

Streszczenie

Nanotechnologia umożliwia projektowanie wyspecjalizowanych nanocząstek, dzięki którym istnieje możliwość zwiększenia skuteczności terapii, a także bezpieczne i wczesne diagnozowanie chorób. Nanomateriały węglowe, do których zaliczane są fulereny i ich pochodne stanowią grupę nanozwiązków o szerokim spektrum działania. Fulerenole rozpuszczają się w środowisku wodnym, co zwiększa ich potencjalne zastosowanie w układach biologicznych.

Celem pracy doktorskiej było scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$, ocena jego oddziaływania z albuminą osocza krwi człowieka (HSA, ang. *human serum albumin*) i dehydrogenazą alkoholową pochodzącą z *Saccharomyces cerevisiae* (ADH, ang. *alcohol dehydrogenase*) oraz ocena toksyczności nanocząstek fulerenolu wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka (PBMCs, ang. *peripheral blood mononuclear cells*).

Pracę doktorską rozpoczęto od syntezy nanocząstek fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ z fulerenu C_{60} oraz potwierdzenia struktury otrzymanego związku. W celu oceny właściwości fizykochemicznych dokonano detekcji, wizualizacji i pomiaru wielkości, nanocząstek fulerenolu w wodzie i buforze Na-fosforanowym (0,02 M, pH 7,4). Ponadto przeprowadzono analizę topografii, profilu powierzchniowego oraz potencjału zeta fulerenolu. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że nanocząstki fulerenolu tworzą układy polidispersyjne o średniej wielkości od 40 nm do 187 nm. Po oderwaniu powłoki wodnej nanocząstki mają średnicę około 2 nm. W wodzie i buforze fulerenol posiada ujemną wartość potencjału zeta (-27,5 mV w wodzie, -37,4 mV w buforze). W zakresie nadfioletu fulerenol wykazuje silną absorpcję oraz niewielkie przegięcie w zakresie 330 – 350 nm. Na widmie fluorescencyjnym fulerenol przy długości fali wzbudzenia 340 nm posiada maksimum emisji przy 470 nm.

W celu oceny oddziaływań fulerenolu z różniącymi się strukturalnie białkami (ADH i HSA) określono stabilność i zdolność do agregacji fulerenolu w obecności białka. Widma absorpcyjne UV-Vis wykazały proporcjonalny od stężenia (2,64–133,36 μM) wzrost absorpcji fulerenolu przy braku widocznej zmiany pasma absorpcji białka (2 μM). W badanym zakresie stężeń fulerenolu spełnione jest prawo Lamberta-Beera,

co świadczy o jego stabilności w warunkach prowadzonych doświadczeń i braku agregacji. Następnie określono mechanizm wygaszania fluorescencji białek przez fulerenol analizując równanie Sterna-Volmera oraz zmiany czasu życia fluorescencji białek w obecności fulerenolu. Uzyskane wyniki wskazują na dynamiczny i statyczny mechanizm wygaszania fluorescencji białek przez fulerenol. Dodatkowo sugeruje się wygaszanie o mechanizmie „*sphere-of-action quenching*”. Wyznaczono stałą wygaszania Sterna-Volmera (K_{SV}) dla gaszenia dynamicznego i stałą V dla gaszenia statycznego. Wyznaczono także stałe wiązania fulerenolu do HSA i ADH (K_b) i liczbę miejsc wiążących na białku (n). Stwierdzono, że wiązanie fulerenolu do HSA jest znacznie silniejsze niż do ADH. Zaobserwowano także wysycenie miejsc wiążących na HSA a wyznaczona liczba miejsc wiążących n wynosi 2. Efektu wysycenia nie zaobserwowano dla ADH.

Pomiary czasów zaniku fluorescencji fulerenolu w obecności białek wykazały trzykrotny wzrost czasu życia fluorescencji fulerenolu w obecności białka. Potwierdza to asocjację fulerenolu do białka oraz istnienie transferu energii z białka na fulerenol. Po wykazaniu oddziaływania fulerenolu z białkami przeprowadzono ocenę internalizacji oraz toksyczności nanocząstek wobec prawidłowych jednojądrzastych komórki krwi obwodowej człowieka (PBMCs). Udowodniono, że pomimo zdolności tworzenia agregatów fulerenol akumuluje się na powierzchni, jak i we wnętrzu PBMCs, bez wpływu na ich przeżywalność. Oceniono także jego potencjalne właściwości radioprotekcyjne. Po inkubacji komórek z fulerenolem oraz działaniu promieniowania jonizującego (5, 10 i 15 Gy) nie wykazano ochronnego wpływu nanocząstek wobec PBMCs. Badania wykazały, że fulerenol zmniejsza potencjał błony mitochondrialnej, podobnie jak promieniowanie jonizujące, ale nie nasila skutków działania promieniowania.

Podsumowując, fulerenol wiąże się z HSA i ADH oraz wykazuje znacznie wyższe powinowactwo do HSA, co wskazuje na jego potencjalne zastosowanie biomedyczne jako nośnika leków/substancji aktywnych. Fulerenol akumuluje się na powierzchni, jak i we wnętrzu prawidłowych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka bez wpływu na ich przeżywalność. Nie wykazano natomiast właściwości radioprotekcyjnych fulerenolu.

Annex Dichote

Abstract

Nanotechnology enables designing specialised nanoparticles that provide an opportunity to increase the effectiveness of therapies as well to safely and early diagnose diseases. Carbon nanomaterials, which include fullerenes and their derivatives, are a group of nanocompounds with a wide spectrum of activity. Fullerenols dissolve in the aqueous solution, which increases their potential use in biological systems.

The objective of the doctoral thesis was characterising the physicochemical properties of fullereneol $C_{60}(OH)_{36}$, the assessment of its interaction with human serum albumin (HSA) and alcohol dehydrogenase (ADH) derived from *Saccharomyces cerevisiae* and the assessment of the toxicity of fullereneol nanoparticles to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

The doctoral thesis began with the synthesis of nanoparticles of fullereneol $C_{60}(OH)_{36}$ from C_{60} fullerene and the confirmation of the structure of the obtained compound. To assess the physicochemical properties, the detection, visualisation and measurement of the size of fullereneol nanoparticles in water and sodium phosphate buffer (0.02 M, pH 7.4) were conducted. Additionally, topography, surface profile and zeta potential of fullereneol were analysed. Based on the obtained results, it was shown that fullereneol nanoparticles form polydisperse systems with an average size of 40 nm to 187 nm. After detaching the aqueous coating, the nanoparticles have a diameter of about 2 nm. In water and in the buffer, fullereneol has a negative zeta potential value (-27.5 mV in water, -37.4 mV in the buffer). In the ultraviolet range, fullereneol shows strong absorption and slight inflection in the range of 330-350 nm. On the fluorescent spectrum, fullereneol at an excitation wavelength of 340 nm has a maximum emission at 470 nm.

To assess the interactions of fullereneol with structurally different proteins (ADH and HSA), the stability and ability to aggregate of fullereneol in the presence of protein were determined. The UV-Vis absorption spectra showed a proportional to concentration increase (2.64-133.36 μ M) in fullereneol absorption in the absence of a visible change in the protein absorption band (2 μ M). In the tested range of fullereneol concentrations, the Lambert-Beer law is satisfied, which proves its stability

in the conditions of the conducted experiments and the lack of aggregation. Next, the mechanism of protein fluorescence quenching by fullereneol was determined by analysing the Stern-Volmer equation and changes in the lifetime of protein fluorescence in the presence of fullereneol. The obtained results indicate a dynamic and static mechanism of protein fluorescence quenching by fullereneol. In addition, a "*sphere-of-action quenching*" mechanism is suggested. The Stern-Volmer quenching constant (K_{SV}) was determined for dynamic quenching and the V constant was determined for static quenching. The binding constants of fullereneol to HSA and ADH (K_b) and the number of binding sites on the protein (n) were also determined. It was found that the binding of fullereneol to HSA is much stronger than to ADH. Saturation of binding sites on HSA has also been observed and the designated number of binding sites n is 2. The saturation effect was not observed for ADH.

The measurement of fullereneol fluorescence decay in the presence of proteins showed a threefold increase in the lifetime of fullereneol fluorescence in the presence of protein. This confirms the association of fullereneol with protein and the existence of energy transfer from protein to fullereneol. After the interaction of fullereneol with proteins was demonstrated, the internalisation and toxicity of nanoparticles to normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were evaluated. It has been proven that despite the ability to form aggregates, fullereneol accumulates on the surface as well as in the interior of PBMCs, without affecting their survival. Its potential radioprotective properties were also evaluated. After incubation of cells with fullereneol and irradiated with X-rays (5, 10 and 15 Gy), no protective effect of nanoparticles towards PBMCs was demonstrated. Studies have shown that fullereneol reduces the potential of the mitochondrial membrane, similarly to ionising radiation but does not intensify the effects of radiation.

In summary, fullereneol binds to HSA and ADH and has a much higher affinity for HSA, indicating its potential biomedical use as a carrier of drugs/active substances. Fullereneol accumulates on the surface as well as inside normal peripheral blood mononuclear cells without affecting their survival. However, the radioprotective properties of fullereneol have not been demonstrated.

Anne Lichote