collection (ATCC), a linia C2C12 z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Hodowla komórkowa była prowadzona w standardowych warunkach [66–68].

Ocena cytotoksycznego działania mikrocząstek i nanocząstek

Do oceny cytotoksycznego wpływu mikrocząstek i nanocząstek na linie komórkowe wykorzystano testy kolorymetryczne oparte na: (1) pomiarze aktywności metabolicznej komórek (MTT), (2) ilościowym pomiarze syntezy DNA w komórce (BrdU) oraz (3) ocenie zdolności gromadzenia czerwieni obojętnej w lizosomach komórki i integralności błon komórkowych (NR) [69–71].

Ocena internalizacji mikrocząstek i nanocząstek oraz indukowania zmian na poziomie ultrastruktury komórki

Zdolność przenikania przez błonę komórkową, lokalizację na poziomie komórkowym oraz indukowanie zmian na poziomie ultrastrukturalnym przez mikrocząstki i nanocząstki określono za pomocą Transmisyjnej Mikroskopii Elektronowej (TEM). Morfologia komórek była również oceniana za pomocą mikroskopii kontrastowo-fazowej.

Ocena poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu

Poziom wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS) oceniono przy użyciu cytometrii przepływowej z dwuocentanem 2,7 – dichlorofluoresceiny (DCF-DA) i analizowano przy użyciu programu CellQuest Pro.

Analiza cyklu komórkowego

Wpływ mikrocząstek fosforanu (V) srebra na regulację cyklu komórkowego oceniono za pomocą cytometrii przepływowej z barwieniem jodkiem propidyny (PI) i analizowano przy użyciu programu CellQuest Pro.

Oznaczenie całkowitego poziomu białka

Oznaczenie całkowitej zawartości białka w próbkach zostało wykonane metodą Bradforda [72].

Oznaczenie poziomu wybranych białek

Metodą Western-blot określono poziomy białek markerów: apoptozy (Bax, Bcl-2) i stanu zapalnego (MMP1, MMP3, NF- κ B), systemu antyoksydacyjnego komórki (SOD1, SOD2, SOD3, GPX4) oraz białek związanych z tworzeniem cytoszkieletu (p16-ARC).

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA) i testu post-hoc Tukey'a. Wartość IC₅₀ wyznaczono za pomocą analizy nieliniowej regresji log(inhibitor) vs znormalizowana odpowiedź. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie GraphPad Prism (przedział ufności = 95%, $\alpha=0,05$).

V. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

W skład mojej pracy doktorskiej wchodzi cztery prace (trzy oryginalne i jedna pogładowa) opublikowane w międzynarodowych czasopismach indeksowanych na Liście Filadelfijskiej. Artykuły skupiają się na tematyce wpływu modyfikacji na właściwości cytotoksyczne i przeciwbakteryjne nanocząstek i mikrocząstek, ze szczególnym uwzględnieniem komórek kości.

Publikacja 1.

Steckiewicz KP, Inkielewicz-Stępnia I.: *Modified nanoparticles as potential agents in bone diseases: cancer and implant-related complications*; *Nanomaterials*. 2020; 10:658

Problemy chorób kośćca dotyczą znacznego odsetka populacji, a wraz ze wzrastającą średnią długością życia, liczba osób dotkniętych tymi schorzeniami będzie rosła. W pracy dokonaliśmy przeglądu literatury na temat potencjalnej roli nanocząstek w profilaktyce i leczeniu wybranych problemów współczesnej ortopedii: nowotworów oraz powikłań związanych z alloplastykami stawów. Szczególny nacisk położyliśmy na wpływ modyfikacji nanobiomateriałów na ich korzystne właściwości i cytotoksyczność. Uwzględniliśmy również wpływ NPs na nietransformowane nowotworowo komórki kości, w celu określenia ich bezpieczeństwa w zastosowaniu klinicznym.

Publikację rozpoczęliśmy od krótkiego wprowadzenia do tematyki, którą zajmuje się nanotechnologia, zdefiniowaliśmy czym są nanocząstki, a także porównaliśmy ich rozmiar do innych obiektów. Następnie przybliżyliśmy historię nanotechnologii oraz jej współczesne zastosowania.

W głównej części pracy omówiliśmy tematykę nowotworów kości i potencjalną rolę NPs w ich leczeniu. Nanocząstki mogą być bezpośrednio cytotoksyczne względem linii komórkowych kostniakomięsak, wykazano również ich skuteczność w leczeniu tej choroby w warunkach *in vivo*. Zarówno nieorganiczne jak i organiczne NPs wykazują aktywność przeciwnowotworową, która zależy od rodzaju NPs, ich kształtu, stężenia, a także pH środowiska. NPs mogą wykazywać również aktywność cytotoksyczną względem innych nowotworów kości jakimi są chrzęstniakomięsak, włókniamięsak,

czy mięsak Ewinga. Warto podkreślić, że nowotworowe linie komórkowe są zazwyczaj bardziej wrażliwe na NPs niż linie nietransformowane nowotworowo. Poza bezpośrednią cytotoksycznością względem komórek nowotworowych, nanocząstki mogą być wykorzystane jako nośniki leków, co jest szczególnie istotne, gdy właściwości fizykochemiczne chemioterapeutyków (np. rozpuszczalność w wodzie) utrudniają ich wykorzystanie praktyczne. Zdolność NPs do akumulacji w mikrośrodowisku guza pozwala zmniejszyć toksyczność i zwiększyć efektywność leczenia. Nanocząstki mogą być sprzęgane z „klasycznymi” chemioterapeutykami (doksorubicyna, etopozyd, cytarabina, gemcytabina i inne), substancjami obecnie nieużywanymi w leczeniu (kurkumina) jak i z kwasami nukleinowymi. Ponadto magnetyczne nanocząstki, dzięki swoim unikatowym właściwościom, mogą być wykorzystane w termoterapii kostniakomięsaka. Warto podkreślić, że skuteczność NPs została wykazana zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*.

W drugiej części publikacji podjęliśmy tematykę problemów, jakie stwarza wprowadzenie implantu do układu szkieletowego, czyli zakażeń i niskiej biokompatybilności. Omówiliśmy fizjologiczne podstawy, które powodują pojawienie się tych problemów, a następnie opisaliśmy jakie nanocząstki mogłyby im potencjalnie zapobiegać. Szereg nanocząstek zwiększa biokompatybilność implantów. Należą do nich między innymi nanocząstki srebra (AgNPs), tytanu, tlenku cynku czy hydroksyapatytu (HA-NPs). NPs mogą być również wykorzystane w medycynie regeneracyjnej do różnicowania komórek kości z komórek macierzystych. Właściwości te posiadają między innymi HA-NPs, AgNPs czy AuNPs. Ponadto NPs mogą wykazywać właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe oraz przeciwpasożytnicze. Najlepiej przebadane są pod tym względem AgNPs, ale takie właściwości posiadają między innymi AuNPs, NPs miedzi, NPs tlenków metali, NPs organiczne. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe NPs zależą od ich rodzaju, rozmiaru, kształtu oraz funkcjonalizacji.

Publikację zakończyliśmy podsumowaniem danych na temat bezpieczeństwa klinicznego zastosowania nanocząstek. Omówiliśmy ich cytotoksyczność względem nietransformowanych nowotworowo linii komórkowych kości, a także zestawiliśmy te informacje z toksycznością obecnie używanych leków. Opisaliśmy również zdobycze nanotechnologii, które są obecnie dopuszczone do stosowania w medycynie.

Podsumowując, praca stanowi wstęp do dalszych rozważań na temat wpływu modyfikacji biomateriałów na ich właściwości biologiczne, ze szczególnym

uwzględnieniem komórek kości. Wykazaliśmy, że NPs wykazują wiele korzystnych właściwości, które mogą być wykorzystane w chorobach kości. Ponadto opisaliśmy szereg czynników modyfikujących właściwości farmakologiczne i toksykologiczne NPs (rodzaj NPs, kształt NPs, stężenie, czas inkubacji, pH środowiska, funkcjonalizacja, rodzaj substancji stabilizujących i inne). Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, jest to pierwsza publikacja, która w tak szczegółowy sposób omawia niniejszą tematykę.

Publikacja 2.

Steckiewicz KP, Barcińska E, Malankowska A, Zauszkiewicz-Pawlak A, Nowaczyk G, Zaleska-Medynska A, Inkielewicz-Stępnik I.: *Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model: evaluation of the safety of use and anti-cancer potential*; J Mater Sci Mater Med. 2019;30(2):22

Mimo dynamicznego rozwoju medycyny, leczenie onkologiczne jest wciąż obciążone poważnymi powikłaniami i dużym odsetkiem niepowodzeń terapeutycznych. Dlatego zdecydowaliśmy się zająć problematyką wpływu modyfikacji NPs na ich potencjalne właściwości przeciwnowotworowe.

W pracy postanowiliśmy ocenić wpływ kształtu nanocząstek złota na ich aktywność cytotoksyczną względem komórek kostniakomięsaka. Zbadaliśmy również wpływ AuNPs w różnych kształtach na nietransformowane nowotworowo linie komórkowe kości.

W publikacji scharakteryzowano i wykorzystano trzy kształty nanocząstek złota: gwiazdy (170 - 260 nm.), pręty (długość ok. 45 nm., szerokość 16 nm.) oraz sfery (średnica 6 - 22 nm.). Badania biologiczne przeprowadziliśmy na liniach komórkowych kostniakomięsaka (143B i MG63) oraz nietransformowanej nowotworowo linii komórkowej ludzkich płodowych osteoblastów (hFOB1.19). Zdecydowaliśmy się na wykorzystanie w eksperymentach dwóch nowotworowych linii komórkowych, ze względu na różnice w ich charakterystyce molekularnej. Linia komórkowa 143B szybciej dokonuje podziałów komórkowych oraz ma większą zdolność do migracji niż linia komórkowa MG63. Ponadto, komórki linii 143B mają większą zdolność do generowania przerzutów odległych. Podsumowując, charakterystyka komórek linii 143B wskazuje, że fenotypowo są one bardziej agresywne.

Po 24 - godzinnej inkubacji komórek z AuNPs, przy użyciu testów MTT i NR, wykazaliśmy zależną od kształtu, stężenia i rodzaju linii komórkowej cytotoksyczność AuNPs. AuNPs w kształcie gwiazd były najbardziej cytotoksyczne, a sferyczne wywierały najmniejszy efekt na żywotność komórek. Ponadto linie komórkowe wykazały różną wrażliwość na badane AuNPs. Linia komórkowa hFOB1.19 była najbardziej oporna na działanie cytotoksyczne AuNPs, a linia komórkowa 143B najmniej. Dowiedliśmy, że obie linie nowotworowe były bardziej wrażliwe na nanocząstki w porównaniu z linią nietransformowaną nowotworowo. Warto podkreślić, że komórki „bardziej agresywnej” linii 143B były również bardziej wrażliwe na NPs. Ponadto metodą Western-blot wykazaliśmy, że AuNPs w kształcie gwiazd i prętów powodują zwiększoną produkcję proapoptotycznego białka Bax i spadek poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2 w komórkach. Analiza zdjęć TEM wykazała, że AuNPs gwiazdy (w stężeniu 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ulegają internalizacji i lokalizują się w cytoplazmie i jądrze komórkowym, a także powodują zwiększoną wakuolizację komórki. Ponadto nanocząstki te w wyższych stężeniach (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) powodują degradację komórki i przerwanie ciągłości błony komórkowej. Natomiast AuNPs pręty (w stężeniu 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ulegają internalizacji i lokalizują się w endosomach, a w wysokich stężeniach (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) powodują degradację komórki.

Podsumowując, wykazaliśmy, że efekty biologiczne AuNPs zależą od ich kształtu. Efekt działania nanocząstek zależy również od stężenia i rodzaju linii komórkowych przy wyraźnej różnicy między liniami nowotworowymi i nietransformowanymi nowotworowo. AuNPs obniżają żywotność komórek i mogą powodować ich apoptozę. AuNPs, w kształcie gwiazd mają największą aktywność przeciwnowotworową, a sferyczne AuNPs wykazują najlepszy profil bezpieczeństwa w badaniach *in vitro*. Jako pierwszy zespół na świecie określiliśmy wpływ nanocząstek złota w różnych kształtach na ludzkie płodowe osteoblasty i komórki kostniakomięsaka.

Publikacja 3.

Steckiewicz KP, Barcińska E, Sobczak K, Tomczyk E, Wójcik M, Inkielewicz-Stępniaik I.: *Assessment of anti-tumor potential and safety of application of glutathione stabilized gold nanoparticles conjugated with chemotherapeutics*; Int J Med Sci. 2020;17(6)

Na podstawie badań wstępnych oraz wniosków płynących z omówionej wyżej publikacji [68] na temat roli kształtów AuNPs na ich aktywność przeciwnowotworową *in vitro* i profil bezpieczeństwa, do dalszych badań wybraliśmy sferyczne nanocząstki złota. Podjęliśmy próbę oceny możliwości wykorzystania AuNPs jako nośników leków. Połączenie leku z nanocząstką miało na celu poprawę skuteczności terapii, łagodzenie działań niepożądanych i tym samym obniżenie kosztów leczenia. Dodatkowo zdecydowaliśmy się ustabilizować nanocząstki za pomocą GSH, co miało zapewnić stabilniejsze połączenie nanocząstka - lek jak i wpłynąć na poprawę profilu bezpieczeństwa, poprzez zmniejszenie cytotoksyczności względem komórek nietransformowanych nowotworowo.

W pracy oceniliśmy potencjał sferycznych AuNPs stabilizowanych GSH jako platform dostarczania chemioterapeutyków. Określiliśmy wpływ badanych nanocząstek na nowotworowe i nietransformowane nowotworowo linie komórkowe.

W publikacji scharakteryzowano cztery rodzaje sferycznych AuNPs. Sferyczne AuNPs stabilizowane GSH (AuNPs-GSH), sferyczne AuNPs stabilizowane GSH i sprzężone odpowiednio z dokсорubicyną (AuNPs-GSH-DOX) cytarabiną (AuNPs-GSH-CTA) oraz z gemcytabiną (AuNPs-GSH-GEM). Byliśmy pierwszym zespołem, na świecie który zsyntetyzował i zbadał właściwości biologiczne AuNPs-GSH-CTA. Badania biologiczne prowadziliśmy na modelach komórkowych: kostniakomięsaka (143B), nowotworu trzustki (PANC1) i nowotworu piersi (MCF7) oraz na liniach komórkowych będących nietransformowanymi nowotworowo odpowiednikami tych tkanek (hFOB1.19, hTERT-HPNE, MCF10A). Porównaliśmy również skuteczność uzyskanych koniugatów nanocząstek i chemioterapeutyków do samych leków. Zdecydowaliśmy się użyć aż sześciu linii komórkowych o różnej charakterystyce molekularnej, co dostarczyło nam informacji na temat wpływu NPs na różne rodzaje komórek i zwiększyło wiarygodność uzyskanych wyników.

Po 24-godzinnej inkubacji koniugatów NPs i leków wykazaliśmy, że ich właściwości biologiczne zależą od: rodzaju chemioterapeutyku, stężenia, oraz typu linii komórkowej. NPs sprzężone z lekami były bardziej cytotoksyczne od AuNPs-GSH, a nowotworowe linie komórkowe były bardziej wrażliwe na działanie NPs w porównaniu z liniami nietransformowanymi nowotworowo. Wykazaliśmy, że w wybranych warunkach NPs mogą być selektywnie cytotoksyczne jedynie wobec komórek nowotworowych, a także być skuteczniejsze od samych chemioterapeutyków.

Uzyskane wyniki sugerują, że połączenie NPs - lek może zmniejszyć toksyczność leczenia, koszty i jednocześnie poprawić skuteczność terapii.

Podsumowując wykazaliśmy, że AuNPs mogą być wykorzystane jako skuteczne nośniki leków przeciwnowotworowych. Ich właściwości zależą od modyfikacji: stabilizacji za pomocą GSH, obecność i rodzaju przyłączanego chemioterapeutyku.

Publikacja 4.

Steckiewicz KP, Zwara J, Jaśkiewicz M, Kowalski S, Kamysz W, Zaleska-Medynska A, Inkielewicz-Stępnia I.: *Shape-depended biological properties of Ag₃PO₄ microparticles evaluation of antimicrobial properties and cytotoxicity in in vitro model - safety assessment of potential clinical usage*; Oxid Med Cell Longev. 2019; 2019:6740325.

Na podstawie naszych wcześniejszych doświadczeń, podjęliśmy próbę odpowiedzi na pytanie, czy MPs wykorzystane do opracowania nowoczesnych biomateriałów mogą pomóc w rozwiązaniu jednego z ważniejszych problemów nowoczesnej ortopedii – powikłań infekcyjnych związanych z alloplastykami stawów. Ponownie postawiliśmy pytanie, jak modyfikacja MPs (kształt) wpłynie na ich właściwości biologiczne. W badaniach wykorzystaliśmy MPs fosforanu (V) srebra; ich budowa miała zwiększyć biokompatybilność (dzięki obecności fosforu, który jest ważnym elementem budulcowym kości) oraz zapewnić właściwości przeciwdrobnoustrojowe (dzięki obecności srebra, o udowodnionym działaniu przeciwbakteryjnym). Zdecydowaliśmy się zaprojektować MPs, gdyż dzięki swoim nieco większym rozmiarom powinny być mniej cytotoksyczne. Większy rozmiar miał również ograniczyć ich przenikanie do krwiobiegu i powodowanie odległej narządowej toksyczności przy wprowadzaniu do organizmu żywego.

W pracy oceniliśmy wpływ kształtu MPs fosforanu (V) srebra na ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz cytotoksyczność względem komórek ssaków, ze szczególnym uwzględnieniem komórek kości. Zaproponowaliśmy również mechanizmy cytotoksyczności MPs fosforanu (V) srebra.

W publikacji opisano metodykę syntezy i scharakteryzowano pod względem fizykochemicznym sześć kształtów MPs fosforanu (V) srebra (SOMPs): sferyczne (s-SOMPs), sześciennie (c-SOMPs), czworościennie (th-SOMPs); dwunastościennie (rd-SOMPs), rozgałęzione (b-SOMPs) oraz tetrapodalne (t-SOPMs).

Badania mikrobiologiczne wykonano na szczepach *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus (MRSA)*, *Candida albicans* oraz *Aspergillus niger*. Do oceny cytotoksyczności SOMPs wykorzystano linie komórkowe kości (hFOB1.19, MC3T3-E1, Saos-2), mięśni (C2C12) oraz skóry (HDF).

Wykazaliśmy, że właściwości przeciwdrobnoustrojowe SOMPs zależą od ich kształtu oraz rodzaju patogenu. Szczepy grzybicze były bardziej wrażliwe na SOMPs niż bakteryjne. c-SOMPs oraz s-SOMPs wykazywały największą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Co ważne, SOMPs były skuteczne zarówno względem planktonicznych form drobnoustrojów jak i względem biofilmu, jednakże wartości MIC był mniejsze od MBEC.

Cytotoksyczność SOMPs (mierzona testami MTT i BrdU) zależała od ich stężenia, kształtu i rodzaju badanej linii komórkowej. c-SOMPs były najbardziej, a t-SOMPs - najmniej cytotoksyczne. Linia komórkowa hFOB1.19 była najbardziej, a linia C2C12 - najmniej oporna na działanie SOMPs. Warto podkreślić, że SOMPs wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową w stężeniach nietoksycznych dla komórek ssaków. Na podstawie wstępnych wyników badań do dalszych eksperymentów wytypowaliśmy c-SOMPs, s-SOMPs, oraz b-SOMPs. Wykazaliśmy, że SOMPs mogą indukować wewnątrzkomórkową produkcję ROS, a także wpływać na poziom białek systemu antyoksydacyjnego (SOD1, SOD2, SOD3, GPX4), związanych ze stanem zapalnym (MMP1, MMP3, NF- κ B) oraz związanych z cytoszkieletem (p16-ARC). Jedynie c-SOMPs miały wpływ na regulację cyklu komórkowego zmniejszając liczbę komórek w fazie G0/G1. Pomimo wpływu na poziom białka związanego z cytoszkieletem, analiza zdjęć TEM nie wykazała zmian w ultrastrukturze komórki. SOMPs nie ulegały również internalizacji.

Podsumowując, właściwości przeciwdrobnoustrojowe i cytotoksyczność SOMPs zależą od ich kształtu. Wykazaliśmy, że cytotoksyczność SOMPs wynika z indukcji stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego. Nasze badania dowodzą, że s-SOMPs mają najkorzystniejsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe i najlepszy profil bezpieczeństwa w warunkach *in vitro*. Byliśmy pierwszym zespołem na świecie, który zbadał wpływ SOMPs na komórki ssaków.

VI. PODSUMOWANIE

Dzięki ogromnemu postępowi jaki dokonał się w nauce, zdobycze nanotechnologii mogą znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny między innymi w onkologii i ortopedii. Mikrocząstki i nanocząstki, z uwagi na korzystne spektrum aktywności biologicznej, są wykorzystywane w profilaktyce, diagnostyce i terapii chorób człowieka. Niestety, jak każde inne substancje terapeutyczne i biomateriały, mogą wykazywać działania niepożądane. Pomimo unikalnych właściwości, ze względu na potwierdzoną cytotoksyczność w eksperymentach *in vitro* i *in vivo*, zastosowanie kliniczne mikrocząstek i nanocząstek pozostaje nadal ograniczone.

Badania przeprowadzone w ramach mojej pracy doktorskiej wykazały, że właściwości farmakologiczne oraz cytotoksyczność mikrocząstek i nanocząstek w warunkach *in vitro* zależą od wielu czynników: rodzaju, kształtu, stężenia, rozmiaru oraz funkcjonalizacji. Dowiedliśmy, że aktywność biologiczna jest nierozdzielnie związana z ich właściwościami fizykochemicznymi. Dlatego tak ważne jest dokładne określenie mechanizmów cytotoksyczności MPs i NPs, a także zdefiniowanie czynników determinujących te właściwości. W naszych badaniach skupiliśmy się na ocenie wpływu modyfikacji MPs i NPs na działanie przeciwdrobnoustrojowe i cytotoksyczne, ze szczególnym uwzględnieniem problematyki schorzeń ortopedycznych, co w sposób istotny uzupełniło istniejącą lukę w aktualnej wiedzy. W artykule przeglądowym, uwzględniając najnowsze osiągnięcia naukowe, szczegółowo omówiliśmy znaczenie nanocząstek w rozwiązywaniu problemów współczesnej ortopedii. Natomiast w badaniach eksperymentalnych jako pierwsi na świecie określiliśmy wpływ kształtu nanocząstek złota na ich cytotoksyczność względem linii komórkowych kostniakomięsaka, oceniliśmy potencjał nanocząstek złota stabilizowanych glutationem jako nośnika cytarabiny oraz zbadaliśmy interakcję mikrocząstek fosforanu (V) srebra z liniami komórkowymi w badaniach *in vitro*. Wykazaliśmy, że dzięki unikalnym cechom mikrocząstki i nanocząstki mogą być potencjalnymi substancjami terapeutycznymi lub też służyć do opracowania biomateriałów. Uzyskane przez nas wyniki oraz zebrane dane literaturowe mogą okazać się pomocne w zaprojektowaniu mikrocząstek i nanocząstek zmodyfikowanych w taki sposób, aby zmaksymalizować ich korzystne działania biologiczne i jednocześnie poprawić profil bezpieczeństwa. Mamy nadzieje,

że zdobyta przez nas wiedza umożliwi praktyczne zastosowanie mikrocząstek i nanocząstek metali w leczeniu schorzeń ortopedycznych i onkologicznych człowieka.

Wykorzystanie mikrocząstek i nanocząstek w medycynie może przyczynić się do rozwiązania kluczowych problemów, z którymi boryka się ta dziedzina wiedzy. Odpowiednia modyfikacja mikrocząstek i nanocząstek może wpłynąć na poprawę ich profilu bezpieczeństwa i maksymalizację korzystnych właściwości biologicznych (farmakologicznych). Dużą nadzieję wiąże się z wykorzystaniem mikrocząstek i nanocząstek w chorobach kości: nowotworach i powikłaniach związanych z alloplastykami stawów. Dlatego, przyszłe badania powinny skupić się przede wszystkim na ich modyfikacji, w celu optymalnego wykorzystania w medycynie.

SUMMARY IN ENGLISH

I. LIST OF ABBREVIATIONS

143B	osteosarcoma cell line
AgNPs	silver nanoparticles
ATCC	American Type Cell Culture
AuNPs	gold nanoparticles
AuNPs-GSH	gold nanoparticles stabilized with glutathione
AuNPs-GSH-CTA	gold nanoparticles stabilized with glutathione and conjugated with cytarabine
AuNPs-GSH-DOX	gold nanoparticles stabilized with glutathione and conjugated with doxorubicin
AuNPs-GSH-GEM	gold nanoparticles stabilized with glutathione and conjugated with gemcitabine
b-SOMPs	branched silver orthophosphate microparticles
Bax	proapoptotic protein
Bcl-2	antiapoptotic protein
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
c-SOMPs	cubic silver orthophosphate microparticles
C2C12	murine myoblast cell line
CTA	cytarabine
DCF-DA	2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate
DNA	deoxyribonucleic acid
DOX	doxorubicin
ECDCC	European Collection of Authenticated Cell Culture
GEM	gemcitabine
GPX4	glutathione peroxidase 4
GSH	glutathione
HA-NPs	hydroxyapatite nanoparticles
HDF	dermal fibroblast cell line
hTERT-HPNE	human immortalized pancreas ductal cell line
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MBEC	minimal biofilm eradication concentration

MC3T3-E1	mouse preosteoblast cell line
MG-63	osteosarcoma cell line
MIC	minimal inhibitory concentration
MMP1	metalloproteinase 1
MMP3	metalloproteinase 3
MPs	microparticles
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NPs	nanoparticles
NR	neutral red
p16-ARC	actin-related protein 2/3 complex subunit 5
PANC1	pancreatic ductal adenocarcinoma cell line
PEG	poly (ethylene glycol)
PI	propionium iodine
rd-SOMPs	rhombic dodecahedral silver orthophosphate microparticles
ROS	reactive oxygen species
s-SOMPs	spherical silver orthophosphate microparticles
Saos-2	osteosarcoma cell line
SOD1	cytoplasmatic superoxide dismutase [Cu-Zn]
SOD2	mitochondrial superoxide dismutase [Mn]
SOD3	extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]
SOMPs	silver orthophosphate microparticles
t-SOMPs	tetrapod silver orthophosphate microparticles
TEM	transmission electron microscope
th-SOMPs	tetrahedral silver orthophosphate microparticles

II. INTRODUCTION

Modern biomaterials such as microparticles (MPs) and nanoparticles (NPs), due to their unique properties, can be used in the prevention and treatment of human diseases. Research on MPs and NPs is a novel but dynamically developing field of science, as indicated by the growing number of scientific reports. By the end of 2019, over 230,000 field-related articles have been indexed in by PubMed, with a significant increase in their number in the last decade. There is also a significant rise in the number of products with the addition of nanoparticles, which also increases the value of this branch of the industry [1,2]. It should be emphasized that the properties of NPs are much better known than the properties of MPs. However, the differentiation between microparticles and nanoparticles is arbitrary and there is no consensus in scientific terminology. In order to standardize the nomenclature, I used the guidelines of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), according to which microparticles are structures which size is in the range 10^{-7} - 10^{-4} m, and that of nanoparticles is in the range of 10^{-9} - 10^{-7} m [3]. However, according to the European Commission (Recommendation 2011/696/EU), nanomaterials are those products in which 50% of the numerical particle size distribution has one or more dimensions in the range 1 nm - 100 nm [4]. Nonetheless, there are some exceptions to the above definition such as fullerenes, graphene plates and single-walled carbon nanotubes with at least one dimension below 1 nm [4]. Thus, MPs and NPs are larger than organic molecules (such as DNA and proteins) but smaller than viruses, bacteria, and eukaryotic cells. The small size significantly changes their physicochemical properties in relation to their equivalents in the macro scale. Microparticles and nanoparticles possess favorable properties such as: high surface to volume ratio, ability to penetrate cell membranes and biological barriers, as well as high reactivity [5]. The multidirectional possibilities of NPs' and MPs' functionalization possibilities are also worth mentioning as they significantly amplify their potential for biomedical applications [5]. MPs and NPs are used in biology, chemistry, medicine, environmental protection, genetics, biotechnology and industry [5-8] (Figure 1.).

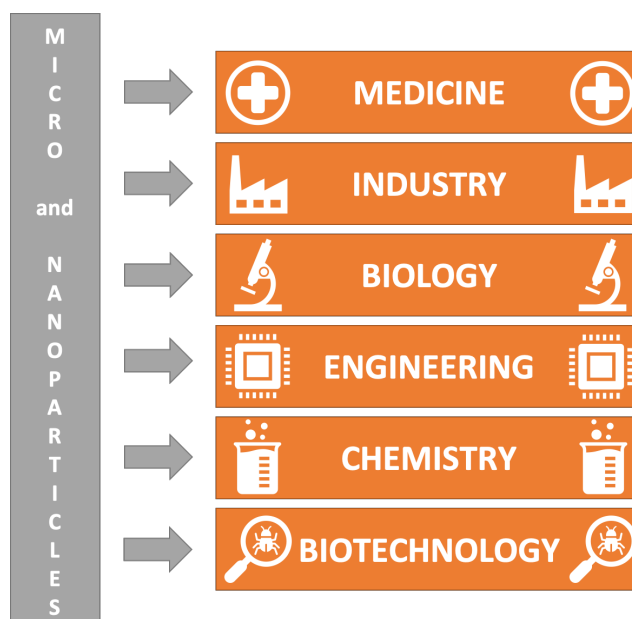


Figure 1. Practical application of microparticles and nanoparticles [9]

In the research included in my doctoral dissertation, I used microparticles and nanoparticles of noble metals and their compounds. Silver nanoparticles (AgNPs) exhibit strong antimicrobial, anticancer, anti-aggregating and fibrinolytic properties [9–11]. It is worth emphasizing that AgNPs also show antibacterial activity against biofilm and multi-drug resistant bacterial strains [6,13]. These beneficial features allow for a multidirectional application of nanoparticles, thus AgNPs constitute 30% of NPs produced for commercial purposes [14]. Gold nanoparticles (AuNPs) also have anti-cancer properties and are used in immunotherapy, imaging diagnostics and as biosensors [15–19]. Additionally, AuNPs are used in the diagnosis of diseases, such as tuberculosis [20]. Moreover, AuNPs and AgNPs are widely used as drug delivery platforms [21,22]. Microparticles such as silver phosphate, copper (II) oxide or silver oxide, also exhibit antimicrobial and anticancer properties [23–26]. Both MPs and NPs show a number of favorable biological properties which translates into the possibility of their biomedical use (Figure 2).

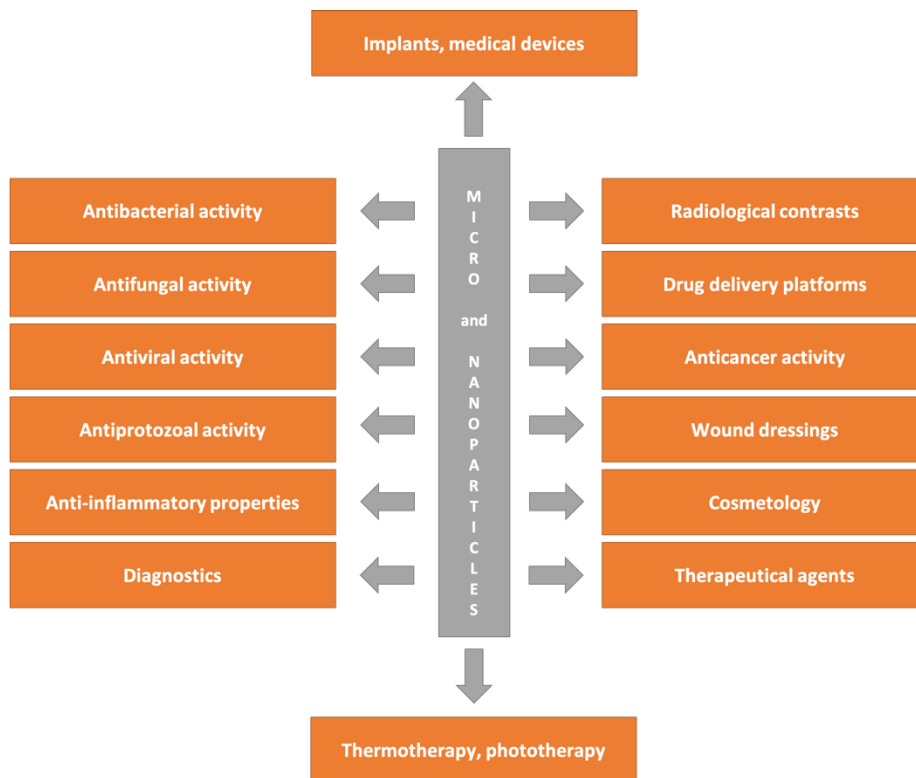


Figure 2. Potential application of microparticles and nanoparticles in biomedical sciences

Unfortunately, the clinical application of MPs and NPs is limited due to their not fully explored toxicity and resulting unpredictable risks to human health. Previous studies have shown that both AgNPs and AuNPs can be cytotoxic to human osteoblasts, gingival fibroblast cells, neuronal progenitor cells and macrophages [27–31]. Induction of oxidative stress is one of the main mechanisms of the cytotoxicity of metal NPs, however, pro-inflammatory effects or disturbances in the intracellular calcium levels have also been described [28, 29, 32]. Exposure to NPs may therefore lead to cell death through apoptosis, necroptosis, necrosis or autophagy [33–39]. The mechanisms of the cytotoxicity of MPs are not well understood. Hydroxyapatite microparticles have been shown to be cytotoxic to human macrophages, while silica microparticles to affect breast cancer cells [40,41]. One of the described mechanisms of microparticle cytotoxicity is the induction of oxidative stress and the effect on the regulation of the cell cycle [42,43]. A summary of selected mechanisms of MPs and NPs cytotoxicity at the molecular and cellular level is presented in figure 3.

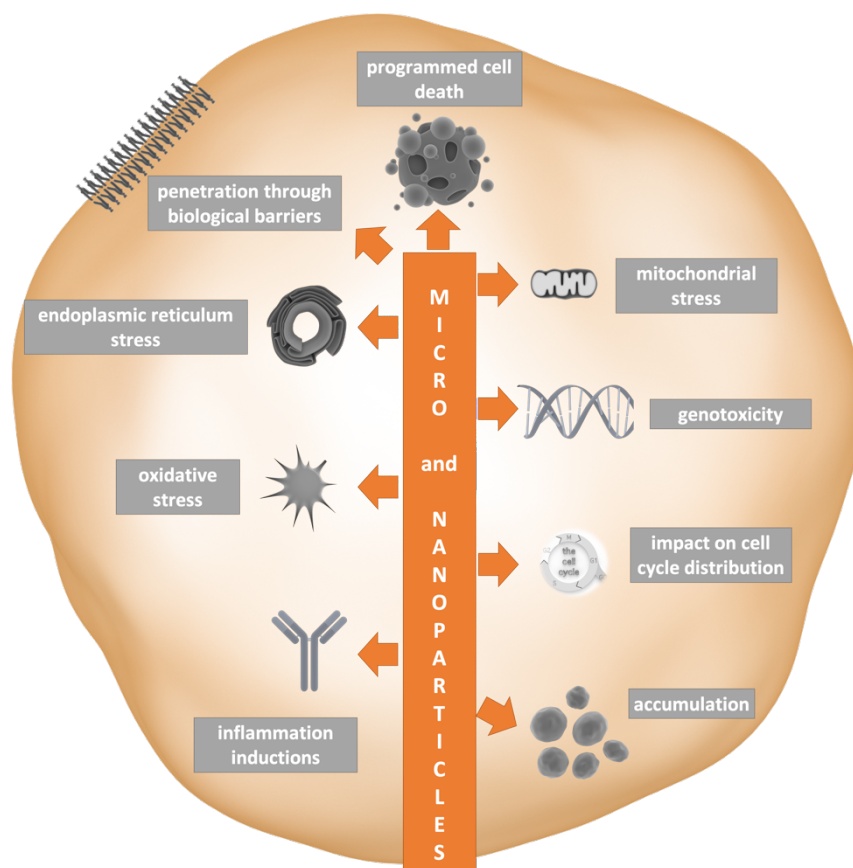


Figure 3. Selected cytotoxicity mechanisms of microparticles and nanoparticles at the cellular and molecular level

The beneficial properties and toxicity of MPs and NPs depend on multiple factors. Functionalization of MPs and NPs aims at improving their safety profile without compromising their properties. A number of variables modulate the properties of MPs and NPs: type, size, shape, incubation time, concentration, pH of the environment or surface properties. In addition, the biological properties of MPs and NPs depend on the type of cells exposed to them. A summary of the factors influencing the properties of MPs and NPs is presented in figure 4. Many authors indicate that the smaller MPs and NPs are, the greater their cytotoxicity is [30,42,44]. However, there are studies reporting higher cytotoxicity of MPs and NPs of larger sizes [45]. Similarly, with increasing concentration and incubation time, an increase in cytotoxicity is observed [46–48]. The shape also influences the cytotoxicity of NPs and MPs. Nowadays, the use of MPs and NPs of spherical shape is becoming more prevalent, because it allows for biologically active substances to be attached to their surface [49]. Fluorophores, drugs, antibodies, nucleic acids, proteins, bicarbonates or organic substances such as polyethylene oxide (PEG) or reduced glutathione (GSH) can be attached to the surface

of biomaterials either covalently or non-covalently [50,51]. Functionalization of MPs and NPs with GSH or PEG significantly increases their biocompatibility. In addition, PEG improves water solubility and prevents protein coating, increasing their bloodstream half-life [30]. GSH has strong antioxidant properties, which reduces the oxidative stress related cytotoxicity of MPs and NPs. [30,52]. It has been suggested that the functionalization of NPs with chemotherapeutic agents will allow the creation of biomaterials with better anti-cancer properties than the drugs themselves (in terms of their ability to penetrate tumors and to overcome drug resistance mechanisms) [53–55]. Similarly, the nanoparticles functionalization with antibiotics allows for a synergistic antimicrobial effect [56,57].

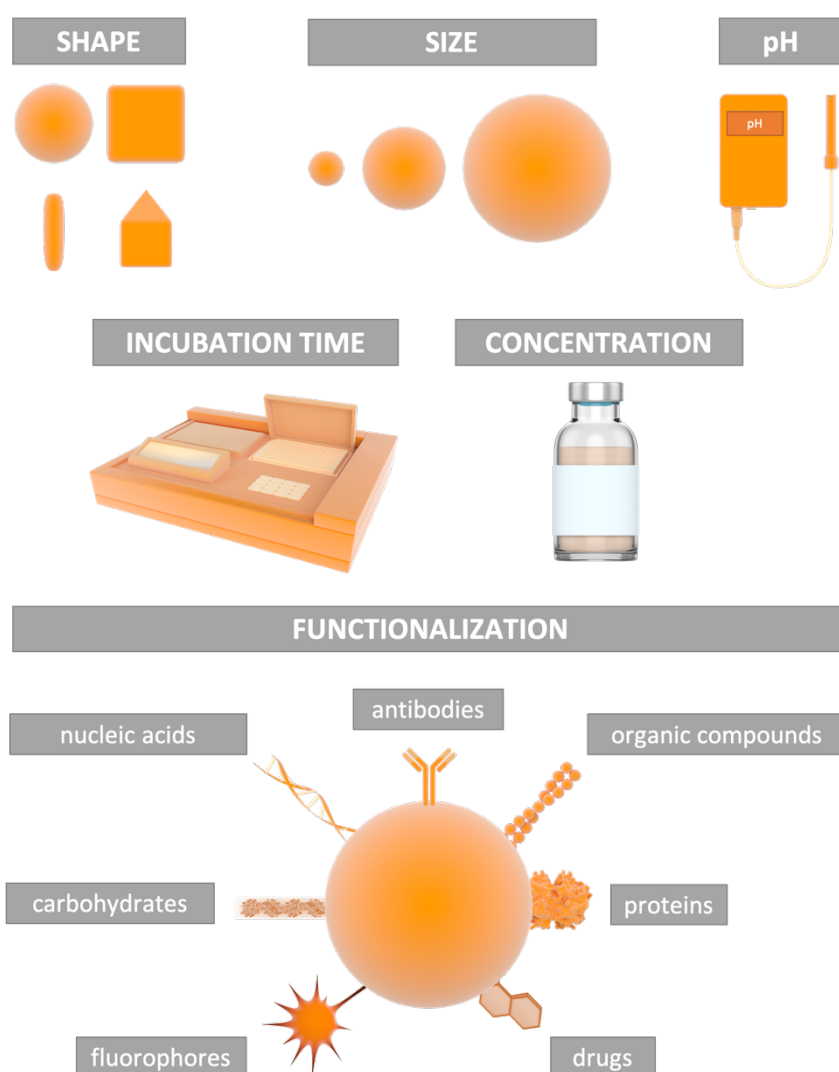


Figure 4. Summary of selected factors influencing biological properties of microparticles and nanoparticles

Despite the recent advances in medicine, there is still no effective way to treat many diseases. Thanks to their unique properties, MPs and NPs have the potential for clinical application. Moreover, the use of pharmaceuticals in the micro and nano scale allows the reduction of drugs doses, which reduces the cost and toxicity of the treatment [58, 59]. Due to the development of civilization and the increased life expectancy, cancers and drug-resistant infections are a serious challenge in modern medicine. As part of the research included in my doctoral dissertation, I explored the issue of the functionalization of microparticles, and nanoparticles impact on their antibacterial and cytotoxic properties towards cancer cells. In Poland and other developed countries, cancer is the second cause of death, after cardiovascular diseases. [60] In my research I used cellular models of three cancers: breast cancer, pancreatic cancer, and osteosarcoma. These diseases are important from both an epidemiological and economic point of view. Breast cancer is the most common female neoplasm [60]. Pancreatic cancer has a low 5-year survival rate (about 6%), and its treatment is expensive (> \$ 65,000 / patient) [61,62]. Osteosarcoma is the third most common pediatric cancer; nonetheless, it can occur at any age [63]. Chemotherapy rarely allows for a radical treatment of those cancers, and the surgical options are often mutilating. Moreover, each of these methods has complications that significantly reduce the patient's quality of life. Infections are a common medical problem; it is estimated that 3 to 5% of patients after an orthopedic surgery and up to 40% of patients with artificial materials implanted into the circulatory system suffer from implant-related infections. Only in the USA, the annual cost of treating complications related to implantation is estimated at \$ 3.3 billion [64,65].

The data from scientific research in this field is still insufficient to clearly determine the influence of modification of microparticles and nanoparticles on their biological properties. Therefore, detailed studies on the influence of the physicochemical properties of MPs and NPs on their activity against prokaryotic and eukaryotic cells (both cancerous and non-cancerous) are necessary.

III. AIM OF THE STUDY

Main aim:

Assessment of the influence of modification (shape, size, functionalization) of nanoparticles and microparticles on their biological properties: cytotoxicity, antimicrobial properties, potential antitumor activity in *in vitro* model.

Specific aims:

- 1) Assessment of the influence of the shape of gold nanoparticles on their selective cytotoxic activity towards neoplastic cells in comparison to non-transformed cells.
- 2) Evaluation of the potential anticancer properties of spherical gold nanoparticles stabilized with glutathione and functionalized with chemotherapeutics (doxorubicin, gemcitabine, cytarabine).
- 3) Assessment of the influence of the shape of silver phosphate (V) microparticles on their antimicrobial properties and cytotoxicity.
- 4) Evaluation of the cytotoxic effects of interaction of nanoparticles and microparticles with non-transformed and cancer bone cells.

IV. MATERIALS AND METHODS

Microparticles and nanoparticles

Gold nanoparticles in the shape of stars, rods and spheres were synthesized by a team of chemists from the University of Gdańsk under the supervision of prof. dr hab. Adriana Zaleska-Medynska.

Silver phosphate (V) microparticles in the following shapes: tetrapodal, spherical, tetrahedral, cubic, branched and dodecahedron were synthesized by a team of chemists from the University of Gdańsk under the supervision of prof. dr hab. Adriana Zaleska-Medynska.

Gold nanoparticles stabilized with glutathione and conjugated with chemotherapeutic agents (doxorubicin, gemcitabine and cytarabine) were synthesized by a team of chemists from the University of Warsaw under the supervision of dr Michał Wójcik.

Cell culture

The following cell lines were used in the studies: human fetal osteoblasts (hFOB1.19), mouse preosteoblasts (MC3T3-E1), three osteosarcoma cell lines (143B, MG63, Saos-2), skin fibroblasts (HDF), murine myoblasts (C2C12), human pancreatic ductal adenocarcinoma (PANC-1), pancreatic duct cells (hTERT-HPNE), breast adenocarcinoma (MCF7), and breast epithelial cells (MCF10A). hFOB1.19, MC3T3-E1, 143B, MG63, Saos-2, HDF, PANC-1, hTERT-HPNE, MCF7, and MCF10A cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), whereas C2C12 cell line originated from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Cell culture was performed under standard conditions [66–68].

Assessment of the cytotoxic effect of microparticles and nanoparticles

To assess the cytotoxic effect of microparticles and nanoparticles on cell lines, colorimetric tests were used, based on: (1) measurement of the metabolic activity of cells (MTT), (2) quantitative measurement of DNA synthesis in the cell (BrdU) and (3) assessment of the ability to accumulate neutral red in lysosomes and cell membrane integrity (NR) [69–71].

Assessment of the internalization of microparticles and nanoparticles and induction of changes in the cell ultrastructure

The ability to penetrate the cell membrane, localization in the cells and induction of changes in the cellular ultrastructure by microparticles and nanoparticles were determined by Transmission Electron Microscopy (TEM). Cell morphology was also assessed by phase-contrast microscopy.

Assessment of intracellular reactive oxygen species levels

Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were assessed with 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) staining and measured by flow cytometry. Data were analyzed using the CellQuest Pro software.

Cell cycle analysis

The effect of silver phosphate microparticles on the regulation of the cell cycle was assessed with propidium iodide (PI) staining by flow cytometry and analyzed using the CellQuest Pro software.

Total protein level determination

Bradford method was used to determine total protein level in the samples [72].

Determination of selected proteins levels

The Western-blot method was used to determine the levels of selected proteins; markers of apoptosis (Bax, Bcl-2) and inflammation (MMP1, MMP3, NF- κ B), proteins of the antioxidant system of the cell (SOD1, SOD2, SOD3, GPX4), and proteins associated with the formation of the cytoskeleton (p16- ARC).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test. The IC₅₀ value was determined by log(inhibitor) vs normalized response nonlinear regression analysis. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism (confidence interval = 95%, α = 0.05).

V. DESCRIPTION OF THE PUBLICATIONS INCLUDED IN THE DOCTORAL THESIS

My doctoral thesis consists of four papers (three original and one review) published in international journals indexed on the ISI Master List. The articles focus on the impact of modification on the cytotoxic and antibacterial properties of nanoparticles and microparticles, with particular emphasis on bone cells.

Publication 1

Steckiewicz KP, Inkielewicz-Stepniak I.: *Modified nanoparticles as potential agents in bone diseases: cancer and implant-related complications*; Nanomaterials. 2020; 10:658

Skeletal system problems affect a significant percentage of the population, and with increasing life expectancy, the number of people affected by these diseases will only increase. In this work, we reviewed the literature on the potential role of nanoparticles in the prevention and treatment of selected problems of modern orthopedics: cancer and arthroplasty related complications. We put particular emphasis on the influence of nanobiomaterials modification on their beneficial properties and cytotoxicity. We also considered the impact of NPs on non-transformed bone cells to determine their safety for potential clinical use.

The publication started with an introduction to the subject of nanotechnology, we defined what nanoparticles are, and we compared their size to other objects. Then we presented the history of nanotechnology and its modern applications.

In the main part of the work, we discussed bone cancers and the potential role of NPs in their treatment. Nanoparticles may be directly cytotoxic to osteosarcoma cell lines and have been shown to be effective in disease treatment in *in vivo* model. Both inorganic and organic NPs exert antitumor activity, which depends on the type of NPs, their shape, concentration, and the pH of the environment. NPs can also show cytotoxic activity against other bone cancers such as chondrosarcoma, fibrosarcoma or Ewing's sarcoma. It is worth noting that tumor cell lines are usually more sensitive to NPs than non-transformed lines. Apart from the direct cytotoxicity to neoplastic cells, nanoparticles can be used as drug carriers, which is particularly important when the physicochemical properties of chemotherapeutic agents

(e.g. water solubility) make their application in clinical practice difficult. The ability of NPs to accumulate in the tumor microenvironment reduces toxicity and increases the effectiveness of treatment. Nanoparticles can be conjugated with "classic" chemotherapeutic agents (doxorubicin, etoposide, cytarabine, gemcitabine, and others), substances currently not used in treatment (curcumin) and with nucleic acids. Moreover, magnetic nanoparticles, owing to their unique properties, can be used in the thermotherapy of osteosarcoma. It is worth noting that the effectiveness of NPs has been demonstrated both *in vitro* and *in vivo*.

In the second part of the publication, we examined issues related to bone implants, i.e. infections and low biocompatibility. We discussed the physiological basis of these problems, and then described how nanoparticles could potentially prevent them. A number of nanoparticles increase the biocompatibility of implants. These include silver nanoparticles (AgNPs), titanium, zinc oxide and hydroxyapatite (HA-NPs). NPs can also be used in regenerative medicine to differentiate bone cells from stem cells. These properties are exhibited by i.a. HA-NPs, AgNPs and AuNPs. Moreover, NPs can present antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic properties. Properties of AgNPs are most widely documented, but AuNPs, copper NPs, metal oxide NPs, organic NPs, and others also have such properties. The antimicrobial properties of NPs depend on their type, size, shape, and functionalization.

We concluded the publication with a summary of the safety of potential clinical application of nanoparticles. We discussed their cytotoxicity to non-transformed bone cell lines, and we compared this information with the toxicity of currently used drugs. We have also provided information on which nanoproducts are currently approved for use in a clinical setting.

To sum up, the paper is an introduction to further studies on the influence of modification of biomaterials on their biological properties, with particular emphasis on bone cells. We have shown that NPs have a number of beneficial properties that can be used in bone diseases. Moreover, we described numerous factors modifying the pharmacological and toxicological properties of NPs (type of NPs, shape of NPs, concentration, incubation time, environment pH, functionalization, type of stabilizing agent, and others). To the best of our knowledge, this is the first publication that discusses this subject in such a detailed way.

Publication 2

Steckiewicz KP, Barcińska E, Malankowska A, Zauszkiewicz-Pawlak A, Nowaczyk G, Zaleska-Medynska A, Inkielewicz-Stępnia I.: *Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model: evaluation of the safety of use and anti-cancer potential*; J Mater Sci Mater Med. 2019;30(2):22

Despite the recent advances in the medicine, oncological treatment is still connected with serious complications and a high percentage of therapeutic failures. Therefore, we decided to address the issue of the influence of NPs modification on their potential anti-cancer properties.

In this work, we decided to assess the influence of the shape of gold nanoparticles on their cytotoxicity towards osteosarcoma cells. We also investigated the effect of AuNPs in various shapes on non-transformed bone cell lines.

Three shapes of gold nanoparticles: stars (170 - 260 nm), rods (length approx. 45 nm, width 16 nm) and spheres (diameter 6 - 22 nm) were synthesized and characterized. In biological studies, we used two osteosarcoma cell lines (143B and MG63) and a non-transformed cell line - human fetal osteoblast cell line (hFOB1.19). We decided to use two cancer cell lines due to the differences in their molecular characteristics. The 143B cell line divides more quickly and migrates faster than the MG63 cell line. Moreover, cells of the 143B cell line have a greater ability to cause distant metastases. In all, the characteristics of the 143B cell line indicate that the cell are phenotypically more aggressive.

We demonstrated the shape-, concentration- and type-dependent cytotoxicity of AuNPs after incubation cells with AuNPs for 24 hours, using MTT and NR assays. AuNPs stars were the most cytotoxic and the spherical ones had the smallest effect on cell viability. Moreover, cell lines show different sensitivity to the tested AuNPs. The hFOB1.19 cell line was the most resistant to the cytotoxic effect of AuNPs, and the 143B cell line was the least resistant one. We found that both tumor cell lines were more sensitive to nanoparticles than the non-transformed cells. It is worth noting that the cells of the "more aggressive" cell line 143B were also more sensitive to NPs. Moreover, we showed via the Western-blot method that the star and rod-shaped AuNPs cause increased production of the pro-apoptotic protein Bax and a decrease in the level of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in the cells. The analysis of TEM images showed

that the AuNPs stars (concentration of 10 µg/mL) were internalized and localized in both the cytoplasm and cell nucleus, they also caused increased cell vacuolization. Moreover, higher concentrations (50 µg/mL) of these nanoparticles caused cell degradation and disruption of the cell membrane. On the other hand, AuNPs rods (concentration of 10 µg/mL) were internalized and localized in endosomes, and high concentrations (50 µg/mL) caused cell degradation.

To conclude, we reported that the biological effects of gold nanoparticles are shape dependent. The effect of nanoparticles also depends on their concentration and which type of cell lines is exposed to them, with a clear difference between neoplastic and non-transformed cell lines. AuNPs reduced the viability of cells and could cause their apoptosis. The AuNPs stars had the highest anti-tumor activity, and the AuNPs spheres had the best safety profile in *in vitro* studies. We were the first to describe the effects of gold nanoparticles in various shapes on human fetal osteoblasts and osteosarcoma cells.

Publication 3

Steckiewicz KP, Barcińska E, Sobczak K, Tomczyk E, Wójcik M, Inkielewicz-Stępniaik I.: *Assessment of anti-tumor potential and safety of application of glutathione stabilized gold nanoparticles conjugated with chemotherapeutics*; Int J Med Sci. 2020;17(6)

Based on the preliminary research and above-mentioned publication [67] on the role of AuNPs shapes on their *in vitro* anti-tumor activity and safety profile, we chose spherical gold nanoparticles for further research. We have made an attempt to evaluate the possibility of using AuNPs as drug carriers. Conjugating NPs with a drug was supposed to increase the effectiveness of the therapy while reducing its adverse effects and costs. In addition, we decided to stabilize nanoparticles with GSH, to ensure a more stable nanoparticle-drug connection and improve their safety profile by reducing cytotoxicity in non-cancerous cells.

In the study, we assessed the potential of GSH-stabilized spherical AuNPs as delivery platforms for chemotherapeutic agents. We assessed the influence of tested nanoparticles on neoplastic and non-transformed cell lines.

Four types of spherical AuNPs were characterized in the publication. AuNPs stabilized with GSH (AuNPs-GSH), AuNPs stabilized with GSH and conjugated with doxorubicin (AuNPs-GSH-DOX), cytarabine (AuNPs-GSH-CTA) and gemcitabine

(AuNPs-GSH-GEM) respectively. We were the first to synthesize and study the biological properties of AuNPs-GSH-CTA. We conducted biological studies on cellular models of osteosarcoma (143B cell line), pancreatic cancer (PANC1 cell line) and breast cancer (MCF7 cell line), as well as on non-transformed cells (hFOB1.19, hTERT-HPNE, MCF10A cell lines). We also compared the effectiveness of the obtained conjugates of nanoparticles and chemotherapeutic agents to that of doxorubicin, cytarabine, and gemcitabine alone. We decided to use as many as six cell lines with different molecular characteristics, which provided us with information on the influence of NPs on different types of cells and increased the reliability of the obtained results.

The results after 24 hours of incubation of NPs conjugates with cells showed that biological properties of NPs depend on the type of chemotherapeutic agent, concentration, and the type of cell line. NPs conjugated with drugs were more cytotoxic than AuNPs-GSH, and tumor cell lines were more sensitive to the NPs than non-transformed cell lines. We showed that, in selected conditions, NPs may be selectively cytotoxic to cancer cells, and be more effective than chemotherapeutic agents alone. This suggests that conjugating NPs with drugs can reduce the toxicity of the treatment and its cost while improving its effectiveness.

To conclude, we showed that AuNPs can be used as effective carriers of anti-cancer drugs. NPs properties depend on the modification: GSH stabilization, the presence and the type of chemotherapeutic agent.

Publication 4

Steckiewicz KP, Zwara J, Jaśkiewicz M, Kowalski S, Kamysz W, Zaleska-Medynska A, Inkielewicz-Stępniaak I.: *Shape-depended biological properties of Ag₃PO₄ microparticles: evaluation of antimicrobial properties and cytotoxicity in in vitro model - safety assessment of potential clinical usage*; Oxid Med Cell Longev. 2019; 2019:6740325.

Based on our previous research, we attempted to answer the question of whether MPs used to develop modern biomaterials can help solve one of the most important problems of modern orthopedics – infections as a surgery-related complication after arthroplasty. Again, we tried to determine whether the modification of MPs regarding their shape would affect their biological properties. In the research, we used silver

orthophosphate MPs in order to maximize their biocompatibility (the presence of phosphorus, which is an important compound of bones) and provide antimicrobial properties (the presence of silver). We decided to use the shape of MPs as a variable because larger particles should be less cytotoxic, and more limited in their ability to penetrate into the bloodstream and therefore express distant toxicity when introduced into a living organism.

In the study, we assessed the influence of the shape of silver orthophosphate MPs on their antimicrobial properties and cytotoxicity against mammalian cells, with particular emphasis on bone cells. We also suggested the mechanisms of cytotoxicity of silver orthophosphate microparticles.

The publication describes the methodology of synthesis and physicochemical characteristics of six shapes of silver orthophosphate MPs (SOMPs): spherical (s-SOMPs), cubic (c-SOMPs), tetrahedral (th-SOMPs); dodecahedrons (rd-SOMPs), branched (b-SOMPs), and tetrapodal (t-SOPMs). Microbiological analyses were performed on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Candida albicans* and *Aspergillus niger strains*. Bone (hFOB1.19, MC3T3-E1, Saos-2), muscle (C2C12) and skin (HDF) cell lines were used to assess the cytotoxicity of SOMPs.

We showed that the antimicrobial properties of SOMPs depend on their shape and the type of pathogen. The fungal strains were more sensitive to SOMPs than the bacterial ones. c-SOMPs and s-SOMPs showed the highest antimicrobial activity. Importantly, SOMPs were effective against both planktonic forms of microbes and biofilm, however, the MIC values were lower than MBEC.

Cytotoxicity of SOMPs (measured by MTT and BrdU tests) depended on their concentration, shape, and type of the tested cell line. c-SOMPs were the most cytotoxic and t-SOMPs the least. The hFOB1.19 cell line was the most and C2C12 cell line was the least resistant to the SOMPs. It is worth emphasizing that SOMPs exhibit antimicrobial activity at concentrations that are non-toxic to mammalian cells. Based on the preliminary results, we selected c-SOMPs, s-SOMPs, and b-SOMPs for further experiments. We showed that SOMPs can increase intracellular ROS production as well as affect the levels of antioxidant system proteins (SOD1, SOD2, SOD3, GPX4), inflammation related (MMP1, MMP3, NF- κ B) and cytoskeleton (p16-ARC) proteins. The regulation of the cell cycle was only influenced by c-SOMPs, which reduced the number of cells in the G0/G1 phase. Despite the effect on cytoskeleton-

related proteins, the analysis of TEM images showed no changes in cell ultrastructure; SOMPs were not internalized either.

To sum up, the antimicrobial properties and cytotoxicity of SOMPs depend on their functionalization (shape). We showed that the cytotoxicity of SOMPs was related to the induction of oxidative stress and inflammation. Our research showed that s-SOMPs had the best antimicrobial properties and the best safety profile in *in vitro* conditions. We were the first team in the world to investigate the effects of SOMPs on mammalian cells.

VI. CONCLUSION

Thanks to the enormous progress that has been made in science, the achievements of nanotechnology can be applied in many fields of medicine, including oncology and orthopedics. Microparticles and nanoparticles, thanks to their spectrum of beneficial biological activity, are used in the prevention, diagnostics and therapy of human diseases. Unfortunately, like any other therapeutic agents and biomaterials, microparticles and nanoparticles exhibit adverse effects. Despite their unique advantageous properties, their cytotoxicity confirmed by *in vitro* and *in vivo* tests severely limits the clinical application of microparticles and nanoparticles.

Research included in my PhD dissertation has shown that the properties of microparticles and nanoparticles depend on many factors: their type, shape, concentration, size, and functionalization. Therefore, we proved that the biological activity of microparticles and nanoparticles is inextricably linked with their physicochemical properties. Thus, it is important to precisely define the mechanisms of cytotoxicity of examined microparticles and nanoparticles and to define the factors modifying their properties. In our research, we focused on the assessment of the influence of their modification on the antimicrobial and cytotoxic properties, with particular emphasis on orthopedic diseases, which significantly reduced the existing gap in the current knowledge. In the review article, taking into account the latest scientific achievements, we discussed in detail the potential role of nanoparticles in solving problems of modern orthopedics. In experimental research we were the first to: determine the influence of the shape of gold nanoparticles on their cytotoxicity against osteosarcoma cell lines, investigate the potential of glutathione stabilized gold nanoparticles as a carriers of cytarabine and examined interaction of silver phosphate (V) microparticles with cell lines *in vitro*. We showed that thanks to their unique properties, the microparticles and nanoparticles can potentially be therapeutic substances. The results and knowledge we gained will enable us to create microparticles and nanoparticles modified to maximize their beneficial biological effects while improving their safety profile. We hope that this knowledge will facilitate the practical application of metal microparticles and nanoparticles and their compounds in the future treatment of orthopedic and oncological diseases.

The use of microparticles and nanoparticles in medicine can contribute to solving the key problems faced by this field of knowledge. Appropriate modification of microparticles and nanoparticles may improve their safety profile and maximize their beneficial biological (pharmacological) properties. There are high hopes for the use of microparticles and nanoparticles in bone diseases: cancer and alloplastic joint complications. Therefore, future research should primarily focus on finding their optimal modifications for medical application.

WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENICTWA

/

BIBLIOGRAPHY

- [1] Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., et al., Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2015, 6, 1769–1780.
- [2] Charitidis, C.A., Georgiou, P., Koklioti, M.A., Trompeta, A.F., et al., Manufacturing nanomaterials: From research to industry. *Manuf. Rev.* 2014, 1, 11.
- [3] Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.H., Hess, M., et al., Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* 2012, 84, 377–410.
- [4] Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial Text with EEA relevance OJ L 275, 20.10.2011, p. 38–40 (BG, ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, IT, LV, LT, HU, MT, NL, PL, PT, RO, SK, SL, FI, SV. *Eur. Comm.* 2011.
- [5] Rai, M., Ingle, A.P., Birla, S., Yadav, A., et al., Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Crit. Rev. Microbiol.* 2015, 00, 1–24.
- [6] Dos Santos, C.A., Seckler, M.M., Ingle, A.P., Gupta, I., et al., Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *J. Pharm. Sci.* 2014, 103, 1931–1944.
- [7] Selvaraj, M., Pandurangan, P., Ramasami, N., Rajendran, S.B., et al., Highly potential antifungal activity of quantum-sized silver nanoparticles against *Candida albicans*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 173, 55–66.
- [8] Niska, K., Zielinska, E., Radomski, M.W., Inkielewicz-Stepniak, I., Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. *Chem. Biol. Interact.* 2018, 295, 38–51.
- [9] Steckiewicz, K.P., Inkielewicz-Stepniak, I., Modified Nanoparticles as Potential Agents in Bone Diseases: Cancer and Implant-Related Complications. *Nanomaterials* 2020, 10, 658.

- [10] Niska, K., Knap, N., Kędzia, A., Jaskiewicz, M., et al., Capping Agent-Dependent Toxicity and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles: An In Vitro Study. Concerns about Potential Application in Dental Practice. *Int. J. Med. Sci.* 2016, *13*, 772–782.
- [11] Hajtuch, J., Hante, N., Tomczyk, E., Wojcik, M., et al., Effects of functionalized silver nanoparticles on aggregation of human blood platelets. *Int. J. Nanomedicine* 2019, *14*, 7399–7417.
- [12] Sharma, H., Mishra, P.K., Talegaonkar, S., Vaidya, B., Metal nanoparticles: A theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov. Today* 2015, *20*, 1143–1151.
- [13] Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J.L., et al., Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J. Endod.* 2014, *40*, 285–290.
- [14] Skalska, J., Strużyńska, J., Toxic effects of silver nanoparticles in mammals - does a risk of neurotoxicity exist? *Folia Neuropathol.* 2015, *53*, 281–300.
- [15] Lee, U., Yoo, C.-J., Kim, Y.-J., Yoo, Y.-M., Cytotoxicity of gold nanoparticles in human neural precursor cells and rat cerebral cortex. *J. Biosci. Bioeng.* 2016, *121*, 341–344.
- [16] Tripathi, R.M., Shrivastav, A., Shrivastav, B.R., Biogenic gold nanoparticles: As a potential candidate for brain tumor directed drug delivery. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2014, 1–7.
- [17] Kafshdooz, L., Kafshdooz, T., Razban, Z., Akbarzadeh, A., The application of gold nanoparticles as a promising therapeutic approach in breast and ovarian cancer. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2015, 1–6.
- [18] Ahn, S., Lee, I.H., Kang, S., Kim, D., et al., Gold nanoparticles displaying tumor-associated self-antigens as a potential vaccine for cancer immunotherapy. *Adv. Healthc. Mater.* 2014, *3*, 1194–1199.
- [19] Banu, H., Sethi, D.K., Edgar, A., Sheriff, A., et al., Doxorubicin loaded polymeric gold nanoparticles targeted to human folate receptor upon laser photothermal therapy potentiates chemotherapy in breast cancer cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2015, *149*, 116–128.
- [20] Hussain, M.M., Samir, T.M., Azzazy, H.M.E., Unmodified gold nanoparticles for direct and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clin. Biochem.* 2013, *46*, 633–637.

- [21] Ravindra, S., Mulaba-Bafubiandi, A.F., Rajinikanth, V., Varaprasad, K., et al., Development and Characterization of Curcumin Loaded Silver Nanoparticle Hydrogels for Antibacterial and Drug Delivery Applications. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 2012, 22, 1254–1262.
- [22] Khan, A.K., Rashid, R., Murtaza, G., Zahra, A., Gold nanoparticles: Synthesis and applications in drug delivery. *Trop. J. Pharm. Res.* 2014, 13, 1169–1177.
- [23] Chudobova, D., Cihalova, K., Dostalova, S., Ruttkay-Nedecky, B., et al., Comparison of the effects of silver phosphate and selenium nanoparticles on *Staphylococcus aureus* growth reveals potential for selenium particles to prevent infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014, 351, 195–201.
- [24] Liu, J.K., Luo, C.X., Wang, J.D., Yang, X.H., et al., Controlled synthesis of silver phosphate crystals with high photocatalytic activity and bacteriostatic activity. *CrystEngComm* 2012, 14, 8714–8721.
- [25] Yeo, B.E., Seo, Y., Park, H., Huh, Y.D., Facet effect of Ag₃PO₄ crystals on antibacterial activities. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2015, 36, 1904–1907.
- [26] Nair, S., Sasidharan, A., Divya Rani, V. V., Menon, D., et al., Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells, in: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, J Mater Sci Mater Med, 2009.
- [27] Zielinska, E., Tukaj, C., Radomski, M.W., Inkielewicz-Stepniak, I., Molecular Mechanism of Silver Nanoparticles-Induced Human Osteoblast Cell Death: Protective Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor. *PLoS One* 2016, 11, e0164137.
- [28] Inkielewicz-Stepniak, I., Santos-Martinez, M.J., Medina, C., Radomski, M.W., Pharmacological and toxicological effects of co-exposure of human gingival fibroblasts to silver nanoparticles and sodium fluoride. *Int. J. Nanomedicine* 2014, 9, 1677–1687.
- [29] Carlson, C., Hussein, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., et al., Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 13608–13619.
- [30] Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., et al., Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 2007, 3, 1941–1949.
- [31] Soenen, S.J., Manshian, B., Montenegro, J.M., Amin, F., et al., Cytotoxic effects of gold nanoparticles: A multiparametric study. *ACS Nano* 2012, 6, 5767–5783.

- [32] Asharani, P. V, Hande, M.P., Valiyaveetil, S., Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* 2009, *10*, 65.
- [33] Lee, Y.H., Cheng, F.Y., Chiu, H.W., Tsai, J.C., et al., Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. *Biomaterials* 2014, *35*, 4706–4715.
- [34] Cifti, H., Turk, M., Tamer, U., Karahan, S., et al., Silver nanoparticles: Cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on MCF-7 cells. *Turkish J. Biol.* 2013, *37*, 573–581.
- [35] Sathishkumar, M., Pavagadhi, S., Mahadevan, A., Balasubramanian, R., Biosynthesis of gold nanoparticles and related cytotoxicity evaluation using A549 cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015, *114*, 232–40.
- [36] Lee, J.S., Murphy, W.L., Functionalizing calcium phosphate biomaterials with antibacterial silver particles. *Adv. Mater.* 2013, *25*, 1173–1179.
- [37] Selim, M.E., Hendi, A.A., Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 2012, *13*, 1617–1620.
- [38] Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., et al., Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 2009, *5*, 2067–2076.
- [39] Li, J.J., Hartono, D., Ong, C.N., Bay, B.H., et al., Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* 2010, *31*, 5996–6003.
- [40] Motskin, M., Wright, D.M., Muller, K., Kyle, N., et al., Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials* 2009, *30*, 3307–3317.
- [41] He, Q., Zhang, Z., Gao, Y., Shi, J., et al., Intracellular localization and cytotoxicity of spherical mesoporous silica nano- and microparticles. *Small* 2009, *5*, 2722–2729.
- [42] Santos, H.A., Riikonen, J., Salonen, J., Mäkilä, E., et al., In vitro cytotoxicity of porous silicon microparticles: Effect of the particle concentration, surface chemistry and size. *Acta Biomater.* 2010, *6*, 2721–2731.
- [43] Chinde, S., Poornachandra, Y., Panyala, A., Kumari, S.I., et al., Comparative study of cyto- and genotoxic potential with mechanistic insights of tungsten oxide nano- and microparticles in lung carcinoma cells. *J. Appl. Toxicol.* 2018, *38*, 896–913.

- [44] Gliga, A.R., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Fadeel, B., et al., Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part. Fibre Toxicol.* 2014, *11*, 1–17.
- [45] Vetten, M.A., Tlotleng, N., Tanner Rascher, D., Skepu, A., et al., Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. *Part. Fibre Toxicol.* 2013, *10*, 1–15.
- [46] Prabhu, B.M., Ali, S.F., Murdock, R.C., Hussain, S.M., et al., Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat. *Nanotoxicology* 2010, *4*, 150–160.
- [47] Paknejadi, M., Bayat, M., Salimi, M., Razavilar, V., Concentration-and time-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles on normal human skin fibroblast cell line. *Iran. Red Crescent Med. J.* 2018, *20*.
- [48] Vujačić, A., Vodnik, V., Joksić, G., Petrović, S., et al., Particle size and concentration dependent cytotoxicity of citrate capped gold nanoparticles. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* 2011, *6*, 1367–1376.
- [49] Truong, N.P., Whittaker, M.R., Mak, C.W., Davis, T.P., The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015, *12*, 129–142.
- [50] Cobley, C.M., Chen, J., Chul Cho, E., Wang, L. V., et al., Gold nanostructures: A class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 2011, *40*, 44–56.
- [51] Conde, J., Dias, J.T., Grazú, V., Moros, M., et al., Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front. Chem.* 2014, *2*.
- [52] Dreaden, E.C., Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., et al., The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 2012, *41*, 2740–2779.
- [53] Susa, M., Iyer, A.K., Ryu, K., Hornicek, F.J., et al., Doxorubicin loaded polymeric nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma. *BMC Cancer* 2009, *9*, 399.
- [54] Wang, B., Yu, X.C., Xu, S.F., Xu, M., Paclitaxel and etoposide co-loaded polymeric nanoparticles for the effective combination therapy against human osteosarcoma. *J. Nanobiotechnology* 2015, *13*, 22.

- [55] Manivasagan, P., Bharathiraja, S., Bui, N.Q., Jang, B., et al., Doxorubicin-loaded fucoidan capped gold nanoparticles for drug delivery and photoacoustic imaging. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, *91*, 578–588.
- [56] Zhang, L., Pornpattananankul, D., Hu, C.-M., Huang, C.-M., Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Curr. Med. Chem.* 2010, *17*, 585–594.
- [57] Hallaj-Nezhadi, S., Hassan, M., Nanoliposome-based antibacterial drug delivery. *Drug Deliv.* 2015, *22*, 581–589.
- [58] Giljohann, D.A., Seferos, D.S., Daniel, W.L., Massich, M.D., et al., Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2010, *49*, 3280–3294.
- [59] Doane, T.L., Burda, C., The unique role of nanoparticles in nanomedicine: Imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.* 2012, *41*, 2885–2911.
- [60] Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 2019, *69*, 7–34.
- [61] Du, W., Touchette, D., Vaitkevicius, V., Peters, W., et al., Cost Analysis of Pancreatic Carcinoma Treatment. *Cancer* 2000, *89*, 1917–1924.
- [62] Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., et al., Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Res.* 2014, *74*, 2913–2921.
- [63] Luetke, A., Meyers, P.A., Lewis, I., Juergens, H., Osteosarcoma treatment - Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat. Rev.* 2014, *40*, 523–532.
- [64] Van de Belt, H., Neut, D., Schenk, W., Van Horn, J.R., et al., Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. *Acta Orthop. Scand.* 2001, *72*, 557–571.
- [65] Darouiche, R.O., Treatment of infections associated with surgical implants. *N. Engl. J. Med.* 2004, *350*, 1422–1429.
- [66] Steckiewicz, K.P., Zwara, J., Jaskiewicz, M., Kowalski, S., et al., Shape-Depended Biological Properties of Ag 3 PO 4 Microparticles : Evaluation of Antimicrobial Properties and Cytotoxicity in In Vitro Model — Safety Assessment of Potential Clinical Usage. *Oxid. Med. Cell Longev* 2019, *2019*, 1–19.

- [67] Steckiewicz, K.P., Barcińska, E., Sobczak, K., Tomczyk, E., et al., Assessment of anti-tumor potential and safety of application of glutathione stabilized gold nanoparticles conjugated with chemotherapeutic. *Int. J. Med. Sci.* 2020, 17, 824–833.
- [68] Steckiewicz, K.P., Barcinska, E., Malankowska, A., Zauszkiewicz-Pawlak, A., et al., Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model . Evaluation of the safety of use and anti-cancer potential. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2019, 30, 1–15.
- [69] Muir, D., Varon, S., Manthorpe, M., An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. *Anal. Biochem.* 1990, 185, 377–382.
- [70] Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55–63.
- [71] Borenfreund, E., Puerner, J.A., A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Cult. Methods* 1985, 9, 7–9.
- [72] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.

**PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
/
MANUSCRIPTS INCLUDED IN THE
DOCTORAL DISSERTATION**