



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY ŚRODOWISKA**  
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie  
Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki  
i Biofizyki Medycznej

## **Aleksandra Joanna Szwed**

### **Ocena właściwości biologicznych dendrymerów hybrydowych – karbokrzemowo-wiologenowo- fosforowych (SMT)**

Evaluation of the biological properties of hybrid dendrimers –  
carborsilane-viologen-phosphorus (SMT)

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biofizyki Ogólnej  
Instytutu Biofizyki

pod kierunkiem  
prof. dr hab. Teresy Gabryelak

## Finansowanie pracy doktorskiej

Badania zostały wykonane w ramach projektów:

„Mechanizmy oddziaływań pomiędzy dendrymerami a białkami”  
– projekt HARMONIA Narodowego Centrum Nauki. UMO2012/04/M/NZ1/00059.

„Sieć UE-Białoruś-Rosja w dziedzinie przeciwnowotworowej terapii genowej z wykorzystaniem nanomateriałów.” Akronim. NANOGENE w ramach programu FP7-PEOPLE-2012-IRSES.

Dofinansowanie zadania badawczego dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w latach 2015-2017.

## Współpraca w ramach wykonywanych badań



Uniwersytet Alcalá, Hiszpania  
Katedra Chemii Organicznej i Chemii Nieorganicznej  
dr Silvia Moreno, prof. Rafael Gomez-Ramirez,  
prof. Francisco J. de la Mata De la Mata



Białoruska Akademia Nauk w Mińsku, Białoruś  
Instytut Biofizyki i Inżynierii Komórki  
prof. Dzmitry Shcharbin



Syberyjski Oddział Rosyjskiej Akademii Nauk, Rosja  
Instytut Biologii Chemicznej i Medycyny Podstawowej  
dr Evgeny Apartsin



Uniwersytet Łódzki  
Pracownia Obrazowania Mikroskopowego  
i Specjalistycznych Technik Biologicznych  
mgr Sylwia Michlewska

*Składam serdeczne podziękowania  
Promotorowi niniejszej rozprawy  
**prof. dr hab. Teresie Gabryelak**  
za opiekę merytoryczną i wyrozumiałość  
w trakcie realizacji pracy.*

*Specjalne podziękowania składam  
**dr hab. Katarzynie Miłowskiej, prof. nadzw. UŁ**  
za wsparcie, cenne wskazówki oraz poświęcony czas.*

*Dziękuję **Pracownikom i Doktorantom** Katedry Biofizyki Ogólnej  
Uniwersytetu Łódzkiego za życzliwość i przyjazną atmosferę pracy*

*oraz*

***Moim Najbliższym***

***Szczególnie Rodzicom***

*za wiarę we mnie, wsparcie i pomoc w trudnych chwilach.*

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	7
Wstęp .....	11
<b>1. Dendrymery oraz ich zastosowanie .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Dendrymery – charakterystyka ogólna .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Dendrymery oraz ich zastosowanie w badaniach biomedycznych .....</b>	<b>14</b>
<b>2. Oddziaływanie dendrymerów z białkami .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Dendrymery jako transportery leków i materiału genetycznego .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Układy transportujące leki do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Dendrymery jako nośniki siRNA .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Toksyczność dendrymerów <i>in vitro</i> oraz <i>in vivo</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>5. Cel pracy .....</b>	<b>33</b>
<b>6. Hipotezy badawcze .....</b>	<b>34</b>
<b>7. Materiały i metody badawcze .....</b>	<b>35</b>
<b>7.1. Materiały .....</b>	<b>35</b>
7.1.1. Materiał badawczy .....	35
7.1.1.1. Dendrymery .....	35
7.1.1.2. Białka enzymatyczne .....	38
7.1.1.3. siRNA .....	38
7.1.1.4. Linie komórkowe .....	38
7.1.2. Odczynniki .....	39
7.1.2.1. Odczynniki do hodowli komórek <i>in vitro</i> .....	39
7.1.2.2. Barwniki i sondy fluorescencyjne .....	39
7.1.2.3. Pozostałe odczynniki .....	40
<b>7.2. Stosowane metody badawcze .....</b>	<b>41</b>
7.2.1. Gaszenie fluorescencji reszt tryptofanu (Trp) w białku .....	41
7.2.2. Oznaczenie potencjału zeta .....	41
7.2.3. Spektropolarymetria dichroizmu kołowego (CD) .....	42
7.2.4. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) .....	43
7.2.4.1. Wizualizacja kompleksów dendrymerów SMT z białkami i siRNA .....	43
7.2.4.2. Ultrastruktura komórek N2a .....	43

---

7.2.5. Elektroforeza żelowa.....	44
7.2.6. Formowanie dendrypleksów i ich transfekcja .....	45
7.2.7. Hodowla komórkowa .....	45
7.2.7.1. Komórki adherentne.....	45
7.2.7.2. Komórki zawiesinowe .....	46
7.2.8. Oznaczenie właściwości cytotoksycznych dendrymerów .....	47
7.2.8.1. Test MTT.....	47
7.2.8.2. Test Alamar Blue.....	47
7.2.9. Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu z użyciem sondy H <sub>2</sub> DCFDA .....	48
7.2.10. Oznaczenie zmian błonowego potencjału mitochondrialnego z użyciem sondy JC-1.....	49
7.2.11. Ocena morfologii komórek .....	50
7.2.12. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych.....	50
7.2.12.1. Podwójne barwienie oranż akrydyny/bromek etydyny (AO/EB).....	50
7.2.12.2. Podwójne barwienie aneksyna V/ioddek propidyny (PI).....	51
7.2.13. Ocena morfologiczna oraz wizualizacja wyznakowanych fluoresceiną dendrypleksów w komórkach zawiesinowych .....	52
7.2.14. Ilościowa ocena stopnia wnikania dendrypleksów wyznakowanych fluoresceiną do komórek .....	53
7.2.15. Analiza statystyczna.....	53
<b>8. Wyniki .....</b>	<b>54</b>
<b>8.1. Oddziaływania dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z wybranymi białkami enzymatycznymi .....</b>	<b>54</b>
8.1.1. Gaszenie fluorescencji reszt tryptofanu (Trp) w badanych białkach .....	55
8.1.2. Potencjał zeta.....	61
8.1.3. Zmiany struktury drugorzędowej białek.....	64
8.1.4. Wizualizacja kompleksów dendrymerów SMT z białkami.....	71
<b>8.2. Wpływ dendrymerów hybrydowych na mysie komórki nerwowe linii N2a i mHippoE-18 .....</b>	<b>73</b>
8.2.1. Cytotoksyczność dendrymerów SMT wobec mysich linii komórkowych..	74
8.2.2. Poziom reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach .....	76
8.2.3. Zmiany mitochondrialnego potencjału błonowego .....	79

---

8.2.4. Zmiany poziomu reaktywnych form tlenu, mitochondrialnego potencjału błonowego oraz żywotności komórek mHippoE-18 i N2a pod wpływem dendrymeru SMT1 w zależności od czasu inkubacji .....	81
8.2.5. Morfologia komórek linii N2a oraz mHippoE-18.....	83
8.2.6. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych.....	86
8.2.6.1. Podwójne barwienie oranż akrydyny/bromek etydyny (AO/EB).....	86
8.2.6.2. Podwójne barwienie aneksyna V/jodek propidyny (PI).....	88
8.2.7. Ultrastruktura komórek N2a .....	90
<b>8.3. Dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe jako nanonośniki siRNA .....</b>	<b>93</b>
8.3.1. Potencjał zeta.....	94
8.3.2. Zmiana struktury drugorzędowej siRNA.....	95
8.3.3. Elektroforeza żelowa.....	98
8.3.4. Wizualizacja kompleksów dendrymerów SMT z siRNA .....	101
8.3.5. Cytotoksyczność dendrypleksów wobec komórek zawieszinowych.....	103
8.3.6. Internalizacja dendrypleksów wyznakowanych fluoresceiną do komórek .....	105
8.3.7. Analiza morfologiczna oraz wizualizacja wyznakowanych fluoresceiną dendrypleksów w komórkach zawieszinowych .....	106
8.3.8. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą podwójnego barwienia aneksyna V/jodek propidyny .....	107
<b>9. Dyskusja.....</b>	<b>110</b>
<b>9.1. Oddziaływania dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z wybranymi białkami enzymatycznymi .....</b>	<b>110</b>
<b>9.2. Wpływ dendrymerów hybrydowych na mysie komórki nerwowe linii N2a i mHippoE-18 .....</b>	<b>118</b>
<b>9.3. Dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe jako nanonośniki siRNA .....</b>	<b>126</b>
<b>10. Wnioski .....</b>	<b>134</b>
<b>11. Streszczenie .....</b>	<b>135</b>
<b>12. Summary .....</b>	<b>138</b>
<b>13. Literatura .....</b>	<b>140</b>

**Wykaz skrótów**

A $\beta$	–	peptyd beta amyloidu
AChE	–	acetylocholinoesteraza
AD	–	choroba Alzheimera
Ann-V	–	aneksyna V
AO	–	oranż akrydyny
AP	–	fosfataza alkaliczna
API	–	jelitowa fosfataza alkaliczna
APL	–	fosfataza alkaliczna tkankowo niespecyficzna
APP	–	łożyskowa fosfataza alkaliczna
AST	–	aminotransferaza asparaginianowa
BBB	–	bariera krew-mózg
BBTB	–	bariera krew-mózg-nowotwór
BChE	–	butyrylocholinoesteraza
B14	–	linia komórkowa fibroblastów chomika chińskiego
Ca9-22	–	ludzka linia nowotworu dziąseł
CBS	–	dendrymery karbokrzemowe
CBS-CS	–	dendrymery karbokrzemowe posiadające wiązania węgiel-krzem
CBS-OS	–	dendrymery karbokrzemowe posiadające wiązania tlen-krzem
CC50	–	stężenie cytotoksyczne 50%
CD	–	dichroizm kołowy
CNT	–	nanorurki węglowe
CPD	–	kationowe dendrymery fosforowe
CS	–	chitozan
DAPI	–	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DCF	–	2',7'-dichlorofluoresceina
DCFH <sub>2</sub>	–	2',7'-dichlorodihydrofluoresceina
DDS	–	system dostarczania leków
DMEM	–	medium do hodowli komórek Eagle'a Dulbecco
DMSO	–	dimetylosulfotlenek
DNA	–	kwasy deoksyrybonukleinowy
DOX	–	doksorubicyna

---

dsRNA	– dwuniciowy RNA
EB	– bromek etydyny
EPR	– efekt zwiększonej przepuszczalności naczyniowej i zatrzymywania małych i dużych cząsteczek w tkance guza nowotworowego
ER	– retikulum endoplazmatyczne
FBS	– płodowa surowica bydlęca
FITC	– izotiocyanian fluoresceiny
GA	– aparat Golgiego
GPI	– glikozylofosfatydyloinozytol
H <sub>2</sub> DCFDA	– dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
HFF	– immortalizowane ludzkie fibroblasty napyłki
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności
HL-60	– linia komórek ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej
HSV	– wirus opryszczki pospolitej
JC-1	– jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolo-karbocyaniny
KB	– linia komórkowa wyprowadzona z tkanki nowotworu jamy nosowo-gardłowej
LB	– ciała blaszkowate
LDH	– dehydrogenaza L-mleczanowa
LDV	– laserowy pomiar prędkości metodą Dopplera
M	– mitochondrium
MAP-Tau	– białko tau związane z mikrotubulami
Mi	– mikrokosmki
mHippoE-18	– mysia linia embrionalnych immortalizowanych komórek hipokampalnych
MRI	– magnetyczny rezonans jądrowy
mRNA	– matrycowy RNA
MTT	– bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenylotetrazoliowy
MVB	– ciała pęcherzykowe
N	– jądro komórkowe
N2a	– mysia linia komórek nerwiaka płodowego (neuroblastomy)



---

NADH	– forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NAD <sup>+</sup>	– forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NK	– komórki układu odpornościowego odpowiedzialne za zjawisko naturalnej cytotoxyczności
Nu	– jąderko
OUN	– ośrodkowy układ nerwowy
PALS	– analiza fazy rozproszenia światła
PAMAM	– dendrymery poliamidoaminowe
PAMAM-hyd-DOX	– koniugaty hydrazonowe dendrymeru PAMAM i doksorubicyny
PBS	– zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
PD	– choroba Parkinsona
PDT	– terapia fotodynamiczna
PEI	– polietyloimina
PI	– jodek propidyny
PLL	– polilizyna
PBMC	– jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PrP <sup>Sc</sup>	– patogenne odmiany białka prionowego
RFT	– reaktywne formy tlenu
RISC	– kompleks wyciszający indukowany przez RNA
RNA	– kwas rybonukleinowy
RNAi	– interferencja RNA
RNaza A	– rybonukleaza A
RPMI-1640	– pożywka opracowana w Roswell Park Memorial Institute zawierająca zwiększony poziom inozytolu
siRNA	– małe interferujące RNA
SL	– lizosomy wtórne
SM	– stwardnienie rozsiane
SMT1	– dendrymer karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowy generacji pierwszej
SMT2	– dendrymer karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowy generacji drugiej
TEM	– transmisyjny mikroskop elektronowy

Trp	- tryptofan
VPD	- dendrymer wiologenowo-fosforowy
$\Psi_m$	- błonowy potencjał mitochondrialny
$\Theta$	- eliptyczność molowa
$\lambda$	- długość fali

## Wstęp

Dendrymery – nanocząstki zsyntetyzowane po raz pierwszy w 1978 roku, zawdzięczają swoją popularność wyjątkowej trójwymiarowej topologii, wielofunkcyjności, specjalnym właściwościom chemicznym i fizycznym oraz szerokiej gamie potencjalnych zastosowań, które nie są osiągalne dla cząstek o strukturze liniowej. Unikalne właściwości dendrymerów takie jak dokładnie zdefiniowana wielkość i struktura, a także elastyczność oraz monodispersyjność to główne powody, dla których są one tak intensywnie badane pod kątem wykorzystania w medycynie. Mimo iż właściwości tych nanocząstek zostały określone w szerokim zakresie, szczególnie te fizykochemiczne, ich wpływ na systemy biologiczne pozostał w dużej mierze niezbadany. Biorąc pod uwagę zastosowanie dendrymerów jako nośników oligonukleotydów, siRNA, czy też leków, należy poznać ich właściwości biologiczne, w tym toksyczność oraz biokompatybilność.

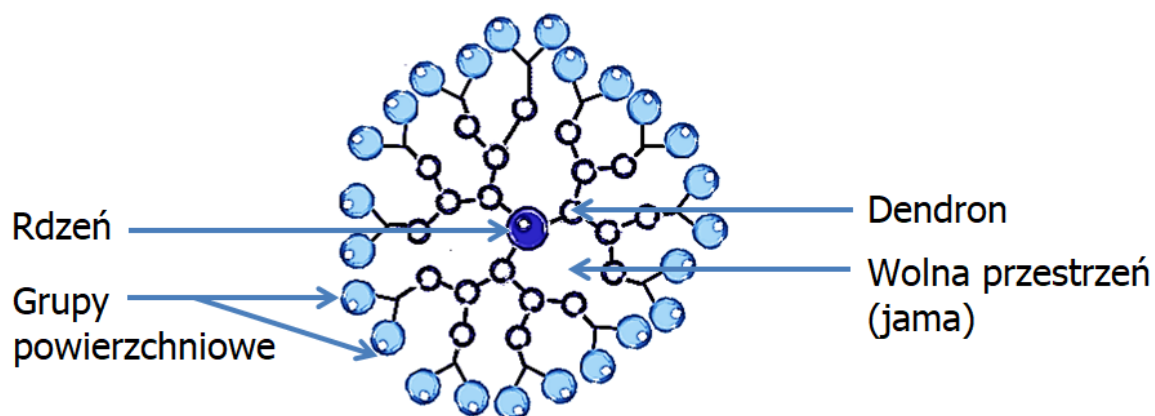
Przedmiotem poniższej pracy są dwa dendrymery hybrydowe niskiej generacji. Dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe (SMT) powstały jako hybryda trzech dobrze poznanych klas dendrymerów: karbokrzemowych, fosforowych oraz wiologenowo-fosforowych.

Przeprowadzone badania są próbą określenia właściwości biologicznych nowej klasy dendrymerów hybrydowych karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych dwóch generacji, celem ich potencjalnego wykorzystania w przyszłości, jako nośników dla leków lub leków *per se*, w zaburzeniach ośrodkowego układu nerwowego (OUN), jak również nośników materiału genetycznego w terapii genowej.

## 1. Dendrymery oraz ich zastosowanie

### 1.1. Dendrymery – charakterystyka ogólna

Dendrymery – monodispersyjne polimery o dobrze zdefiniowanej, symetrycznej strukturze – od lat 80-tych przyciągają uwagę szerokiego grona naukowców. Zsyntetyzowane po raz pierwszy w 1978 roku przez Fritza Vögtla (Buhleier i wsp., 1978), a wkrótce potem niezależnie również przez zespoły Tomalii i Newkome’a (Tomalia i wsp., 1985; Newkome i wsp., 1985), nanocząstki, zawdzięczają swoją popularność wyjątkowej trójwymiarowej topologii, wielofunkcyjności, specjalnym właściwościom chemicznym i fizycznym oraz szerokiej gamie potencjalnych zastosowań, które nie są osiągalne dla cząstek o strukturze liniowej. W budowie tych polimerów można wyróżnić centralnie położony rdzeń oraz promieniście odchodzące od niego dendrony (gałęzie), kończące się grupami funkcyjnymi (Ryc. 1). Istnieje możliwość selektywnej funkcjonalizacji i modyfikacji cząsteczek, dzięki którym można w precyzyjny sposób dostosowywać ich właściwości. Grupa tych nanopolimerów posiada szereg potencjalnych zastosowań w dziedzinie medycyny, jak również poza nią, m.in. w procesach przemysłowych ( Szymański i wsp., 2012; Gupta i Nayak, 2015).



Ryc. 1. Budowa dendrymeru. Opracowanie własne.

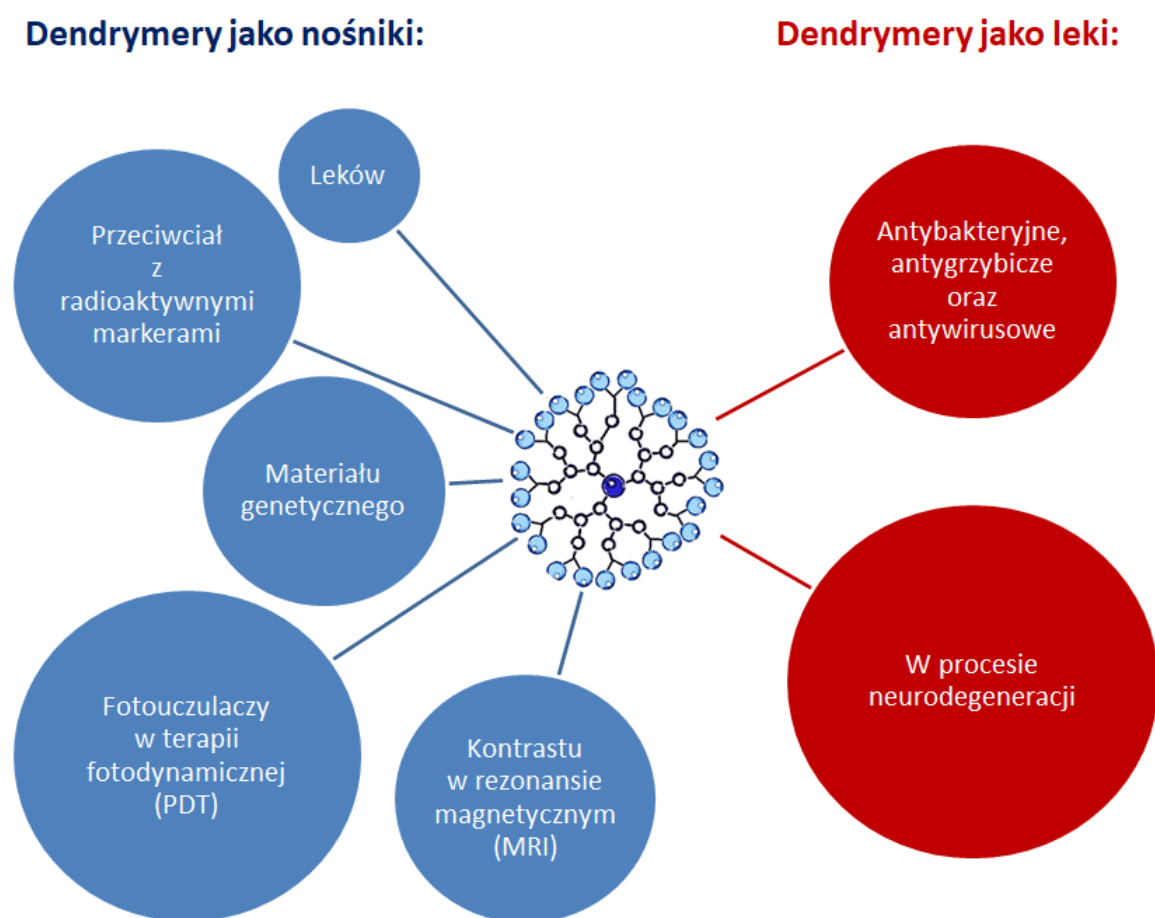
Trójwymiarowe dendrymery różnią się właściwościami od polimerów liniowych. Jednakże, jak podkreśla Lee i wsp. (2005), dendrymery posiadają wiele korzystnych cech w kontekście ich zastosowań medycznych, w tym:

- ich biodystrybucja oraz właściwości farmakokinetyczne mogą być w kontrolowany i precyzyjny sposób dostosowane poprzez określenie rozmiaru i struktury dendrymeru, wysoką jednorodność chemiczną i strukturalną oraz monodispersyjność, dzięki którym istnieje możliwość ograniczenia rozbieżności pomiędzy różnymi partiami syntezy oraz w jej obrębie,
- możliwość funkcjonalizacji m.in. lekami, ligandami, czy chromoforami (poprzez przyłączenie do grup powierzchniowych lub wypełnienie wolnych przestrzeni wewnątrz nanocząsteczki) oraz zwiększenie pojemności cząsteczki (wzrost generacji),
- możliwość zwiększenia biodegradowalności cząstek poprzez dobór ich składu chemicznego.

Pomimo wymienionych powyżej korzyści, dendrymery nadal stoją przed wieloma wyzwaniami związanymi z wprowadzeniem na rynek opartych na nich leków. Jednym z nich jest minimalizacja kosztów związanych z syntezą cząstek na skalę przemysłową. Może to stać na przeszkodzie w wykorzystaniu tych obiecujących nanocząstek w praktyce. Jednakże, naukowcy nie ustają w tworzeniu nowych grup dendrymerów o udoskonalonych właściwościach w kontekście ich zastosowań medycznych (Lee i wsp., 2005).

## 1.2. Dendrymery oraz ich zastosowanie w badaniach biomedycznych

Intensywnie prowadzone badania naukowe, których przedmiotem były dendrymery, zaowocowały powstaniem szerokiej bazy publikacji dotyczących możliwego zastosowania tych polimerów w diagnostyce oraz terapii, jako nośników leków, kwasów nukleinowych, plazmidów, czy oligonukleotydów, lub też jako leków *per se* (Ryc. 2).



Ryc. 2. Przykładowe medyczne zastosowania dendrymerów. Opracowanie własne.

Pierwszą kompletną klasę dendrymerów, które zostały zsyntetyzowane, scharakteryzowane i skomercjalizowane, stanowią dendrymery poliamidoaminowe (PAMAM) (Tomalia i wsp., 1985; Tomalia, 1996).

Dostępne komercyjnie dendrymery PAMAM mogą być łatwo modyfikowane i funkcjonalizowane. Dzięki zmianie ich właściwości, takich jak ładunek powierzchniowy czy lipofilowość, możliwe jest zwiększenie zakresu ich zastosowań biologicznych (Albertazzi i wsp., 2013).

Dane literaturowe wskazują, że dendrymery PAMAM mogą zwiększać aktywność i rozpuszczalność niektórych leków w wodzie. Wykorzystanie dendrymerów PAMAM jako nośników sulfametoksazolu (leku będącego antybiotykiem bakteriostatycznym) przyczyniło się do wzrostu aktywności antybakteryjnej leku oraz spowodowało zwiększenie jego rozpuszczalności w wodzie (Ma i wsp., 2007). W hodowlach *in vitro*, na linii komórkowej HFF (immortalizowane ludzkie fibroblasty napletka), modyfikowane dendrymery PAMAM wykazywały działanie antywirusowe wobec wirusa HSV-1 i HSV-2 (Bourne i wsp., 2000).

Dendrymery PAMAM są też stosowane do transportu leków przeciwnowotworowych takich jak cisplatyna, metotreksat czy doksorubicyna (DOX). Enkapsulacja cisplatyny wewnątrz cząsteczki dendrymeru PAMAM skutkuje powstaniem koniugatu o stopniowym uwalnianiu leku, a także większą kumulacją w litym guzie i mniejszą toksycznością w porównaniu do samej cisplatyny. Koniugaty hydrazonowe (PAMAM-hyd-DOX) powstałe pomiędzy cząsteczką doksorubicyny, a cząsteczką dendrymeru PAMAM wykazują toksyczne działanie w stosunku do komórek linii Ca9-22 (ludzka linia nowotworu dziąseł). Acetylowane dendrymery PAMAM, wzbogacone kwasem foliowym (ligand dla komórek nowotworowych), fluoresceiną (fluorofor) i metotreksatem (lek przeciwnowotworowy), podawane myszom będącym nosicielami podskórnego nowotworu KB, powodowały znaczącą redukcję guza w stosunku do grupy kontrolnej (podawana sól fizjologiczna) (Kukowska-Latallo i wsp., 2005).

Dendrymery PAMAM, zakończone grupami aminowymi są wykorzystywane jako niewirusowe czynniki transportowe, zwiększające poziom transfekcji DNA na drodze endocytozy do komórek i ostatecznie do jądra komórkowego. Na rynku istnieje komercyjnie dostępny produkt oparty na dendrymerach PAMAM (SuperFect®), służący do transfekcji DNA do komórek eukariotycznych (Bielinska i wsp., 1999; Dass, 2002; Sekowski i wsp., 2008).

Dendrymery PAMAM zostały również wykorzystane jako czynniki służące do obrazowania klinicznego, w terapii fotodynamicznej (Esfand i Tomalia, 2001; Sekowski i wsp., 2008; Lee i wsp., 2009; Albertazzi i wsp., 2013).

W przypadku rozpuszczalnych w wodzie dendrymerów fosforowych, zsyntetyzowanych po raz pierwszy w roku 1990 przez Engela, głównym elementem ich struktury jest hydrofobowy rdzeń zbudowany z atomów fosforu oraz hydrofilowe grupy powierzchniowe, które ułatwiają tworzenie hydrożelów oraz pęcherzyków w wodzie. Ponadto, wbudowany w gałęzie atom fosforu ułatwia ich syntezę oraz dalszą modyfikację cząsteczki dendrymeru, a także zwiększa jej stabilność termiczną niezależnie od generacji (Rengan i Engel 1990).

Trzeba jednak pamiętać, że na stabilność termiczną i rozpuszczalność dendrymerów fosforowych, jak i wszystkich innych grup dendrymerów, będzie miał wpływ rodzaj grup powierzchniowych oraz ich ewentualne modyfikacje. Obecność fosforu w strukturze dendrymeru jest szczególnie ważna ze względu na oddziaływanie z układami biologicznymi i warunkuje wykorzystanie tego typu dendrymerów jako nanonośników, czy leków *per se*. Udowodniono, że dendrymery fosforowe stymulują aktywację i namnażanie ludzkich monocytów i komórek NK, intensyfikują wzrost komórek nerwowych, wykazują właściwości przeciw wirusowi HIV, chorobie Alzheimerera (dzięki zdolności do hamowania agregacji peptydu  $A\beta_{1-28}$  i białka MAP-Tau), chorobie Parkinsona (dzięki możliwości hamowania agregacji  $\alpha$ -synukleiny), przeciwprionowe (*in vivo*), a także znajdują zastosowanie jako środki obrazujące (*in vivo*) oraz wektory do transfekcji. Kationowe dendrymery fosforowe (CPD) generacji trzeciej i czwartej mogą wchodzić w oddziaływania zarówno z naładowanymi jak i obojętnymi błonami lipidowymi i liposomami (Wasiak i wsp., 2011; Lazniewska i wsp., 2013b; Caminade i Majoral 2013; Caminade i wsp., 2017).

Pierwsze doniesienia odnośnie zastosowania struktury karbokrzemowej, które może być postrzegane, jako dendrymer karbokrzemowy (CBS) pierwszej generacji pochodzą z roku 1978 z prac Fetters'a i wsp. (Hadjichristidis i wsp., 1978). Jednakże, to dopiero trzy zespoły badawcze: Van Der Made i wsp. (1992, 1993), Zhou i wsp. (1992, 1993) i Muzafarov i wsp. (1993), niezależnie od siebie zgłaszały pełną syntezę dendrymerów CBS różnych generacji (Frey i Schlenk, 2000).



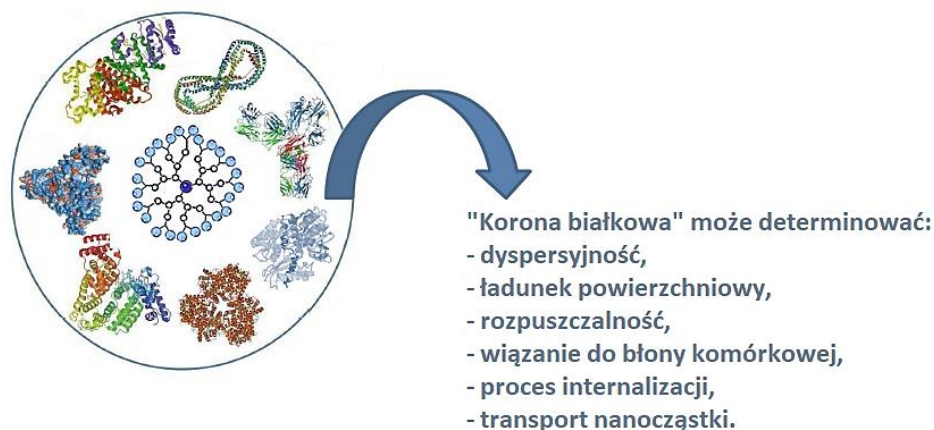
Cechą charakterystyczną tej grupy dendrymerów jest obecność krzemu w ich cząsteczce, a więc również wiązań węgiel-krzem, które odpowiadają za stabilność kinetyczną i termodynamiczną oraz za hydrofobową naturę wnętrza cząsteczki. Można ich charakter zmienić poprzez modyfikację hydrofilowych grup powierzchniowych. Stąd rozpuszczalne w wodzie dendrymery karbokrzemowe z różnymi modyfikacjami grup powierzchniowych stwarzają możliwość wykorzystania ich w badaniach biomedycznych. Dane literaturowe wskazują też na przeciwwirusową aktywność dendrymerów CBS modyfikowanych resztami cukrowymi. Aktywność przeciw wirusowi HIV wykazują dendrymery CBS z grupami karboksylowymi, siarczanowymi i naftylosulfonianowymi. Ponadto wykazano, że dendrymery CBS mogą zapobiegać grypie. Natomiast dendrymery CBS posiadające na powierzchni grupy amonowe lub aminowe posiadają właściwości przeciwbakteryjne i mogą być wykorzystywane jako nośniki dla siRNA (Sakamoto i wsp., 2009; Arnáiz i wsp., 2014; Milowska i wsp., 2015).

W stosunku do poprzednio wymienionych grup dendrymerów, tj. PAMAM, fosforowych oraz karbokrzemowych, dendrymery wiologenowo-fosforowe (VPD) charakteryzują się niską toksycznością. Zważając na fakt, że dendrymery VPD posiadają w swojej strukturze toksyczne grupy wiologenowe, mogące stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzkiego, jak również toksyczny atom fosforu, ich niska toksyczność jest zaskakująca. Dodatkowo, przy stosunkowo niskiej toksyczności, dendrymery zawierające grupy wiologenowe wykazują aktywność przeciw wirusowi HIV oraz HSV, a także przeciw pęcherzykowemu zapaleniu jamy ustnej, wirusowi Punta Toro, Sindbis, reowirusowi i wirusom syncytialnym układu oddechowego. Należy jednak pamiętać, że właściwości tych dendrymerów zależą od ich masy cząsteczkowej, wielkości, liczby jednostek wiologenowych i rodzaju grup powierzchniowych. W przypadku dendrymerów VPD, dane literaturowe, wskazują na ich właściwości przeciwko *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, czy *Proteus vulgaris*. Generacja 0 dendrymerów VPD posiada również zdolność do hamowania aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BChE) oraz do hamowania agregacji  $\alpha$ -synukleiny, dzięki czemu może być ona potencjalnie stosowana w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (Ciepluch i wsp., 2012; Lazniewska i wsp., 2013a; Milowska i wsp., 2014).

## 2. Oddziaływanie dendrymerów z białkami

Ocena właściwości biologicznych powinna być pierwszym, bardzo ważnym krokiem podczas weryfikacji możliwości zastosowania nanocząstek w medycynie. Określanie rozmiaru, kształtu, rodzaju grup powierzchniowych, ładunku oraz innych parametrów fizycznych i chemicznych jest równie ważne, jak i samo zrozumienie oddziaływań, jakie zachodzą między nanosystemami, a głównymi układami molekularnymi i biochemicznymi organizmu, np. białkami, kwasami nukleinowymi, błonami, komórkami, narządami, czy tkankami. Należy podkreślić, że zastosowanie nanocząstek w medycynie związane jest także z ich oddziaływaniem z płynami biologicznymi. Tak więc nieuchronnie będą one powodowały złożoną reakcję biologiczną w organizmie, w którym się pojawią. Co więcej, surowica w swoim składzie zawiera co najmniej 2392 różnych białek (Adkins i wsp., 2002; Shen i wsp., 2005), a płyn mózgowo-rdzeniowy ponad 2600 (Schutzer i wsp., 2010).

W zależności od modelu oddziaływania z białkami, zaproponowano podział nanocząstek na grupy "twarde" i "miękkie" (Tomalia, 2009, 2012; Kannan i wsp., 2014). Jeśli nanocząstka ma sztywną powierzchnię, duży rozmiar (wyższy niż molekula białka) i silny ładunek, może adsorbować białka na swojej powierzchni za pomocą sił elektrostatycznych lub van der Waalsa, oddziaływań hydrofobowych lub wiązań wodorowych, tworząc powłokę białkową – tak zwaną "koronę białkową". Może to determinować wiązanie do błony komórkowej, transport, biokompatybilność, ładunek powierzchniowy, a także wydalanie i biologiczną aktywność nanocząstek (Ryc. 3) (Florek i wsp., 2017).



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie „korony białkowej” na nanocząstkach oraz jej potencjalny wpływ właściwości dendrymerów (Florek i wsp., 2017).

Według Tomalii i wsp., (2009) dendrymery klasyfikuje się do klasy miękkich nanostruktur. Shcharbin z zespołem (2017a) wysunęli wniosek, że siła elektrostatyczna odgrywa dominującą rolę w oddziaływaniach cząsteczki naładowanego dendrymeru z molekułą białka, a oddziaływania te zależą od ich właściwości: elastyczności i ładunku powierzchniowego dendrymeru, sztywności struktury białka i lokalizacji naładowanych aminokwasów. Wiązanie dendrymerów z białkiem może skutkować zmianą jego struktury drugorzędowej, konformacji, ruchliwości wewnątrzcząsteczkowej i aktywności funkcjonalnej białka. Jednak silnie zależy to od stopnia elastyczności struktury białka (Ryc. 4).



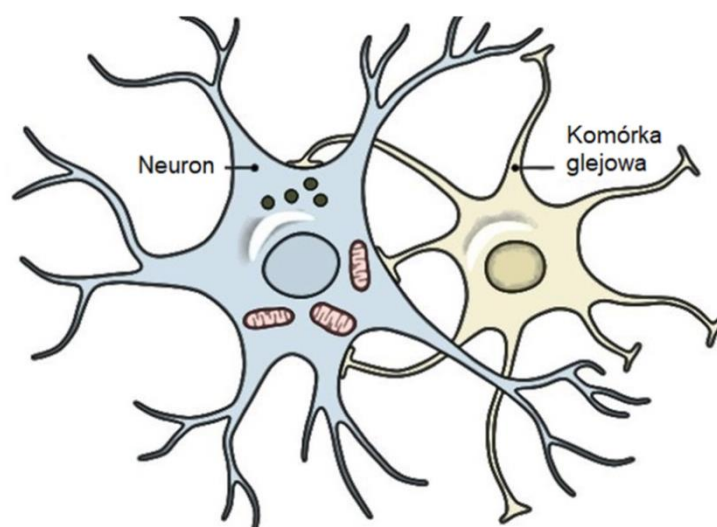
- zależą od ładunku powierzchniowego oraz elastyczności obu części (Giri i wsp. 2011; Shcharbin i wsp. 2005; 2014; 2015; Ionov i wsp. 2016),
- zmniejszają się przy wzroście siły jonowej (Shcharbin i wsp. 2005),
- zależą od pH (Shcharbin i wsp. 2005),
- zależą od przyłączonych ligandów (Page i wsp. 1996; Andre i wsp. 1999; Giehm i wsp. 2008; Froehlich i wsp. 2009),
- mogą wywoływać zmiany w strukturze obu części (Shcharbin i wsp. 2014).

**Dominującą rolę w interakcjach cząstki naładowanego dendrymeru z molekułą białka odgrywa siła elektrostatyczna.**

Ryc. 4. Mechanizm oddziaływania naładowanych dendrymerów z molekułami białka (Shcharbin i wsp., 2017a).

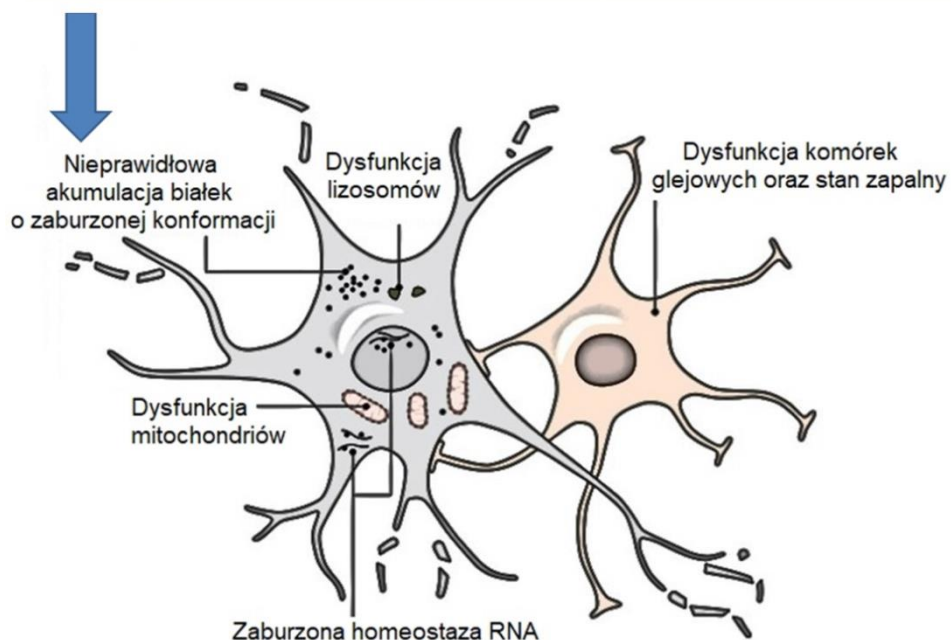
Oddziaływania dendrymerów z białkami można też traktować jako zjawisko niekorzystne. Jak podkreślono powyżej, dendrymery mogą wpływać na zmiany konformacyjne białek, co w konsekwencji będzie wpływało na zmianę lub całkowitą utratę ich aktywności lub też ich agregację. Z drugiej strony, utworzenie korony białkowej na powierzchni dendrymeru nieuchronnie wpłynie na jego właściwości oraz biodystrybucję. Jednakże, takie właściwości kationowych dendrymerów powodują również, że są one zdolne do usuwania agregatów białkowych w komórkach nerwowych. Agregaty takie powstają w wyniku akumulacji zdegenerowanych białek o nieprawidłowej strukturze przestrzennej. W konsekwencji powstają blaszki starcze, splątki neurofibrylarne, ciała Picka, ciała Lewy'ego i inne patologiczne zmiany w budowie neuronów. Niewłaściwy przebieg procesu nabywania struktury przestrzennej przez białko (procesu fałdowania) lub też zaburzenia w mechanizmach chroniących komórkę przed negatywnymi skutkami powstawania oraz gromadzenia się białek o nieprawidłowej konformacji może być wynikiem mutacji genu kodującego białko, jego potranslacyjnej obróbki, urazu, niedokrwienia, czy stresu oksydacyjnego. Ponieważ akumulacja patologicznych białek jest toksyczna dla komórek nerwowych i jest przyczyną neurodegeneracji, ich usuwanie może być jedną ze strategii leczenia tego rodzaju chorób. Do tego typu schorzeń neurodegeneracyjnych zaliczamy m.in. choroby: Parkinsona, taupatie, Alzheimerera, czy prionowe (Ryc. 5) (Szwed i Miłowska, 2012).

## PRAWIDŁOWO FUNKCJONUJĄCE KOMÓRKI



## NEURODEGENERACJA

Choroba	Choroba Alzheimer	Choroba Parkinsona	Choroba Huntingtona	Choroby prionowe
Gen	APP, PSEN 1, PSEN 2	SNCA, PRKN	HTT	PRNP
Białko	$\beta$ -amyloid	$\alpha$ -synukleina parkina	huntingtyna	PrP <sup>Sc</sup> – patologiczne białko prionowe



Ryc. 5. Schematyczne przedstawienie głównych procesów przyczyniających się do neurodegeneracji oraz białek, których zaburzenia odgrywają rolę w poszczególnych chorobach neurodegeneracyjnych. Opracowanie własne na podstawie Popiel i wsp., 2011; Szwed i Miłowska, 2012; Katsnelson i wsp., 2016.

Dzięki temu, że dendrymery posiadają powinowactwo do białek, są zdolne do obniżania stężenia peptydów. Ponadto, wykazano, że im wyższa generacja dendrymeru, w tym konkretnym przypadku dendrymeru PAMAM, tym większy stopień inhibicji procesu tworzenia amyloidu, a także bardziej efektywne rozbijanie już istniejących agregatów. Wykazano również, że dendrymery hamują agregację białek odpowiedzialnych za chorobę Alzheimera i choroby prionowe (Klajnert i wsp., 2006a; 2006b; 2007).

Stwierdzono też, że kationowe dendrymery są zdolne do usuwania agregatów prionowych zarówno z komórek myszy, jak i homogenatów mózgowych zawierających PrP<sup>Sc</sup> (patogenne odmiany białka prionowego), a także do rozbijania złogów  $\beta$ -amyloidowych (Lynch i Dawson, 2008; Miłowska i wsp., 2015; Chen i Banaszak Holl, 2017; Shcharbin i wsp., 2017a).

Ponadto, Miłowska i wsp., w swoich pracach wykazali, że dendrymery PAMAM, wiologenowo-fosforowe, karborzemowe oraz fosforowe, posiadają potencjał inhibicyjny w procesie agregacji  $\alpha$ -synukleiny (Miłowska i wsp., 2013, 2014, 2015,).

Dane literaturowe wskazują także, że wykorzystując oddziaływania dendrymery-białko można stworzyć oparte na nich nanonośniki, które będą zdolne przekroczyć barierę krew mózg, jak również dostarczyć lek do dowolnej tkanki. Będą również zdolne do aktywacji układu odpornościowego, przy jednoczesnym zmniejszeniu ich ogólnej toksyczności w stosunku do organizmu oraz kontrolowanej biodystrybucji (Shcharbin i wsp., 2017a).



### 3. Dendrymery jako transportery leków i materiału genetycznego

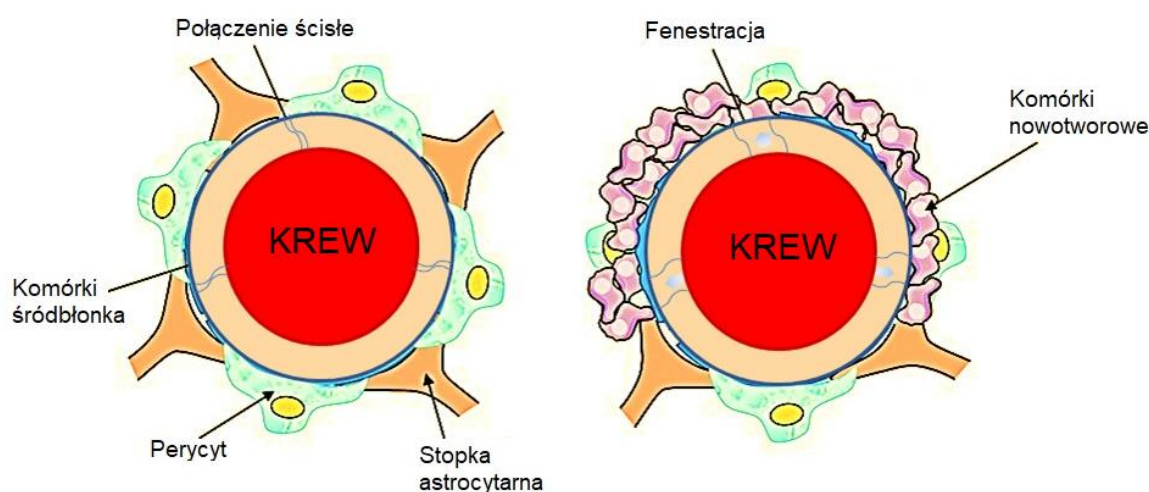
#### 3.1. Układy transportujące leki do ośrodkowego układu nerwowego (OUN)

Według danych literaturowych, do 2050 roku, udział osób powyżej 65 roku życia w społeczeństwie będzie wynosił około 16% (Karande i wsp., 2015). W starzejącej się populacji zwiększa się będzie zatem częstość występowania takich zaburzeń neurologicznych jak choroba Alzheimera (AD), choroba Parkinsona (PD), stwardnienie rozsiane (SM) i pierwotne guzy mózgu (Kanwar i wsp., 2012). Jak zauważył Mignani i wsp. (2017), około miliard ludzi cierpi na zaburzenia związane z ośrodkowym układem nerwowym (OUN). Ze względu na natychmiastową potrzebę poprawy diagnostyki oraz terapii zaburzeń psychicznych, rozwojowych, urazowych, zapalnych, zakaźnych i zwyrodnieniowych układu nerwowego, zainteresowanie nanoneuromedycyną szybko rośnie (Kanwar i wsp., 2012; Gendelman i wsp., 2015). Ze względu na fakt, iż ośrodkowy układ nerwowy jest w znacznym stopniu odizolowany od bezpośredniego wpływu środowiska zewnętrznego poprzez barierę krew-mózg (BBB – ang. blood-brain barrier), jego leczenie oraz diagnostyka są problematyczne. Ponadto, w terapii oraz diagnostyce zaburzeń OUN powinno być możliwe pokonanie bariery krew-mózg, bez wpływu na jej przepuszczalność. Zmiany w przepuszczalności BBB lub jej uszkodzenie sprzyjają powstawaniu stanów neurozapalnych oraz neurodegeneracji i występują w kilku chorobach o wysokiej częstości występowania, takich jak udar, choroba Alzheimera (AD), czy choroba Parkinsona (PD). Aczkolwiek nawet uszkodzona bariera krew-mózg, o zwiększonej przepuszczalności, może stanowić poważne wyzwanie dla transportu leków do mózgu.

Złożona w swej budowie bariera krew-mózg, będąca połączeniem cech anatomicznych i fizjologicznych, zbudowana jest z wyspecjalizowanych ścisłych połączeń pomiędzy komórkami śródbłonna, które wyścielają naczynia włosowate mózgu. Istnienie tych połączeń ścisłych stanowi naturalną barierę w biernym transporcie wielu substancji z krwi do mózgu. Stąd dominującą formą jest transport aktywny. W wyniku tak precyzyjnej regulacji, skład środowiska otaczającego neurony OUN jest ściśle określony, a także objęty precyzyjną kontrolą.

Na zasadzie prostej dyfuzji, do środowiska mózgu, docierać mogą obecne w osoczu substancje, takie jak: gazy ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), związki rozpuszczalne w lipidach (etanol, eter, hormony steroidowe, tarczycowe i niektóre leki lipofilne) oraz peptydy o masie cząsteczkowej pomiędzy 400 – 800 Da. W sposób selektywny, dzięki aktywności BBB, transportowane do tkanki mózgowia są pozostałe substancje, z szybkością odwrotnie proporcjonalną do wielkości ich cząsteczek i wprost proporcjonalną do ich rozpuszczalności lipidowej. Dlatego też, związki spolaryzowane, hydrofilne będą transportowane wolniej. Ze względu na tak wysoką selektywność tylko 2% leków jest w stanie osiągnąć cel terapeutyczny (Brzezińska i Ziaja, 2012; Wohlfart i wsp., 2012; Gao, 2016; Mignani i wsp., 2017).

Wraz z powstawaniem i progresją nowotworów mózgu można zaobserwować znaczące zmiany w naczyniach krwionośnych guza, które podsumowano wspólnym określeniem bariery krew-mózg-nowotwór (BBTB – ang. blood-brain tumor barrier). Patologiczna charakterystyka BBTB obejmuje zaburzoną organizację komórek śródbłonna, uszkodzone połączenia ścisłe, powiększenie mitochondriów, zmienną grubość podśródbłonkowej blaszki podstawnej oraz poszerzoną przestrzeń okołonacyniową (Ryc. 6).



Ryc. 6. Graficzne przedstawienie różnicy między BBB i BBTB (Li i wsp., 2017).

Zmiany indukowane przez rozwój nowotworu zmieniają integralność BBB, w miejscu ich powstawania, co skutkuje zwiększoną lokalną przepuszczalnością naczyń mózgowych. Niemniej jednak BBTB nadal zachowuje pewne podstawowe cechy BBB, a jej przepuszczalność jest wysoce zależna od stopnia zaawansowania



choroby. W przypadku nowotworów o niskim stopniu złośliwości, unaczynienie guza będzie wykazywać większe podobieństwo do zdrowej BBB. Tak więc będzie ona mniej przepuszczalna dla nanocząsteczkowych środków terapeutycznych, czy kontrastowych, niż silnie zdeformowana BBB w nowotworach o wysokim stopniu złośliwości, gdzie przepuszczalność bariery będzie zwiększona. Dlatego też przyjmuje się, że dostarczanie leków do nowotworów mózgu o wysokim stopniu złośliwości jest łatwiejsze niż w przypadku zdrowej lub mniej uszkodzonej bariery krew-mózg. Należy jednak podkreślić, że BBTB jest nadal jedną z głównych przeszkód w diagnostyce i terapii nowotworów mózgu, ze względu na osłabiony efekt EPR (ang. - enhanced vascular permeability and retention - efekt zwiększonej przepuszczalności naczyniowej i zatrzymywania małych i dużych cząsteczek w tkance guza nowotworowego) i ograniczone dostarczanie większości hydrofilowych cząsteczek (Li i wsp., 2017).

Stąd, naukowcy opracowali różne sposoby przewycięzania BBB. Metody fizyczne zazwyczaj wykorzystują inwazyjne metody neurochirurgiczne i wewnątrzczaszkowe systemy dostarczania leków (DDS – ang. drug delivery systems). Obejmują one techniki podawania środków terapeutycznych bezpośrednio do komórek mózgowych, do kresomózgowia, płynu mózgowo-rdzeniowego, jak również stosowanie cewników, wewnątrzmożgowych implantów, czy innych urządzeń. Wymienione powyżej metody fizyczne posiadają jednak wady i ograniczenia, a ponadto są wysoce toksyczne. W związku z tym, żaden z ww. sposobów nie jest idealnym rozwiązaniem na pokonanie BBB. Strategia taka powinna być minimalnie inwazyjna, klinicznie skuteczna, z możliwością łatwego podania leku, która zapewni jego skuteczność terapeutyczną (Karande i wsp., 2015; Gao, 2016; Mignani i wsp., 2017).

Wydaje się więc, że jednym z najbardziej obiecujących systemów dostarczania leków (DDS) do narządów takich jak mózg, są nanocząstki. Najbardziej obiecującą cechą nanocząstek jest to, że są one w stanie skutecznie dostarczać środki terapeutyczne do trudno dostępnych regionów oraz zapewniać niezbędną ochronę transportowanemu lekom. Właśnie dlatego nanocząstki są uważane za jeden z najbardziej skutecznych i wszechstronnych systemów dostarczania leków (Saraiva i wsp., 2016).

### 3.2. Dendrymery jako nośniki siRNA

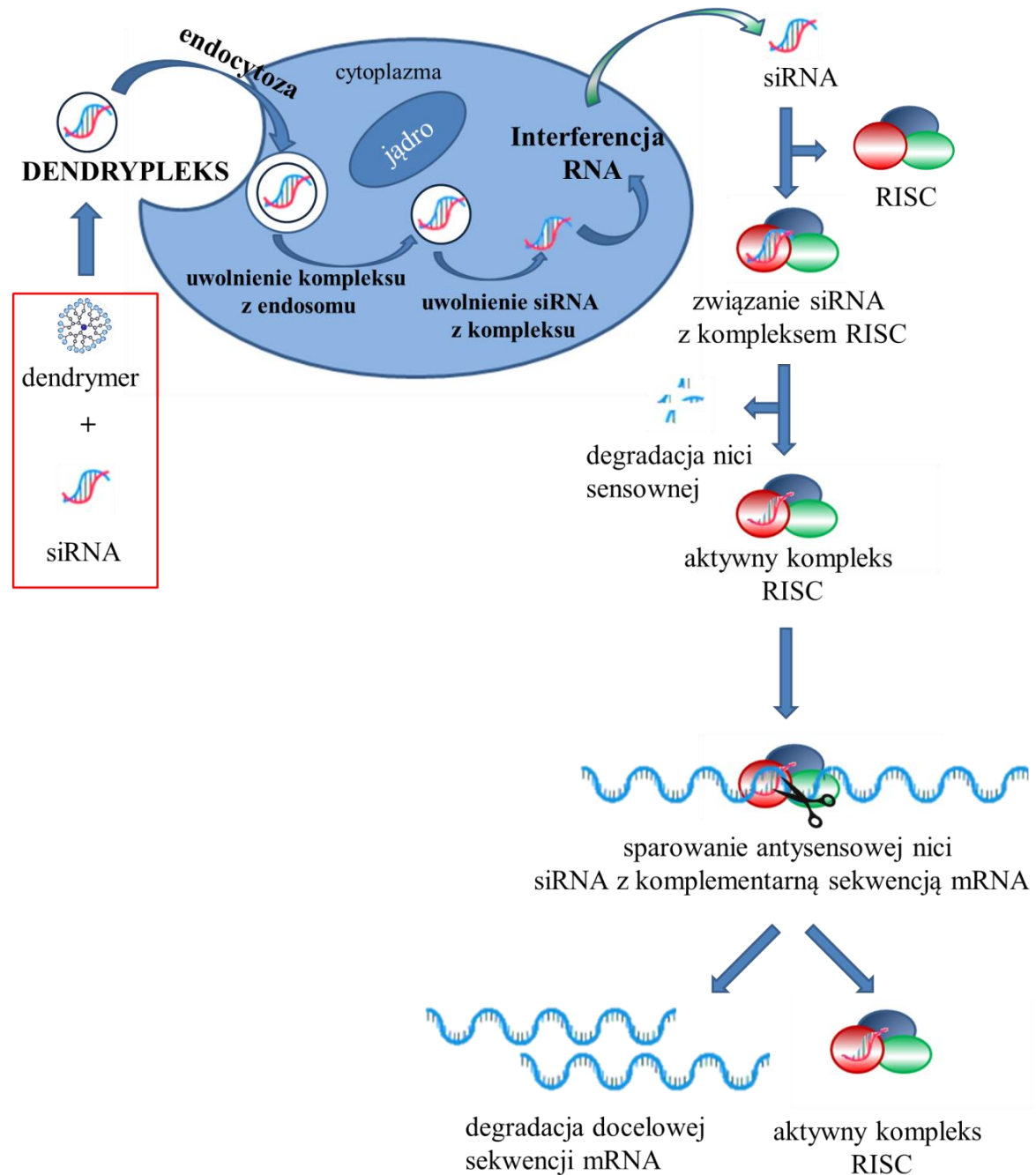
Koncepcja dostarczania genów została opracowana w 1963 r. (Lederberg, 1963) i od tego czasu stała się atrakcyjnym podejściem do leczenia zaburzeń nabytych i genetycznych, takich jak nowotwory, mukowiscydoza, hemofilia, choroby naczyniowe czy choroby zakaźne. Dwa główne wektory, wirusowe oraz niewirusowe, są wykorzystywane zarówno w badaniach, jak i próbach klinicznych. Pierwsza próba kliniczna miała miejsce w 1989 rok (Rosenberg i wsp., 1990) i od tego czasu nieustannie tworzone są i testowane nowe nośniki kwasów nukleinowych, zarówno te wirusowe, jak i niewirusowe. Pomimo dużej wydajności w dostarczaniu kwasów nukleinowych wektory wirusowe posiadają jednak poważne ograniczenia. Można do nich zaliczyć immunogenność, stosunkowo niewielką ilość transportowanego DNA/RNA oraz wysoką toksyczność. Sprzyja to rozwojowi wektorów niewirusowych, które oferują nietoksyczny i wysoce wydajny system dostarczania genów, ze względu na łatwą syntezę, elastyczny profil wytwarzania i niską toksyczność (Mintzer i Simanek, 2009; Thapa i Narain, 2016).

Zważając na poprzednio wymienione cechy, najbardziej atrakcyjnymi wśród niewirusowych wektorów wydają się być polimery kationowe. W wyniku oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami aminowymi polimerów i ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi kwasu nukleinowego tworzą się kompleksy, czyli tzw. polipleksy. Wiele kationowych polimerów zostało skomercjalizowanych i jest stosowanych do projektowania niewirusowych wektorów, m.in. polietylenoimina (PEI), polilizyna (PLL), dendrymery kationowe, glikopolimery, czy chitozan (CS). Wśród niewirusowych nośników genów można opisać różne typy wektorów w zależności od ich składu. Najczęściej wykorzystywane są lipopleksy (lipid + DNA lub RNA) i polipleksy (polimer + DNA lub RNA), ale istnieją również inne związki, które są stopniowo stosowane w terapii genowej, takie jak nanorurki węglowe (CNT) lub dendrypleksy (dendrymery + DNA/RNA). Kompleksy te mają chronić kwasy nukleinowe przed degradacją, zwiększać ich wychwyty komórkowy poprzez oddziaływanie z powierzchniowymi anionowymi proteoglikanami, a także wydłużyć okres ich półtrwania w cytoplazmie.

Jednakże należy zaznaczyć, że wychwyty komórkowy może różnić się znacząco w zależności od rodzaju wektorów kationowych, typu komórek, czy ilości proteoglikanów na ich powierzchni (Alexis i wsp., 2008; Mintzer i Simanek, 2009; Thapa i Narain, 2016, Perez Ruiz de Garibay, 2016).

W przypadku osób cierpiących z powodu jednogenowych chorób dziedzicznych, terapia genowa powszechnie kojarzy się z wprowadzeniem prawidłowej postaci zmutowanego genu do komórek. Najczęściej jednak terapia genowa polega na wprowadzaniu dodatkowych kopii genów, które z różnych powodów nie funkcjonują prawidłowo. Dzięki temu można zwiększyć ekspresję genów chroniących (m.in. przed rozwojem miażdżycy), czy też genów hamujących podziały komórek nowotworowych. Jednakże, terapia genowa to nie tylko sekwencje kodujące. Możliwe jest także wykorzystanie kwasów nukleinowych, których sekwencje nie kodują genów, np. nukleotydy antysensowne, czyli krótkie sekwencje DNA wiążące się do docelowej cząsteczki mRNA i blokujące jego translację.

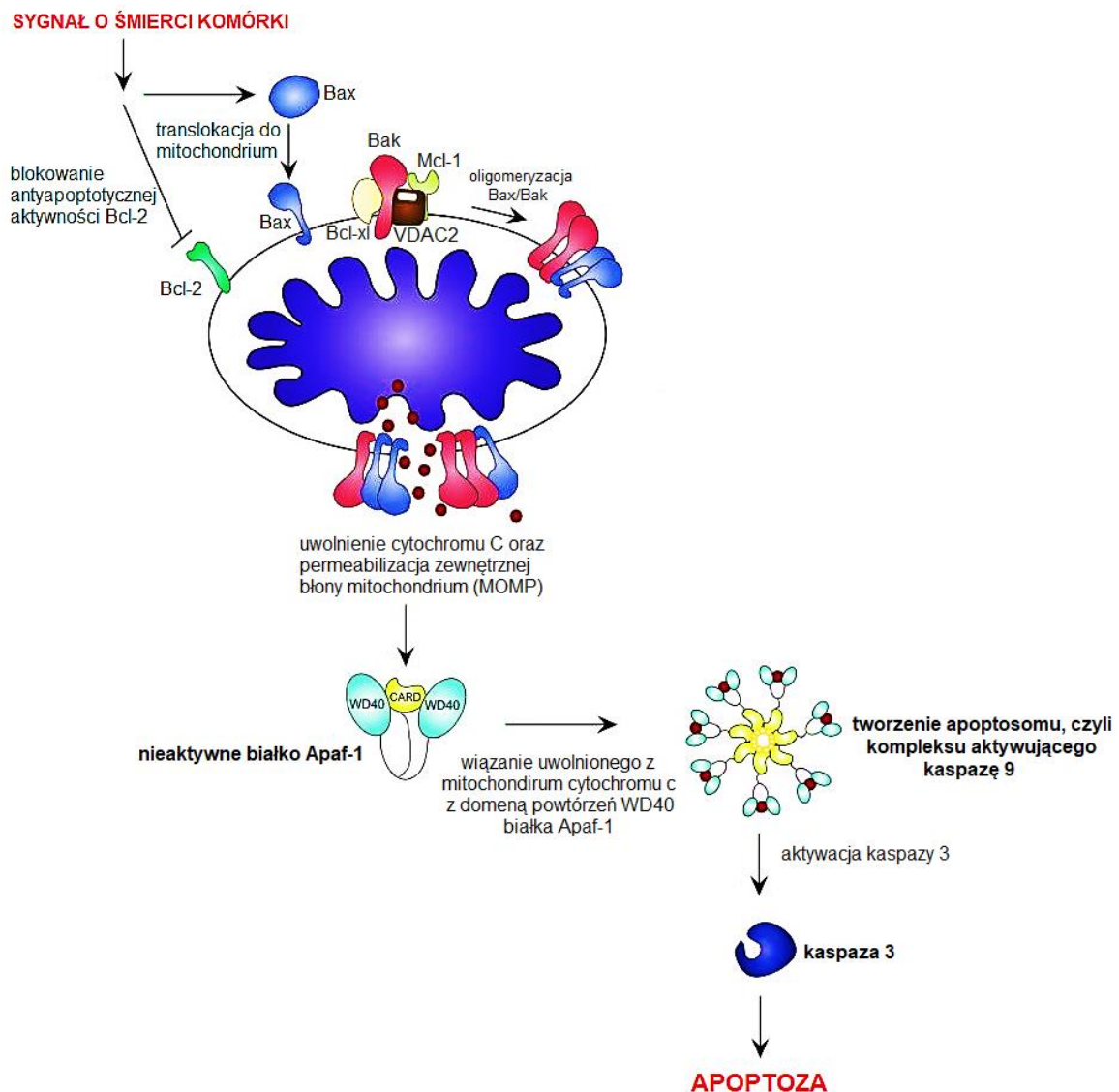
W ostatnim czasie duże zainteresowanie wywołuje możliwość wykorzystania mechanizmu interferencji RNA (RNAi). Jest to mechanizm wyciszania lub też wyłączenia ekspresji genu przez krótkie, dwuniciowe fragmenty RNA (Palauqui i wsp., 1997; Voinnet i Baulcombe, 1997). W procesie RNAi, endogenne długie dwuniciowe cząsteczki RNA są cięte przez endorybonukleazę (Dicer) na małe interferujące RNA (siRNA) o długości około 21 – 23 par zasad. Powstała cząsteczka siRNA jest włączana do kompleksu białkowego o aktywności nukleazowej, czyli kompleksu wyciszającego indukowanego przez RNA (RISC – ang. RNA-induced silencing complex). Dupleks siRNA jest rozwijany, a jedna z nici (nić antysensowna) pozostaje związana z kompleksem RISC. Ta aktywna forma RISC wiąże się następnie z komplementarną sekwencją mRNA i indukuje jego degradację. W konsekwencji zapobiega to translacji docelowego mRNA, a więc syntezie łańcucha polipeptydowego. Cały proces jest katalityczny, ponieważ po degradacji docelowego mRNA aktywna forma RISC jest regenerowana i może uczestniczyć w kolejnym cyklu prowadzącym do degradacji docelowej sekwencji mRNA (Ryc. 7) (Liu i wsp., 2012).



Ryc. 7. Schematyczne przedstawienie wprowadzenia na drodze endocytozy cząsteczki siRNA do komórki z wykorzystaniem dendrymerów oraz włączenie jej do mechanizmu interferencji RNA. Opracowanie własne na podstawie Liu i wsp., 2012.

W przypadku nowotworów, nieprawidłowe wzorce ekspresji genów związane ze zwiększoną proliferacją, przetrwaniem oraz inwazją komórek, prowadzą do ich przerostu i powstawania mas nowotworowych.

Komórki prawidłowe są w stanie odpowiednio reagować na sygnały, które otrzymują. W normalnych warunkach wszelkie informacje o uszkodzeniu komórkowego DNA prowadzą do zatrzymania cyklu komórkowego i jeśli zakres uszkodzenia przekracza możliwości naprawy, do programowanej śmierci komórki, takiej jak apoptoza. W związku z tym, bardzo ważna jest równowaga pomiędzy sygnałami pro- i anti- apoptotycznymi, która zapobiega rozwojowi nowotworów. Głównymi wykonawcami procesu apoptotycznego są kaspazy, podczas gdy główna funkcja regulacyjna spoczywa na białkach z rodziny Bcl-2 (Gross, 2016; Harrington, 2016; Karjoo i wsp., 2016). Schemat ścieżki aktywacji apoptozy szlakiem zależnym od mitochondriów przedstawiono na Rycinie 8.



Ryc. 8. Ścieżka aktywacji apoptozy szlakiem zależnym od mitochondriów (Osellame i wsp., 2012).

Rodzina Bcl-2 obejmuje zarówno geny odpowiedzialne za śmierć komórek, takie jak bax, bcl-xS i bik, jak i te, które pełnią funkcję ochronną, takie jak bcl-2, bcl-xL i mcl-1 (Merry i Korsmeyer, 1997; Dzitruk i wsp., 2015;). Antyapoptotyczni członkowie tej rodziny często ulegają nadekspresji w ludzkich nowotworach i mogą pośredniczyć w oporności na chemioterapię i promieniowanie (Akar i wsp., 2008; Takahashi i wsp., 2013). W związku z tym, obniżenie poziomu ekspresji tych genów wydaje się być dobrą strategią terapeutyczną. Jednakże, aby osiągnąć ten cel potrzebne jest ukierunkowane narzędzie terapeutyczne. Jak wspomnieli Pai i wsp. (2006), interferencja RNA jest silnym posttranskrypcyjnym procesem wyciszania genów, który może być bardzo obiecującym rozwiązaniem w dziedzinie terapii nowotworów. RNAi jest mechanizmem regulującym ekspresję kluczowych genów, determinujących los komórek, za pomocą dwuniciowego RNA (dsRNA). siRNA, a mianowicie krótkie interferujące RNA, posiadające komplementarne sekwencje, jest zdolne do wyciszania genów przez promowanie cięcia mRNA. Aby skutecznie dostarczać siRNA do komórek nowotworowych potrzebny jest odpowiedni nośnik, który poza transportem kwasu nukleinowego do miejsca docelowego, będzie zdolny chronić go przed degradacją (Mello i Conte, 2004; Novina i Sharp, 2004; Pai i wsp., 2006; Masiero i wsp., 2007; Chitwood i Timmermans, 2010).

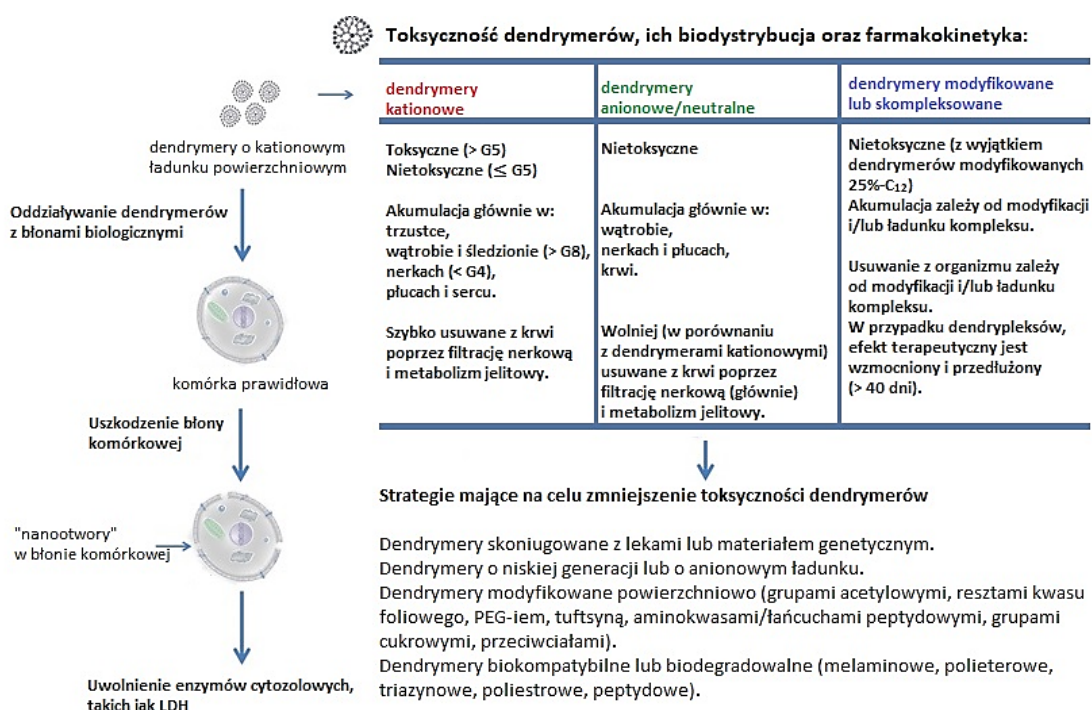
Przez analogię do polipleksów i lipopleksów, dendrymery skompleksowane z kwasem nukleinowym to dendrypleksy. Ponieważ wykazano, że dendrymery są wysoce wydajnymi nośnikami kwasów nukleinowych i krótkich oligodezoksynukleotydów, wiele technik przeniesiono do badania dendrypleksów. Nanocząstki te mogą przyłączać jak i enkapsulować siRNA, a tym samym chronić jego cząsteczki przed degradacją i promować wychwyt komórkowy poprzez endocytozę. Preferowane są nanocząstki o wielkości około 100 nm. Dzieje się tak ponieważ, podczas endocytozy klatrynozależnej wytwarzane są pęcherzyki o średnicy około 100 nm. Tego typu endocytoza jest odpowiedzialna za wychwyt wielu makrocząsteczek ze środowiska pozakomórkowego. Po internalizacji, kompleks siRNA/nośnik zostaje uwolniony z endosomów do cytoplazmy, gdzie dochodzi do uwolnienia siRNA z kompleksu. Wolny siRNA zostaje włączony do mechanizmu RNAi i w konsekwencji prowadzi do wyciszenia genu docelowego co zostało schematycznie przedstawione na Rycinie 7. Dlatego też, transport materiału genetycznego jest jednym z najbardziej obiecujących zastosowań dendrymerów (Albertazzi i wsp., 2010; Shcharbin i wsp., 2010).

#### 4. Toksyczność dendrymerów *in vitro* oraz *in vivo*

Nanocząstki, w tym również dendrymery, aby mogły znaleźć praktyczne zastosowanie w medycynie muszą wykazywać niską toksyczność, nieimmunogenność, jak również biokompatybilność i biodegradowalność (Neerman i wsp., 2004).

Wiele publikacji potwierdza możliwość wykorzystania dendrymerów jako nośników leków. Poprawiają one rozpuszczalność i biodostępność farmaceutyków o słabej rozpuszczalności, jednakże wykazują one również toksyczność w stosunku do systemów biologicznych. Efekt ten jest przypisywany obecności ładunku kationowego na powierzchni dendrymerów, który posiada zdolność oddziaływania z anionowymi błonami biologicznymi oraz tworzeniu w nich „nanootworów”, co zwiększa przepuszczalność błony, a w konsekwencji może prowadzić do śmierci komórki w warunkach *in vivo* (Jain i wsp., 2010).

Mechanizm oddziaływania dendrymerów kationowych z błonami biologicznymi oraz toksyczność dendrymerów wraz ze strategiami mającymi na celu jej ograniczenie przedstawiony został na Rycinie 9.



Ryc. 9. Mechanizm oddziaływania dendrymerów kationowych z błonami biologicznymi oraz ocena toksyczności, biodystrybucji i farmakokinetyki dendrymerów wraz ze strategiami mającymi na celu ograniczenie ich toksyczności. Opracowanie własne na podstawie Jain i wsp., 2010; Shcharbin i wsp., 2014.

Bez względu na szerokie farmaceutyczne i medyczne zastosowanie dendrymerów, toksyczność związana z obecnością grup amonowych na ich powierzchni, czyli z wielokrotnym ładunkiem kationowym, ogranicza ich potencjalne zastosowanie kliniczne (Brazeau i wsp., 1998; Wilbur i wsp., 1998; Malik i wsp., 2000; Shcharbin i wsp., 2014).

Tymczasem, jak wykazuje Shcharbin i wsp. (2014), model analizy toksyczności dendrymerów na podstawie badań *in vitro* powinien zostać ulepszony, ponieważ pomimo obserwowanej cytotoksyczności *in vitro*, prawie wszystkie dendrymery niskich lub średnich generacji nie wykazują toksyczności *in vivo*. Według danych literaturowych tylko wysokie generacje niemodyfikowanych dendrymerów kationowych, w odpowiednio wysokich dawkach, wykazują toksyczność *in vivo*. Ponadto, modyfikacje dendrymerów zmniejszają ich toksyczność, a powstałe u zwierząt zaburzenia wracają do normy w okresie rekonwalescencji po zaprzestaniu podawania im dendrymerów. W przypadku kompleksów dendrymerów z kwasami nukleinowymi (dendrypleksów), neutralizacja ładunku powierzchniowego dendrymerów w kompleksie, prowadzi do zmniejszenia ich toksyczności *in vivo*. Dlatego też, biorąc pod uwagę przejściową akumulację tych nanocząstek w wątrobie, trzustce, sercu i nerkach, ryzyko nieodwracalnego uszkodzenia lub niewydolności tych narządów wewnętrznych, jest niewielkie. Metabolizm dendrymerów silnie zależy od ich struktury chemicznej. Stabilne dendrypleksy mają dłuższy czas krążenia niż ich wolne odpowiedniki. Ogromna większość dendrymerów i dendrypleksów nie jest immunogenna *in vivo* (Shcharbin i wsp., 2014).

Warto podkreślić, że chemiczna modyfikacja powierzchni dendrymerów jest ważną strategią dla przezwyciężenia problemów związanych z ich toksycznością. Jednakże, należy również rozważyć modyfikację metod *in vitro*, aby mogły one w pełni korespondować z wynikami otrzymywanymi *in vivo* (Jain i wsp., 2010; Shcharbin i wsp., 2014).



## 5. Cel pracy

Badanie właściwości biologicznych to pierwszy bardzo ważny etap weryfikujący możliwość zastosowania nanocząstek w medycynie. Określenie rozmiaru, kształtu, architektury, grup powierzchniowych, ładunku oraz innych parametrów fizykochemicznych jest równie ważne jak zrozumienie oddziaływania danej nanostruktury z białkami. Chociaż właściwości nanocząstek zostały określone w szerokim zakresie, ich wpływ na systemy biologiczne pozostał w dużej mierze niezbadany. W przypadku dendrymerów, dokładnie zdefiniowana wielkość i struktura, a także elastyczność oraz monodispersyjność to główne powody, dla których są one badane pod kątem wykorzystania w medycynie. Biorąc pod uwagę zastosowanie dendrymerów jako nośników dla leków, materiału genetycznego, czy też leków *per se*, należy poznać ich właściwości biologiczne.

Celem pracy jest ocena właściwości biologicznych dwóch generacji nowej grupy dendrymerów hybrydowych – karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych (SMT).

Cele szczegółowe:

1. Określenie oddziaływania dwóch generacji dendrymerów hybrydowych SMT z wybranymi białkami enzymatycznymi, tj. fosfatazą alkaliczną, dehydrogenazą L-mleczanową oraz aminotransferazą asparaginianową.
2. Ocena wpływu dwóch generacji dendrymerów hybrydowych SMT na mysie linie komórek nerwowych na podstawie analizy wybranych parametrów odpowiedzi komórkowej.
3. Wykazanie czy hybrydowe dendrymery SMT mogą być potencjalnymi nośnikami dla antyapoptotycznego siRNA.

## **6. Hipotezy badawcze**

1. Dendrymery hybrydowe SMT nie oddziałują z wybranymi białkami enzymatycznymi (AST, LDH, AP).
2. Dendrymery hybrydowe wykazują cytotoksyczność wobec mysich linii komórek nowotworowych.
3. Dendrymery hybrydowe SMT mogą być nośnikami dla siRNA.

## 7. Materiały i metody badawcze

### 7.1. Materiały

#### 7.1.1. Materiał badawczy

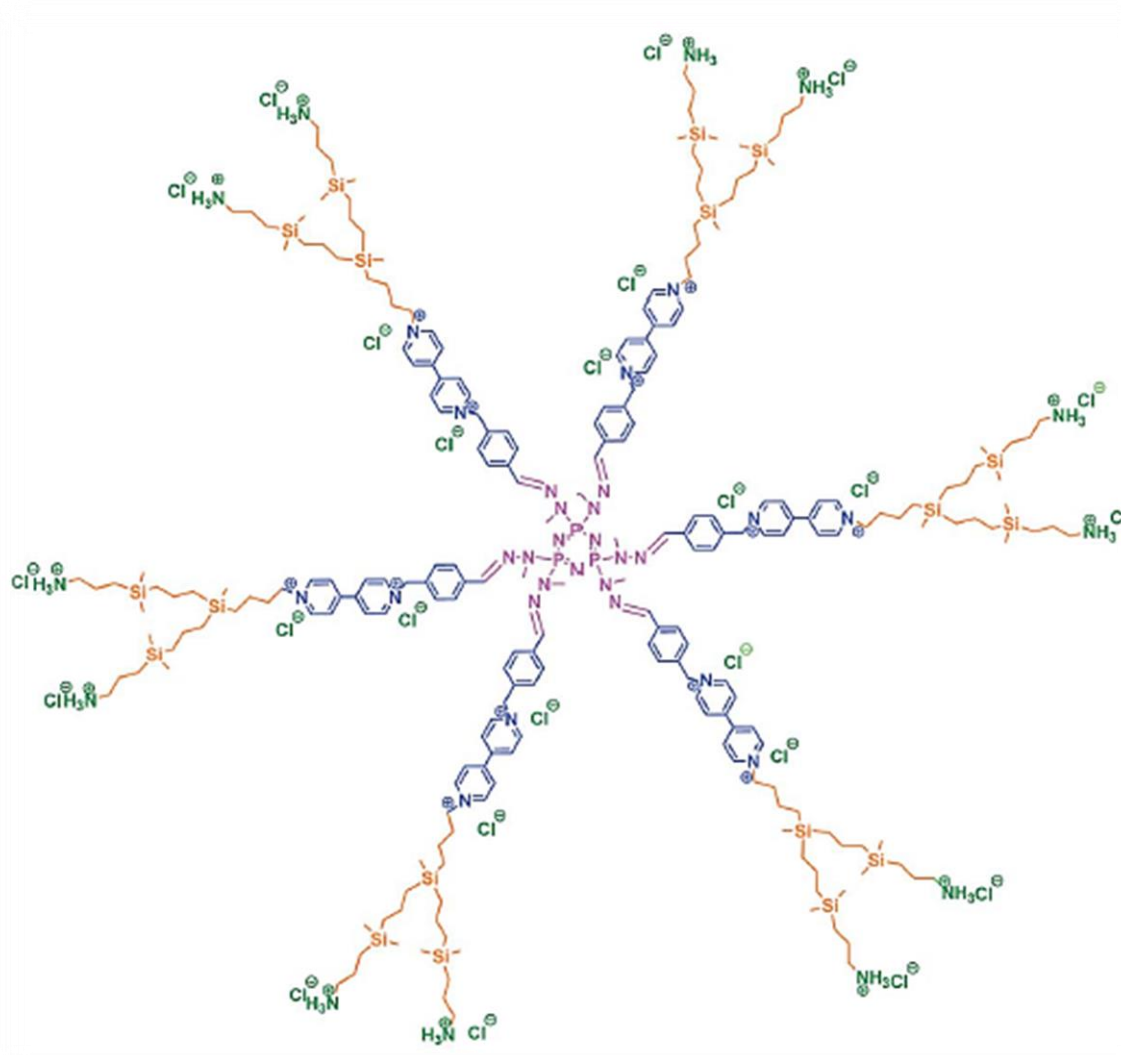
##### 7.1.1.1. Dendrymery

Kationowe dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe generacji pierwszej (SMT1) i drugiej (SMT2) zsyntetyzowano w Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá (Hiszpania) (Ryc. 10) (Moreno i wsp., 2015).

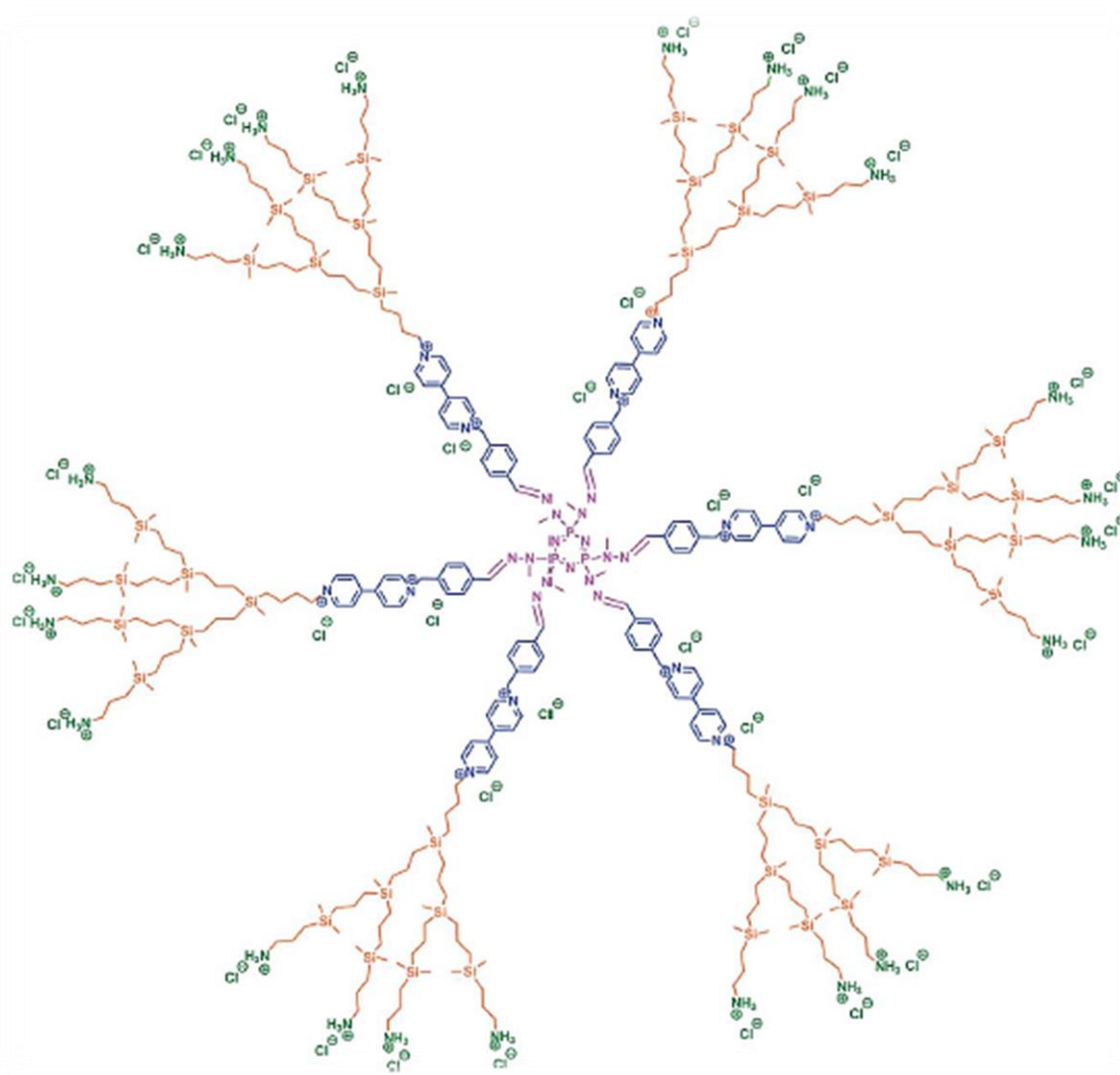
Dendrymery SMT posiadają dwa rodzaje grup kationowych: wynikające z obecności grup amonowych na powierzchni cząsteczki oraz wynikające z obecności czwartorzędowych grup wiologenowych wewnątrz cząsteczki (Tabela 1) (Moreno i wsp. 2015; Szwed i wsp., 2016).

Tabela. 1. Właściwości dendrymerów SMT1 i SMT2.

Dendrymer	Generacja	Grupy powierzchniowe	Ładunek wewnętrzny	Ładunek zewnętrzny	Masa cząsteczkowa [g/mol]
SMT1	1	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	+12	+12	5303,73
SMT2	2	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	+12	+24	8660,73



Ryc. 10A. Struktura chemiczna dendrymerów SMT1.



Ryc. 10B. Struktura chemiczna dendrymerów SMT2.

### 7.1.1.2. Białka enzymatyczne

W pracy wykorzystano trzy różne białka enzymatyczne, tj. fosfatazę alkaliczną (AP) z *E. coli* [EC 3.1.3.1, AP], dehydrogenazę L-mleczanową z mięśni królika (LDH) [EC 1.1.1.27, LDH] oraz ludzką aminotransferazę asparaginianową (AST) [ERMAD457IFCC, AST]. Wszystkie białka zostały zakupione w Sigma-Aldrich (USA).

### 7.1.1.3. siRNA

W pracy wykorzystano trzy różne antyapoptotyczne siRNA oraz jedno „scrambled” siRNA, czyli mieszaną sekwencję par zasad, jako kontrolę negatywną. Wszystkie siRNA zostały wybrane na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz publikacji (Dzmitruk i wsp., 2015; Ionov i wsp., 2015). siRNA o podanych poniżej sekwencjach zostały zsyntetyzowane w wersji niewykazującej fluorescencji oraz takiej, która fluorescencję wykazuje (skoniugowana z barwnikiem fluorescencyjnym – fluoresceiną):

- *siBcl-2* (E1s 5' -G CUG CAC CUG ACG CCC UUCtt 3', E1a 5' -GAA GGG CGU CAG GUG CAG Ctt 3'),
- *siBcl-xl* (E5s 5' -CAG GGA CAG CAU AUC AGA Gtt 3', E5a 5' -C UCU GAU AUG CUG UCC CUGtt 3'),
- *siMcl-1* (5'-GGA CUU UUA UAC CUG UUA Utt 3', Mcl1a 5' -AUA ACA GGU AUA AAA GUC Ctg 3'),
- „scrambled” siRNA (Scr1 5' -ACU CUA GCG GCA CCA UCG UGC Ctt 3', Scr2 5' -GGC ACG AUG GUG CCG CUA GAG Utt 3' ).

siRNA zostało zakupione w ABO Sp. Z o.o (Polska).

### 7.1.1.4. Linie komórkowe

W pracy wykorzystano trzy linie komórkowe: dwie mysie linie komórek nerwowych oraz ludzką linię komórek nowotworowych. Mysią linię nowotworową stanowiły komórki nerwiaka płodowego (neuroblastoma) N2a – zakupione w American Type Culture Collection ATCC (USA). Mysią linię nienowotworową, immortalizowaną stanowiły embrionalne komórki hipokampalne mHippoE-18 – zakupione w Cedarlane® (Burlington, Kanada).

Natomiast ludzką linię komórek nowotworowych stanowiły zawieszinowe komórki ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej HL-60, zakupione w ATCC (USA).

Dodatkowo w pracy wykorzystano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC), wyizolowane z krwi, przy użyciu Histopaque™ 1077. Krew od zdrowych dawców uzyskano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi.

### 7.1.2. Odczynniki

Wszystkie zastosowane w pracy roztwory sporządzono z zastosowaniem wody dejonizowanej, oczyszczonej w układzie odwróconej osmozy, o przewodności około 0,06  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Elix3/Mili-Q firmy Millipore). Ponadto, wszystkie z zastosowanych odczynników posiadały najwyższy z dostępnych stopni czystości.

#### 7.1.2.1. Odczynniki do hodowli komórek *in vitro*

Odczynnikami zastosowanymi do hodowli komórek były:

- medium hodowlane DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium), Gibco® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA);
- medium hodowlane RPMI 1640 (ang. Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium), Gibco® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA);
- roztwór Trypsin-EDTA 10X (Sigma Chemical Co., USA);
- bydlęca surowica płodowa (Sigma Chemical Co., USA);
- mieszanina antybiotyków penicylina/streptomycyna – 10 000 jednostek/ml penicyliny, 10 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycyny (Sigma Chemical Co., USA).

#### 7.1.2.2. Barwniki i sondy fluorescencyjne

W badaniach zastosowano poniższe barwniki i sondy fluorescencyjne:

- H<sub>2</sub>DCFDA (ang. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate), Invitrogen™ Molecular Probes™, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA);
- JC-1 (jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny ang. 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbo-cyanine iodide), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);

- jodek propidyny (ang. propidium iodide), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- bromek etydydy (ang. Ethidium Bromide), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- oranż akrydyny (ang. Acridine Orange), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- Biotium GELRED (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA);
- DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol, ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- falloidyna Texas Red-X® (ang. Texas Red-X® Phalloidin), (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

### 7.1.2.3. Pozostałe odczynniki

Pozostałymi zastosowanymi odczynnikami były:

- zestaw do wykrywania apoptozy z Aneksyną V – FITC (ang. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I), (BD Pharmingen™, BD, New Jersey, USA);
- alamarBlue™ Cell Viability Reagent, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA);
- MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotriazo-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu, (ang. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA);
- PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej w tabletkach (ang. Phosphate buffered saline tablets), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- roztwór RNazy A 50 U/mg (ang. RNase A), (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA);
- Histopaque®-1077, (Sigma Chemical Co., USA);
- agarozę NMP typ VII (ang. Normal Melting Point), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- DMSO (dimetylosulfotlenek, ang. dimethyl sulfoxide), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- odczynniki firmy POCh S.A, Gliwice, Polska – wszystkie odczynniki stosowane do sporządzenia roztworów oraz odczynniki wykorzystane do analiz z wykorzystaniem TEMu (NaOH, HCl, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>-EDTA, CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, etanol 96%, glicyna, octan uranylu, aldehyd glutarowy, czterotlenek osmu, tlenek propylenu, cytrynian ołowiu).



## 7.2. Stosowane metody badawcze

### 7.2.1. Gaszenie fluorescencji reszt tryptofanu (Trp) w białku

Pomiary gaszenia fluorescencji reszt tryptofanu metodą spektrofluorymetryczną dają możliwość uzyskania informacji na temat oddziaływania wybranego ligandu z białkiem. Jest to możliwe dzięki naturalnej fluorescencji białka, pochodzącej od aminokwasów aromatycznych, budujących jego cząsteczkę. Badając zmiany natężenia fluorescencji, w tym przypadku tryptofanu, można wnioskować o oddziaływaniu białko-dendrymer (Klajnert i Bryszewska, 2002). Wartość natężenia fluorescencji przy poszczególnych pomiarach została zmierzona przy użyciu spektrofluorymetru Perkin Elmer LS-55. Do obsługi spektrofluorymetru wykorzystano program FL WinLab 3.0.

W doświadczeniu zastosowano trzy różne białka, tj. fosfatazę alkaliczną (AP), dehydrogenazę L-mleczanową (LDH), aminotransferazę asparaginianową (AST) oraz dwie generacje dendrymerów SMT. Stężenie białek w eksperymencie utrzymywane było na stałym poziomie 1  $\mu\text{M}$ , natomiast stężenie dendrymerów było zmienne i mieściło się w zakresie 0 – 30  $\mu\text{M}$ . Badanie gaszenia fluorescencji białek w obecności dendrymerów prowadzone było w 10 mM buforze fosforanowym (pH = 7,4). Długość fali wzbudzenia wynosiła  $\lambda_{\text{wzb.}} = 296 \text{ nm}$ , a długości fal emisji  $\lambda_{\text{em.}} = 305 - 450 \text{ nm}$ . Przed wykonaniem pomiarów potwierdzono, że dendrymery SMT nie są wzbudzane stosowaną w pomiarach długością fali i nie emitują fluorescencji. Każde otrzymane widmo jest wynikiem co najmniej trzech niezależnych pomiarów.

### 7.2.2. Oznaczenie potencjału zeta

Pomiar potencjału zeta wykonano przy użyciu aparatu Zetasizer Nano ZS (Malvern). Potencjał zeta, czyli potencjał elektrokinetyczny cząsteczki, określany jest na zasadzie pomiaru jej mobilności elektroforetycznej w roztworze. Wyznaczenie potencjału zeta cząstek było możliwe dzięki wykorzystaniu metody analizy fazy rozproszenia światła PALS (phase analysis light scattering), wynikającej z pomiarów elektroforetycznych oraz laserowego pomiaru prędkości metodą Dopplera (LDV).

Potencjał zeta został obliczony przy pomocy oprogramowania firmy Malvern, według równania Helmholtza–Smoluchowskiego (Sze i wsp., 2003).

Pomiar potencjału zeta pozwolił określić, w jakich stosunkach molowych powstają elektrostabilne kompleksy białko/siRNA-dendrymer. Analiza zmian potencjału zeta w funkcji stosunku molowego może stanowić przybliżoną liczbę cząsteczek dendrymeru, które mogą przyłączyć się do jednej cząsteczki białka/siRNA. Liczba centrów wiązania jest punktem (X, O) odpowiadającym punktowi przecięcia dwóch linii prostych stycznych do krzywej potencjału zeta w funkcji stosunku molowego.

Wszystkie pomiary potencjału zeta wykonane były w 10 mM buforze fosforanowym (pH = 7,4), w temperaturze pokojowej. Przedstawione wyniki są średnią otrzymaną z co najmniej trzech niezależnych pomiarów. W pracy zastosowano następujące układy badawcze:

- a) białko – dendrymer SMT, gdzie stężenie białka w roztworze utrzymywane było na stałym poziomie wynoszącym  $C_{\text{białko}} = 0,5 \mu\text{M}$ , przy rosnącym stężeniu dendrymerów w zakresie stężeń od 0 do 50  $\mu\text{M}$ ;
- b) siRNA – dendrymer SMT, gdzie stężenie siRNA w roztworze utrzymywane było na stałym poziomie wynoszącym  $C_{\text{siRNA}} = 0,5 \mu\text{M}$ , przy rosnącym stężeniu dendrymerów w zakresie stężeń od 0 do 6  $\mu\text{M}$ .

### 7.2.3. Spektropolarymetria dichroizmu kołowego (CD)

Spektropolarymetria dichroizmu kołowego jest techniką pozwalającą na analizę struktury drugorzędowej zarówno białek jak i kwasów nukleinowych. Analiza zmian widm białek oraz siRNA pod wpływem dendrymerów została wykonana z wykorzystaniem spektropolarymetru CD Jasco-815.

Pomiary prowadzone były w kuwetach kwarcowych o drodze optycznej 5 mm, w temperaturze 37°C, w 10 mM buforze fosforanowym (pH = 7,4). Zastosowane stężenie białek przy pomiarach wynosiło  $C_{\text{białko}} = 1 \mu\text{M}$ , przy rosnącym stężeniu dendrymerów SMT w zakresie 0 – 15  $\mu\text{M}$ . Pomiary zostały wykonane w zakresie długości fal od 195 do 260 nm. W przypadku siRNA, badane stężenie wynosiło  $C_{\text{siRNA}} = 2 \mu\text{M}$ , przy rosnącym stężeniu dendrymerów w zakresie stężeń 0 – 20  $\mu\text{M}$ . Natomiast zakres długości fal zastosowanych do pomiaru widm siRNA wynosił od 200 do 320 nm.

Eliptyczność molowa ( $\Theta$ ) wyrażona jest jako  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  i została obliczona przy użyciu programu zapewnionego przez firmę Jasco (Yang i wsp., 1986; Bohm i wsp., 1992). Przedstawione wyniki są średnią otrzymaną z co najmniej trzech niezależnych pomiarów.

#### 7.2.4. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

##### 7.2.4.1. Wizualizacja kompleksów dendrymerów SMT z białkami i siRNA

W celu pokazania, że dendrymery SMT formują kompleksy z białkami lub siRNA wykorzystano transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) JEOL-10 (Japonia). Aby utworzyć kompleksy dendrymery dodano do każdego z białek w końcowym stosunku molowym 50:1 (dendrymer:białko). W przypadku dendrypleksów stosunek molowy dendrymerów do siRNA wynosił (5 – 10):1. Próbkę inkubowano przez 10 min, w temperaturze pokojowej. Następnie na siatce miedzianej o rozmiarze 200 mesh z pokrytą węglem powierzchnią umieszczano po 10  $\mu\text{l}$  przygotowanego roztworu i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Próbkę barwiono nasyconym 2% (m/v) roztworem octanu uranylu, przez 20 min. Obrazy TEM wykonano przy powiększeniu 15 000x i 100 000x. Otrzymane obrazy zostały odwrócone i wyostrzone.

##### 7.2.4.2. Ultrastruktura komórek N2a

Analizę TEM przeprowadzono w celu oceny zmian ultrastruktury komórek N2a. Komórki w gęstości  $2,5 \times 10^5$  komórek/ml wysiewano w medium DMEM w objętości 1 ml na 6 dołkowe płytki. Komórki inkubowano przez 24 godz. przed dodaniem związków w warunkach hodowlanych. Następnie dodawano dendrymery SMT1 oraz SMT2, w stężeniu końcowym 5  $\mu\text{M}$  na dołek i inkubowano przez 24 godz. Po tym czasie komórki delikatnie przemywano 0,1 M roztworem PBS i utrwalano 2,5% roztworem aldehydu glutarowego, przez dwie godziny. Następnie utrwalone komórki mechanicznie oddzielono od podłoża i zawieszono w 1,5% agarozie oraz trzykrotnie przepłukano buforem PBS. Bloki agarowe utrwalano w 1% roztworze czterotlenku osmu, przez 2 godz. w temp. 4°C. Po tym czasie materiał był odwadniany w stopniowanej serii etanolu, a następnie w tlenku propylenu. Kolejno komórki osadzono w mieszance żywicznej Epon-Spur. Za pomocą szklanego noża próbki bloków żywicy

podzielono na ultramikrotomie Ultra Cut E (Reichert Jung, Niemcy). Sekcje ultracienkie (60 – 70 nm) umieszczono na sieciach niklowych powleczonych błoną formatową i zabarwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu (Reynolds, 1963). Ultrastruktura komórek została zbadana w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEM 1010 (JEOL, Japonia), przy napięciu 80 kV.

### 7.2.5. Elektroforeza żelowa

W celu sprawdzenia czy powstają kompleksy pomiędzy dendrymerami i siRNA oraz sprawdzenia zdolności badanych dendrymerów hybrydowych do ochrony siRNA przed degradacją rybonukleolityczną, wykonano elektroforezę w żelu agarozowym. Przeprowadzenie elektroforezy żelowej było możliwe, ponieważ dodatnio naładowane dendrymery blokują migrację ujemnie naładowanego siRNA w polu elektrycznym.

Kompleksy pomiędzy dendrymerami, a znakowanym fluoresceiną siBcl-2 ( $C_{\text{siRNA}} = 1,7 \mu\text{M}$ ) zostały utworzone w różnych stosunkach molowych. Kompleksy inkubowano przez 30 min w ciemności, w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzono elektroforezę w 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik GelRed, przez 35 min, przy napięciu 90 V. Po elektroforezie żel wizualizowano za pomocą światła UV i wykonano cyfrową fotografię zabarwionego żelu.

Dodatnio naładowane dendrymery oddziałując z siRNA blokują jego migrację w polu elektrycznym w kierunku anody. W związku z tym wraz z rosnącym stężeniem dendrymerów ilość nieskompleksowanego siRNA maleje, a więc również intensywność fluorescencji spada. Stąd tworzenie kompleksu stwierdzano na podstawie zmniejszenia intensywności fluorescencji siRNA w stosunku do nieskompleksowanego siRNA wyznakowanego fluoresceiną.

W celu sprawdzenia, czy dendrymery SMT posiadają ochronny wpływ na siRNA przed degradacją, kompleksy dendrymer/siRNA (w stosunku molowym 2:1) oraz samo siRNA, były inkubowane z RNazą A (0,164 mg/ml) przez 45 min, w temp. 37°C. Po inkubacji, w celu uwolnienia siRNA z kompleksu, do próbek dodawano heparynę (0,164 mg/ml) i inkubowano na lodzie przez 5 min. Następnie oceniono, czy siRNA było chronione przez dendrymery przed trawieniem przez RNazę A.

## 7.2.6. Formowanie dendrypleksów i ich transfekcja

Do transfekcji przygotowano kompleksy złożone z pojedynczych siRNA – siBcl-2, siMcl-1, siBcl-xl (końcowe stężenie – 100 nM) i z dendrymerów SMT1 oraz SMT2 w stosunku molowym dendrymer/siRNA wynoszącym 10:1. Stosunek został wyznaczony eksperymentalnie na podstawie wyników otrzymanych z wykorzystaniem metod biofizycznych. Kompleksy wykonano w 10 mM roztworze PBS i inkubowano przez 30 min, w temp. 25°C. W przypadku „cocktail” siRNA, czyli kompleksu mieszaniny wszystkich siRNA ( $\frac{1}{3}$  siBcl-2,  $\frac{1}{3}$  siMcl-1,  $\frac{1}{3}$  siBcl-xl) z każdym z dendrymerów w stosunku molowym 1:10, końcowe stężenie siRNA-cocktail w dołkach było takie samo jak w przypadku pojedynczych siRNA i wynosiło 100 nM. Tak jak uprzednio dendrymery z mieszaniną siRNA („cocktail”) inkubowano przez 30 min, w 25°C. Komórki po wysianiu, inkubowano 30 min w temperaturze 37°C, w warunkach 5% CO<sub>2</sub> i 100% wilgotności względnej. Następnie dodawano dendrypleksy w odpowiedniej objętości do dołków, aby uzyskać ich oczekiwane stężenie końcowe.

## 7.2.7. Hodowla komórkowa

### 7.2.7.1. Komórki adherentne

Obie mysie linie komórek nerwowych użyte do przeprowadzenia eksperymentów były liniami komórek adherentnych. Komórki były hodowane w medium DMEM, z dodatkiem 5% surowicy bydlęcej oraz 1% antybiotykiem (penicylina/streptomycyna), w inkubatorze (temp. 37°C, atmosfera 5% CO<sub>2</sub>, 100% wilgotność względna) (Lazniewska i wsp., 2013a). Hodowla była prowadzona techniką monowarstwy w sterylnych naczyniach hodowlanych do komórek adherentnych (SPL, Korea). Pasaż wykonywany był w warunkach sterylnych przy konfluencji nieprzekraczającej 80% powierzchni butelki hodowlanej.

W pierwszej kolejności medium usuwano, następnie komórki przepłukiwano roztworem PBS. Tak przygotowane komórki poddawano trypsynizacji od 3 do 5 min. W celu neutralizacji działania trypsyny, do butelki hodowlanej dodawano trzykrotną objętość medium (w stosunku do trypsyny) i dokładnie mieszano. Uzyskana w ten sposób jednorodna zawiesina komórek była wykorzystywana do przeprowadzania doświadczeń oraz utrzymania hodowli komórkowej.

### 7.2.7.2. Komórki zawiesinowe

#### Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC)

Krew od zdrowych dawców uzyskano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi. Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) wyizolowano z krwi przy użyciu Histopaque<sup>TM</sup> 1077 (Sigma Chemical Co., USA). Zgodnie z protokołem krew rozcieńczano 2x buforem PBS i nakładano do próbek wirowniczych na warstwę Histopaque<sup>TM</sup> 1077, w proporcji 5:1 (40 ml krwi na 8 ml Histopaque), a następnie wirowano przez 30 minut, przy 2000 rpm. Po wirowaniu, komórki znajdujące się pomiędzy warstwą Histopaque, a osoczem zbierano za pomocą pipety pasterowskiej, dwukrotnie przepłukiwano buforem PBS, a następnie zawieszano w pożywce RPMI-1640 (Gibco) z inaktywowaną termicznie 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i 1% dodatkiem antybiotyków (penicylina/streptomycyna), i przechowywano w butelkach hodowlanych do komórek zawiesinowych, w inkubatorze (temp. 37°C, atmosfera 5% CO<sub>2</sub>, 100% wilgotność względna).

#### Linia komórek ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej (HL-60)

Do przeprowadzenia części eksperymentów wykorzystano linię komórek nowotworowych – HL-60, czyli zawiesinową linię komórek ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej. Hodowlę prowadzono w butelkach hodowlanych do komórek zawiesinowych, z użyciem medium RPMI-1640, z dodatkiem inaktywowanej termicznie 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i 1% antybiotyków (penicylina/streptomycyna). Komórki w butelkach hodowlanych przechowywano w inkubatorze (temp. 37°C, atmosfera 5% CO<sub>2</sub>, 100% wilgotność względna). Hodowlę utrzymywano poprzez dodanie świeżego medium lub jego wymianę, co 2 – 3 dni. Gęstość komórek w zawiesinie utrzymywano na poziomie nieprzekraczającym 1 x 10<sup>6</sup> kom./ml.

## 7.2.8. Oznaczenie właściwości cytotoksycznych dendrymerów

### 7.2.8.1. Test MTT

Oznaczenie cytotoksyczności, w przypadku komórek adherentnych, wykonane zostało poprzez kolorymetryczne oznaczenie formazanu rozpuszczonego w DMSO. Żywe komórki, w wyniku działania dehydrogenaz mitochondrialnych, są zdolne do redukcji żółtego, rozpuszczalnego w wodzie MTT do nierozpuszczalnych, purpurowych kryształów formazanu. Ich ilość jest proporcjonalna do liczby żywych komórek, z uwagi na to, że w martwych komórkach dehydrogenazy są nieaktywne (Mosmann, 1983 w modyfikacji Lazniewska i wsp., 2013a). W przypadku obu linii mysich, N2a oraz mHippoE-18, komórki wysiewano w gęstości  $1,5 \times 10^5$  kom./ml w objętości 100  $\mu$ l na dołek na transparentną płytkę 96-dołkową. Komórki, ze względu na fakt, iż są one adherentne, przed dodaniem badanych związków, pozostawiano na 24 godz. w inkubatorze. Do tak przygotowanych komórek dodawano badane związki i inkubowano przez określony czas (temp. 37°C, atmosfera 5% CO<sub>2</sub>, 100% wilgotność względna). Po inkubacji, medium z dodatkiem związków odpłukiwano, warstwę komórek dwukrotnie przepłukiwano buforem PBS, a następnie dodawano po 50  $\mu$ l/dołek roztworu MTT w stężeniu końcowym 0,5 mg/ml. Po 3 godz. inkubacji w warunkach hodowlanych, usuwano MTT i dodawano DMSO w objętości 100  $\mu$ l na dołek. Absorbancję mierzono na spektrofotometrycznym czytniku płytek BIOTEK PowerWave HT, przy długości fali  $\lambda = 570$  nm. Żywotność komórek obliczano w stosunku do nietraktowanej związkami kontroli, której żywotność przyjęto arbitralnie jako 100%.

### 7.2.8.2. Test Alamar Blue

Test Alamar Blue jest testem metabolicznym pozwalającym na ocenę żywotności komórek. Test oparty jest na niefluoryzującym błękitnym barwniku – resazuryinie. Barwnik ten jest zdolny do przenikania do komórki, gdzie w odpowiedzi na aktywność reduktaz obecnych w komórce ulega on przemianie w różowy, fluoryzujący barwnik – resorufinę. Dlatego też, taki proces może zachodzić tylko w żywych komórkach (Ansar Ahmed i wsp., 1994; Goegan i wsp., 1995 w modyfikacji Ionov i wsp., 2015).

W pracy zastosowano test Alamar Blue do oceny żywotności komórek zawiesinowych. Komórki wysiewano w gęstości  $1 \times 10^4$  kom./dołek na czarne płytki 96-dołkowe, w objętości 100  $\mu$ l. Ze względu na fakt, iż były to komórki zawiesinowe, do wysiewania użyto medium RPMI z dodatkiem 10% FBS i 1% antybiotyków (penicylina/streptomycyny). Przed dodaniem związków komórki były inkubowane przez 30 min, w temp. 37°C. Następnie przeprowadzono inkubację z badanymi związkami, po czym dodawano po 20  $\mu$ l odczynnika Alamar Blue, w stężeniu końcowym 12,5  $\mu$ g/ml. Po 2 godz. inkubacji w temperaturze 37°C, mierzono poziom fluorescencji, przy użyciu czytnika BIOTEK PowerWave HT, przy długościach fal:  $\lambda_{wzb.} = 530$  nm,  $\lambda_{em.} = 590$  nm. Żywotność komórek obliczano w stosunku do nietraktowanej związkami kontroli, której żywotność przyjęto arbitralnie jako 100%.

#### **7.2.9. Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu z użyciem sondy H<sub>2</sub>DCFDA**

Do pomiaru zmian poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach wykorzystano sondę fluorescencyjną H<sub>2</sub>DCFDA (dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny). H<sub>2</sub>DCFDA po deacetylacji do DCFH<sub>2</sub> (2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny) jest utleniany wewnątrzkomórkowo do emitującej fluorescencję 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF). Wartość fluorescencji wzrasta liniowo wraz ze wzrostem ilości reaktywnych form tlenu w komórce (Lebel i wsp., 1992 w modyfikacji Lazniewska i wsp., 2013b).

Komórki wysiewano w gęstości  $1,5 \times 10^4$  kom./dołek na czarne płytki 96-dołkowe w objętości 100  $\mu$ l. Komórki adherentne wysiewano 24 godz. przed dodaniem związków. Do wysiewania używano medium DMEM z dodatkiem 5% FBS i 1% antybiotyków (penicylina/streptomycyny). Po inkubacji, medium z dodatkiem związków odpłukiwano, komórki dwukrotnie płukano roztworem PBS, a następnie dodawano po 50  $\mu$ l sondy H<sub>2</sub>DCFDA o stężeniu końcowym 2  $\mu$ M. Inkubowano przez 15 min, w temperaturze 37°C i przemywano komórki PBS. Bezpośrednio przed pomiarem do każdego z dołków dodawano 100  $\mu$ l PBS. Pomiar wykonywano przy użyciu czytnika płytek BIOTEK PowerWave HT przy długościach fal:  $\lambda_{wzb.} = 485$  nm,  $\lambda_{em.} = 530$  nm.



Poziom RFT w komórkach obliczano w stosunku do nietraktowanej związkami kontroli, której poziom przyjęto jako 100%. Dodatkowo zmiany w poziomie reaktywnych form tlenu oceniano przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Zdjęcia komórek wybarwionych sondą fluorescencyjną H<sub>2</sub>DCFDA zostały wykonane przy użyciu mikroskopu Leica TCS SP8, przy długościach fal:  $\lambda_{wzb.} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em.} = 530 \text{ nm}$ .

#### 7.2.10. Oznaczenie zmian błonowego potencjału mitochondrialnego z użyciem sondy JC-1

W celu oznaczenia zmian błonowego potencjału mitochondrialnego w komórkach, wykorzystano sondę JC-1, czyli jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny. Jest to lipofilowy, kationowy znacznik fluorescencyjny, którego miejscem docelowym w komórce jest matrix mitochondrialna. Występuje on w niej w dwóch formach: monomerycznej oraz dimerycznej. Należy zaznaczyć, że w przypadku spolaryzowanej błony mitochondrialnej oraz wysokiego potencjału  $\Delta\Psi_m$ , znacznik występuje w formie dimerów i emituje fluorescencję pomarańczową. W przypadku, gdy dochodzi do spadku potencjału mitochondrialnego, JC-1 z formy dimerycznej przechodzi w formę monomeryczną, która natomiast emituje fluorescencję zieloną (Cossarizza i wsp., 1993 w modyfikacji Lazniewska i wsp., 2013a).

Komórki wysiewano w gęstości  $1,5 \times 10^4$  kom./dołek na czarne płytki 96-dołkowe, w objętości 100  $\mu\text{l}$ . Komórki adherentne wysiewano 24 godz. przed dodaniem dendrymerów. Do wysiewania użyto medium DMEM z dodatkiem 5% FBS i 1% antybiotyków (penicylina/streptomycyny). Po inkubacji, medium z dodatkiem dendrymerów odpłukiwano, komórki dwukrotnie płukano roztworem PBS, a następnie dodawano po 50  $\mu\text{l}$  sondy JC-1 o stężeniu końcowym 5  $\mu\text{M}$ . Inkubowano przez 20 min, temperaturze 37°C i przemywano komórki PBS. Bezpośrednio przed pomiarem do każdego z dołków dodawano 100  $\mu\text{l}$  PBS. Pomiar wykonywano przy użyciu czytnika płytek BIOTEK PowerWave HT, przy długościach fal: dla dimerów  $\lambda_{wzb.} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em.} = 590 \text{ nm}$ , dla monomerów  $\lambda_{wzb.} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em.} = 530 \text{ nm}$ .

Otrzymane wyniki posłużyły do obliczenia współczynnika fluorescencji:

$$\Psi_m \sim \frac{Fd}{Fm}$$

gdzie:  $\Psi_m$  – potencjał mitochondrialny wprost proporcjonalny do współczynnika fluorescencji,  $Fd$  – fluorescencja dimerów,  $Fm$  – fluorescencja monomerów.

Zmiany potencjału mitochondrialnego w komórkach obliczano w stosunku do nietraktowanej związkami kontroli, dla której  $\Psi_m$  przyjęto jako 100%.

### 7.2.11. Ocena morfologii komórek

Morfologię komórek po dodaniu dendrymerów SMT oceniono przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Komórki w gęstości  $2,5 \times 10^5$  komórek/ml wysiewano i inkubowano w medium hodowlanym, w temp.  $37^\circ\text{C}$ , w wilgotnej atmosferze zawierającej 5%  $\text{CO}_2$ , 95% powietrza. Po inkubacji, komórki dwukrotnie delikatnie przemywano 0,1 M roztworem PBS (pH = 7,4) i utrwalano w 3% formaldehydzie, przez dwie godziny. Następnie komórki dwukrotnie przemywano PBS i wybarwiano DAPI (Sigma-Aldrich), przez 5 min. W celu wizualizacji aktyny, po ponownym przemyciu PBS, komórki barwiono falloidyną Texas Red-X. Zdjęcia zostały wykonane za pomocą mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 (Leica-Microsystems). Do wzbudzenia DAPI stosowano laser emitujący światło o długość fali  $\lambda = 405$  nm, natomiast do wzbudzenia falloidyny laser WLL o długości fali  $\lambda = 565$  nm. Detekcji dokonano dla DAPI w zakresie długości fali 450 – 490 nm, a dla falloidyny w zakresie długości fali 600 – 615 nm. Do analizy danych wykorzystano oprogramowanie Leica.

### 7.2.12. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych

#### 7.2.12.1. Podwójne barwienie oranż akrydyny/bromek etydyny (AO/EB)

Do wykonania podwójnego barwienia użyto dwóch barwników interkalujących pomiędzy nici DNA, tj. oranż akrydyny (AO) oraz bromek etydyny (EB). Wykorzystanie tych barwników pozwoliło na określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Różnica pomiędzy fluorochromami polega na tym, że AO barwi zarówno żywe jak i martwe komórki – emitując zieloną fluorescencję ze wzbudzeniem przy  $\lambda = 502$  nm

i maksimum emisji przy  $\lambda = 525$  nm, natomiast EB wybarwia tylko komórki martwe – emitując czerwoną fluorescencję ze wzbudzeniem przy  $\lambda = 405$  nm i emisją maksimum przy  $\lambda = 595$  nm.

Badane związki po inkubacji z komórkami odpłukiwano, warstwę komórek przepłukiwano PBS, a następnie barwiono mieszaniną barwników w PBS w stężeniu końcowym 2  $\mu\text{g/ml}$ . Po dwuminutowej inkubacji, roztwór barwników usuwano, a komórki zalewano PBS, w objętości 0,5 ml. Zabarwione komórki były obserwowane przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8. Analizowano, co najmniej 250 komórek dla każdej próbki (50 komórek z 5 pól widzenia).

W mikroskopie konfokalnym obserwowano następujące frakcje komórek: żywe, które są morfologicznie prawidłowe z zielonym jądrem; wczesnoapoptotyczne mające zielone jądro ze skondensowaną lub pofragmentowaną chromatyną, późnoapoptotyczne, charakteryzujące się skondensowaną lub pofragmentowaną czerwoną chromatyną oraz nekrotyczne, z czerwonym jądrem (Duke i Cohen, 1992 w modyfikacji Lazniewska i wsp., 2013a).

#### **7.2.12.2. Podwójne barwienie aneksyna V/jodek propidyny (PI)**

W celu określenia frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych przeprowadzono barwienie aneksyną-V/jodkiem propidyny. Aneksyna-V (Ann-V) jest zależnym od jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) białkiem wiążącym fosfolipidy z wysokim powinowactwem do fosfatydyloseryny (PS), która w komórkach apoptotycznych jest przenoszona z wewnętrznej na zewnętrzną warstwę błony plazmatycznej. W ten sposób PS wystawiona na działanie czynników zewnątrzkomórkowych może być związana przez aneksynę-V. Zielona fluorescencja pochodzi od fluoresceiny związanej kowalencyjnie z Ann-V. Jodek propidyny (PI) (czerwona fluorescencja) jest usuwany przez żywe komórki z nienaruszonymi błonami, podczas gdy błony nekrotycznych i uszkodzonych komórek są przepuszczalne dla PI. W związku z tym oddzielne frakcje komórek zidentyfikowano w następujący sposób: żywe komórki – Ann-V i PI negatywne; komórki nekrotyczne - Ann-V negatywne i PI pozytywne; komórki apoptotyczne – Ann-V i PI - pozytywne oraz Ann-V pozytywne i PI - negatywne. Próbkę przygotowano zgodnie z procedurą dla zestawu

do wykrywania apoptozy FITC-aneksyna-I (BD Pharmingen™). Dane zliczono dla łącznej liczby 10 000 zdarzeń na próbkę. Kontrola kompensacji – w przypadku aneksyny komórki inkubowano z kamptotecyną (80  $\mu$ M) przez 4 godz. (dodatnia zielona fluorescencja), w przypadku jodku propidyny komórki inkubowano z dodatkiem 75% zmrożonego etanolu (dodatnia czerwona fluorescencja). Próbkę analizowano za pomocą cytometru przepływowego (LSRII, Becton Dickinson). Fluorescencję mierzono stosując standardowe filtry emisji: zielony – FL1 ( $\lambda = 490 \pm 20$  nm) i czerwony – FL3 ( $\lambda = 530 - 630$  nm).

### 7.2.13. Ocena morfologiczna oraz wizualizacja wyznakowanych fluoresceiną dendrypleksów w komórkach zawieszonych

Morfologię i internalizację kompleksów, po 3 i 24 godzinnej inkubacji z dendrymerami lub dendrypleksami ( $C_{SMT} = 1 \mu$ M,  $C_{siRNA} = 100$  nM), w komórkach HL-60 oceniono przy użyciu mikroskopii konfokalnej.

Komórki wysiewano w gęstości  $1,5 \times 10^5$  kom./ml i inkubowano przez 30 min w medium RPMI-1640, w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Po 30 min inkubacji do komórek dodawano dendrypleksy w badanych stężeniach. Aby usunąć kompleksy związane z powierzchnią komórek, dodawano 50  $\mu$ l 50 mM roztworu glicyny (pH 3,2) i inkubowano przez 20 sekund. Działanie glicyny dezaktywowano poprzez dodanie do komórek 500  $\mu$ l PBS (pH = 7,4) (Kameyama i wsp., 2007). Komórki odwirowywano, przemywano dwukrotnie 0,1 M roztworem PBS o pH 7,4 i utrwalono w 3% formaldehydzie, przez dwie godziny. Następnie komórki wybarwiono DAPI (2 mg/ml) przez 5 min. Po ponownym przemyciu PBS w celu wizualizacji aktyny, komórki barwiono falloidyną (200 jednostek/ml). Zdjęcia zostały wykonane za pomocą mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8. Do wzbudzenia DAPI stosowano laser emitujący światło o długości fali  $\lambda = 405$  nm, natomiast do wzbudzenia falloidyny laser WLL o długości fali  $\lambda = 565$  nm. Detekcji dokonano dla DAPI w zakresie długości fali  $\lambda = 450 - 490$  nm, a dla falloidyny w zakresie długości fali  $\lambda = 600 - 615$  nm. Do analizy danych wykorzystano oprogramowanie Leica.

#### 7.2.14. Ilościowa ocena stopnia wnikania dendrypleksów wyznakowanych fluoresceiną do komórek

Metodą cytometryczną określono liczbę komórek, w których doszło do internalizacji przynajmniej jednej cząsteczki fluorescencyjnego siRNA. W celu oceny internalizacji dendrypleksów do komórek nowotworowych (HL-60), komórki wysiano na 24-dołkowych płytkach w gęstości  $10 \times 10^5$  komórek/dołek w 0,5 ml medium RPMI 1640. Kontrola obejmowała komórki nietraktowane (zamiast dendrymerów/dendrypleksów dodano PBS). Próbki inkubowano przez 3 i 24 godz. ze związkami, w warunkach hodowlanych. Aby usunąć kompleksy związane z powierzchnią komórek, dodawano 50  $\mu$ l 50 mM roztworu glicyny (pH = 3,2) i inkubowano przez 20 sekund. Aby dezaktywować glicynę, do komórek dodano 500  $\mu$ l roztworu PBS (pH = 7,4) (Kameyama i wsp., 2007). Następnie komórki odwirowano, zawieszono w 500  $\mu$ l PBS w probówkach cytometrycznych i umieszczono na lodzie w ciemności, aż do momentu pomiaru. Intensywność fluorescencji próbek, pochodzącą od siRNA wyznakowanego fluoresceiną, mierzono za pomocą cytometru przepływowego LSRII Becton Dickinson, przy długości fali wzbudzenia  $\lambda = 488$  nm i emisji  $\lambda = 530 \pm 30$  nm.

#### 7.2.15. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, do której wykorzystano oprogramowanie SigmaPlot 12.0. Wyniki badań uzyskano w przynajmniej trzech niezależnych eksperymentach. Każdy z eksperymentów składał się z co najmniej trzech powtórzeń. Wyniki przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  odchylenie standardowe (SD).

Dzięki oprogramowaniu SigmaPlot 12.0 wyznaczono również stężenie cytotoksyczne 50% czyli CC50.

Do oceny istotności statystycznej uzyskanych wyników zastosowano analizę wariancji jednoczynnikowej ANOVA oraz test post-hoc Tukeya dla porównań wielokrotnych programu SigmaPlot 12.0 firmy Systat Software Inc, USA.

We wszystkich przypadkach przyjęto poziom istotności  $\alpha = 0,05$  lub mniejszy.

## 8. Wyniki

### 8.1. Oddziaływania dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z wybranymi białkami enzymatycznymi

Do określenia oddziaływań pomiędzy dendrymerami hybrydowymi dwóch generacji, a białkami, wybrano trzy różne białka enzymatyczne: fosfatazę alkaliczną (AP) z *E. coli*, dehydrogenazę L-mleczanową (LDH) z mięśni królika i ludzką aminotransferazę asparaginianową (AST).

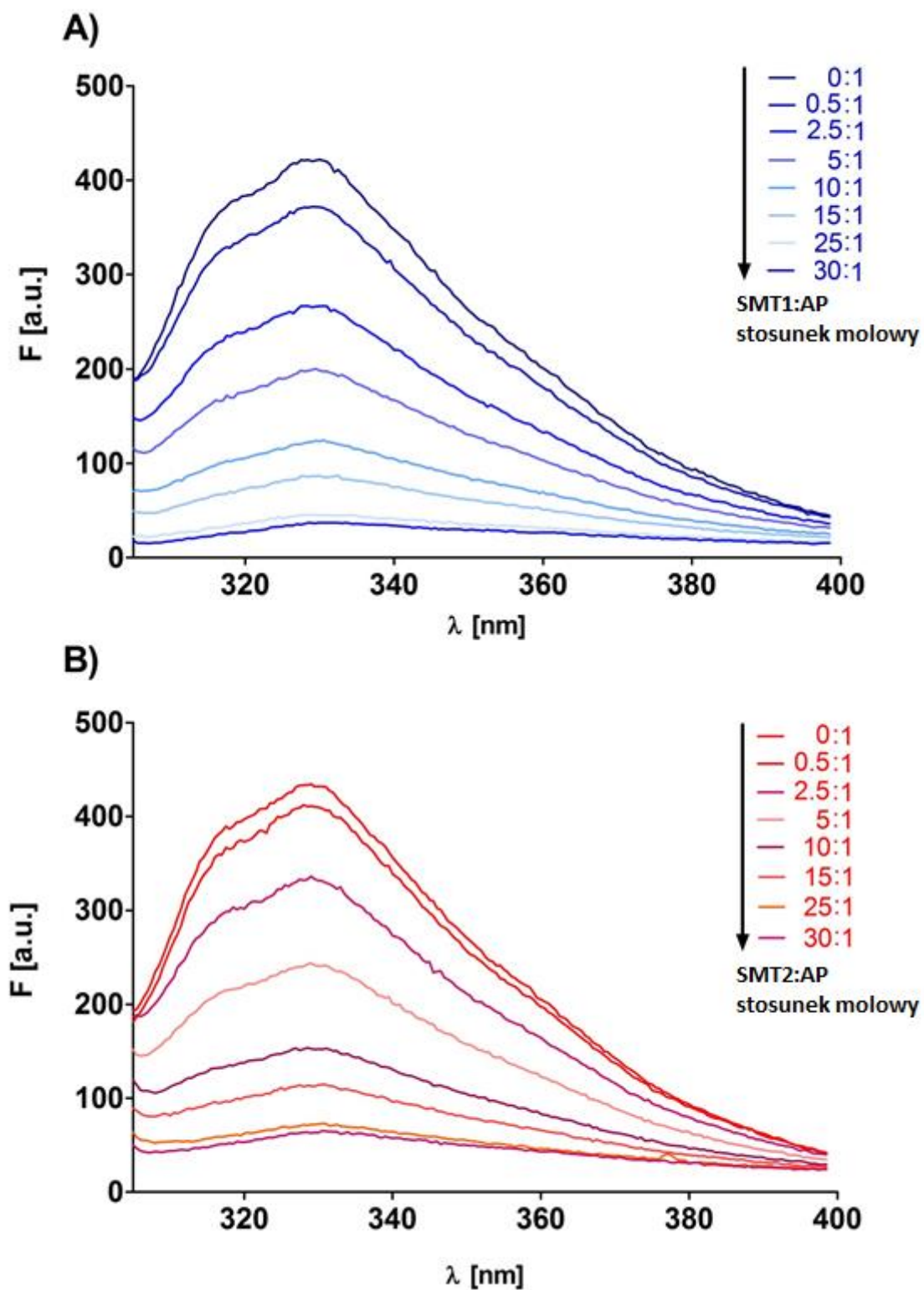
Białka te zostały wybrane ze względu na fakt, iż są one katalizatorami dla szeregu reakcji metabolicznych oraz uczestniczą w wielu procesach biologicznych, których przebieg jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Ponadto, enzymy te posiadają odmienny stopień sztywności struktury, a także ich miejsca aktywne znajdują się w różnych pozycjach (Tabela 2).

Tabela 2. Charakterystyka fosfatazy alkalicznej (AP), dehydrogenazy L-mleczanowej (LDH) oraz aminotransferazy asparaginianowej (AST) (Shcharbin i wsp., 2015; [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

Białko	AP	LDH	AST
Typ	dimer	tetramer	dimer
Lokalizacja centrum aktywnego	ukryte	ukryte	na powierzchni
Sztywność struktury przestrzennej	sztywna	elastyczna	elastyczna
Masa cząsteczkowa [kDa]	89	149	94
Liczba reszt tryptofanowych	5	6	6
Ładunek powierzchniowy	-18	-5	-16

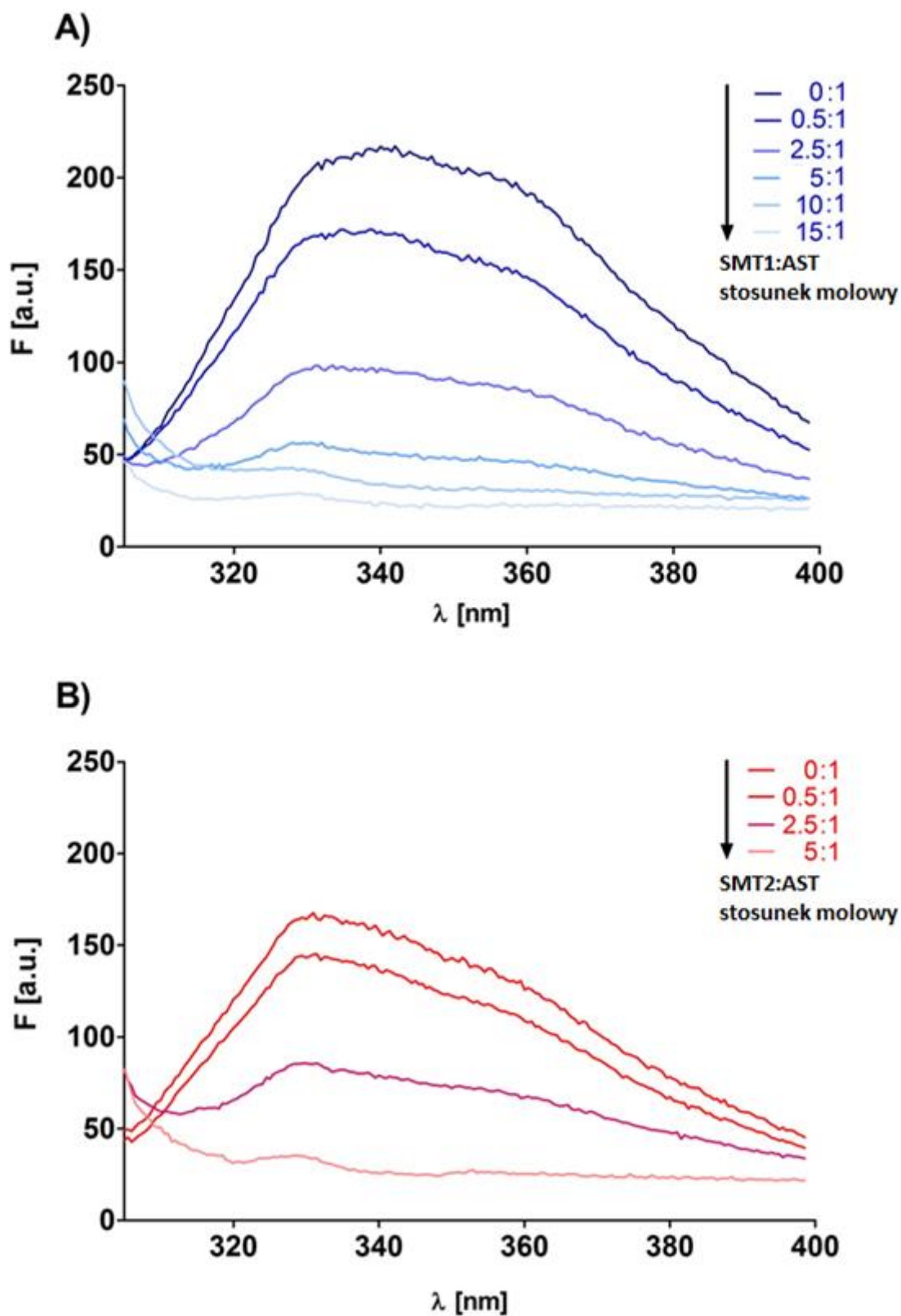
### 8.1.1. Gaszenie fluorescencji reszt tryptofanu (Trp) w badanych białkach

Pomiary gaszenia fluorescencji reszt tryptofanu metodą spektrofluorymetryczną dają możliwość uzyskania informacji na temat oddziaływania wybranego ligandu z białkiem. Stąd, pomiar fluorescencji reszt tryptofanu wybranych białek, pod wpływem dendrymerów, był pierwszą metodą służącą do określenia oddziaływań dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z białkami. Pomiar fluorescencji tryptofanu dla wybranych białek, w obecności dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych, nie wykazał istotnych różnic pomiędzy generacjami dendrymeru. Zarówno dendrymery generacji pierwszej (SMT1) jak i generacji drugiej (SMT2), znacząco gasiły fluorescencję wszystkich trzech białek. Jednakże, wpływ dendrymerów różnił się w zależności od białka. Gaszenie fluorescencji zachodziło w sposób zależny od stężenia we wszystkich przypadkach, chociaż efekt wywołany przez dendrymery SMT był najmniejszy w stosunku do fosfatazy alkalicznej (Ryc. 11). Natomiast silne gaszenie fluorescencji tryptofanu następowało w przypadku zarówno AST (Ryc. 12) jak i LDH (Ryc. 13).

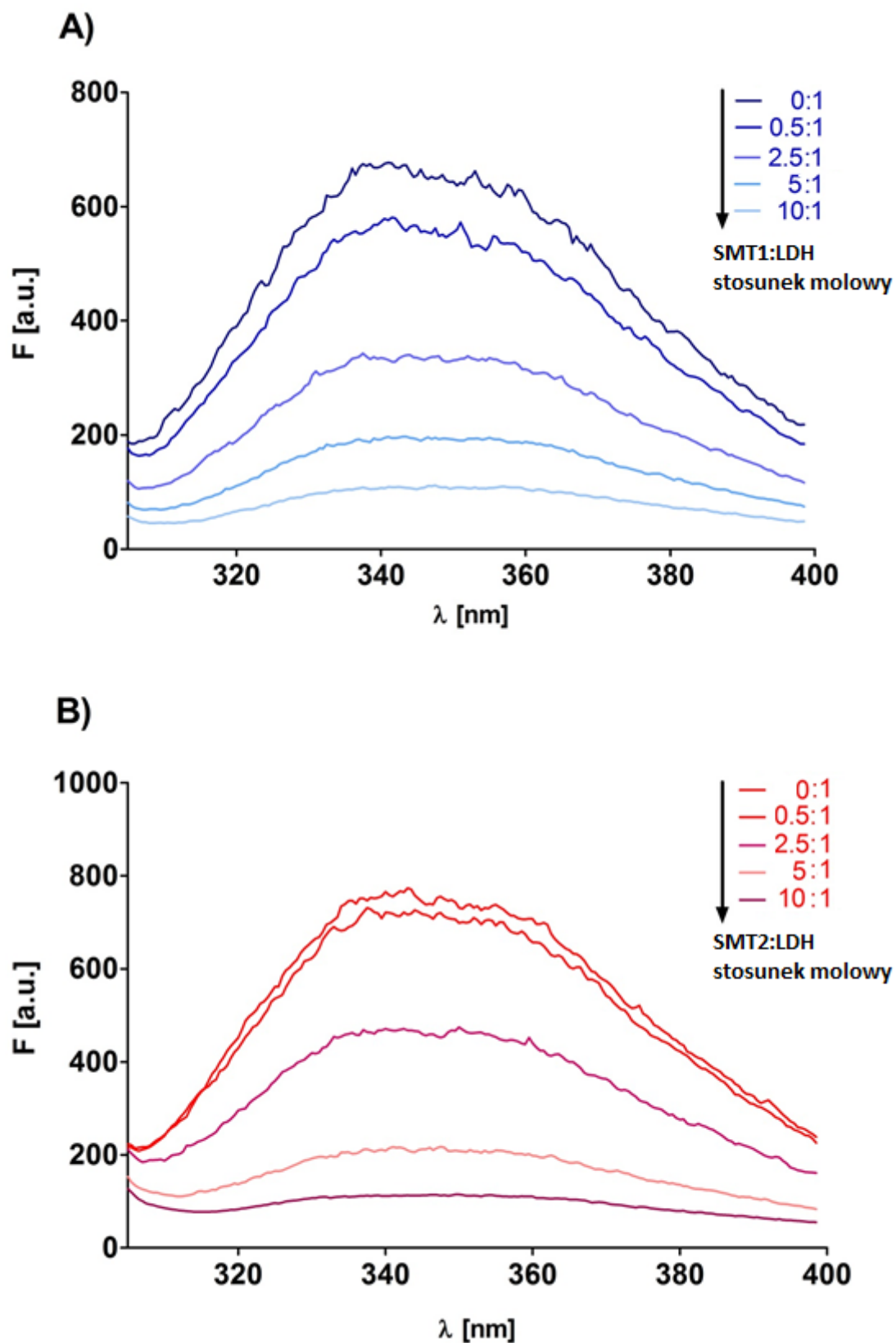


Ryc. 11. Widma fluorescencji fosfatazy alkalicznej ( $C = 1 \mu\text{M}$ ) w obecności dendrymerów SMT1 (A) oraz SMT2 (B).  $n \geq 3$ .



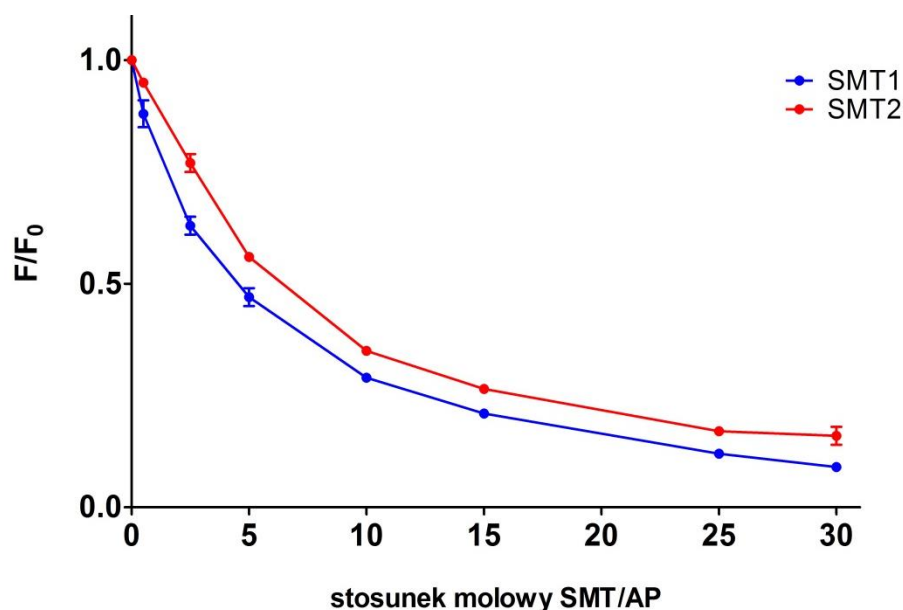


Ryc. 12. Widma fluorescencji aminotransferazy asparaginianowej ( $C = 1 \mu\text{M}$ ) w obecności dendrymerów SMT1 (A) oraz SMT2 (B).  $n \geq 3$ .

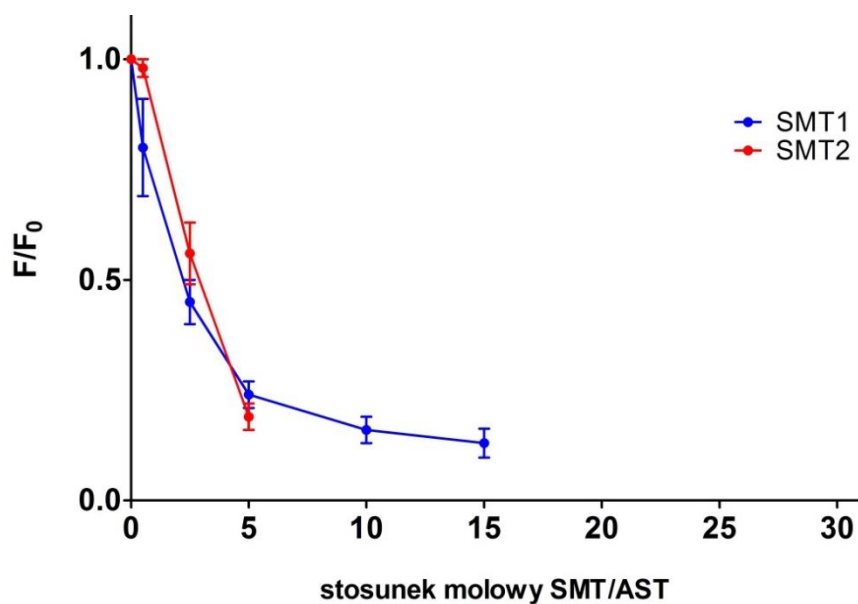


Ryc. 13. Widma fluorescencji dehydrogenazy L-mleczanowej ( $C = 1 \mu\text{M}$ ) w obecności dendrymerów SMT1 (A) oraz SMT2 (B).  $n \geq 3$ .

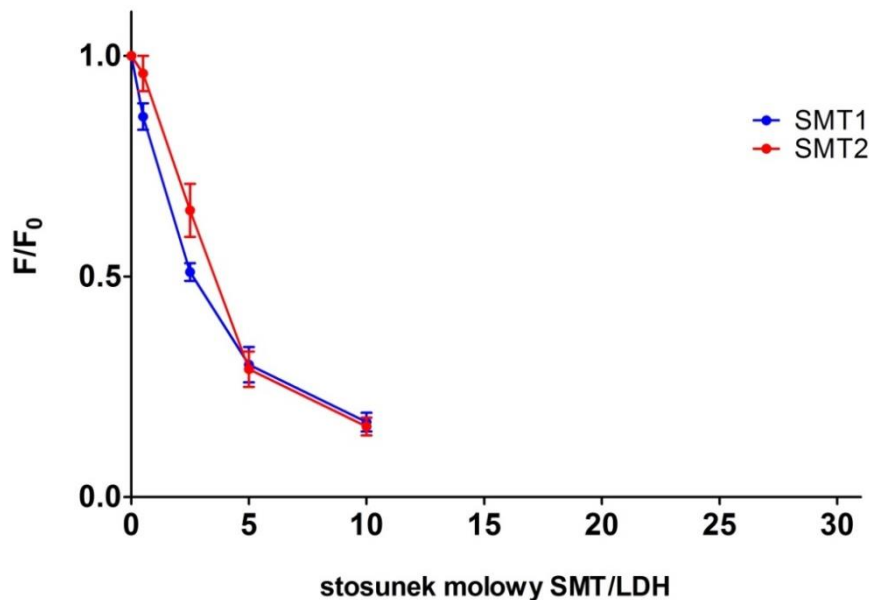
W celu porównania efektywności dendrymerów SMT w wygaszaniu fluorescencji białek, jako wskaźnik przyjęto poziom 20% wartości początkowej fluorescencji dla danego białka. Zarówno dla dendrymerów generacji pierwszej jak i drugiej, w przypadku fosfatazy alkalicznej spadek fluorescencji tryptofanu do przyjętego poziomu następował przy stosunku molowym 25:1 (SMT:AP) (Ryc. 14). Dla pozostałych dwóch białek gaszenie fluorescencji do przyjętego poziomu następowało w niższych stosunkach molowych. Dla aminotransferazy asparaginianowej, w przypadku dendrymeru SMT1, stosunek ten wynosił 10:1 (SMT1:AST). Natomiast dendrymer generacji drugiej gasił fluorescencję reszt tryptofanowych w AST w stosunku 5:1 (STM2:AST) (Ryc. 15). Fluorescencja ostatniego z enzymów, czyli dehydrogenazy L-mleczanowej, również ulegała gaszeniu pod wpływem dendrymerów SMT, w sposób zbliżony do oddziaływań zachodzących pomiędzy SMT i AST. Dendrymery obu generacji gasiły fluorescencję LDH w stosunku 10:1 (Ryc. 16).



Ryc. 14. Zależność poziomu fluorescencji  $F/F_0$  od stosunku molowego SMT/AP, gdzie:  $F$  – intensywność fluorescencji AP w obecności dendrymerów SMT;  $F_0$  – intensywność fluorescencji AP bez dendrymerów. Wartości  $F$  i  $F_0$  odczytano dla długości fali odpowiadającej maksimum fluorescencji AP ( $\lambda_{\max}$ ).  $C_{\text{białka}} = 1 \mu\text{M}$ . Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n \geq 3$ .



Ryc. 15. Zależność poziomu fluorescencji  $F/F_0$  od stosunku molowego SMT/AST, gdzie:  $F$  – intensywność fluorescencji AST w obecności dendrymerów SMT;  $F_0$  – intensywność fluorescencji AST bez dendrymerów. Wartości  $F$  i  $F_0$  odczytano dla długości fali odpowiadającej maksimum fluorescencji AST ( $\lambda_{\max}$ ).  $C_{\text{białka}} = 1 \mu\text{M}$ . Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n \geq 3$ .



Ryc. 16. Zależność poziomu fluorescencji  $F/F_0$  od stosunku molowego SMT/LDH, gdzie:  $F$  – intensywność fluorescencji LDH w obecności dendrymerów SMT;  $F_0$  – intensywność fluorescencji LDH bez dendrymerów. Wartości  $F$  i  $F_0$  odczytano dla długości fali odpowiadającej maksimum fluorescencji LDH ( $\lambda_{\max}$ ).  $C_{\text{białka}} = 1 \mu\text{M}$ . Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n \geq 3$ .

### 8.1.2. Potencjał zeta

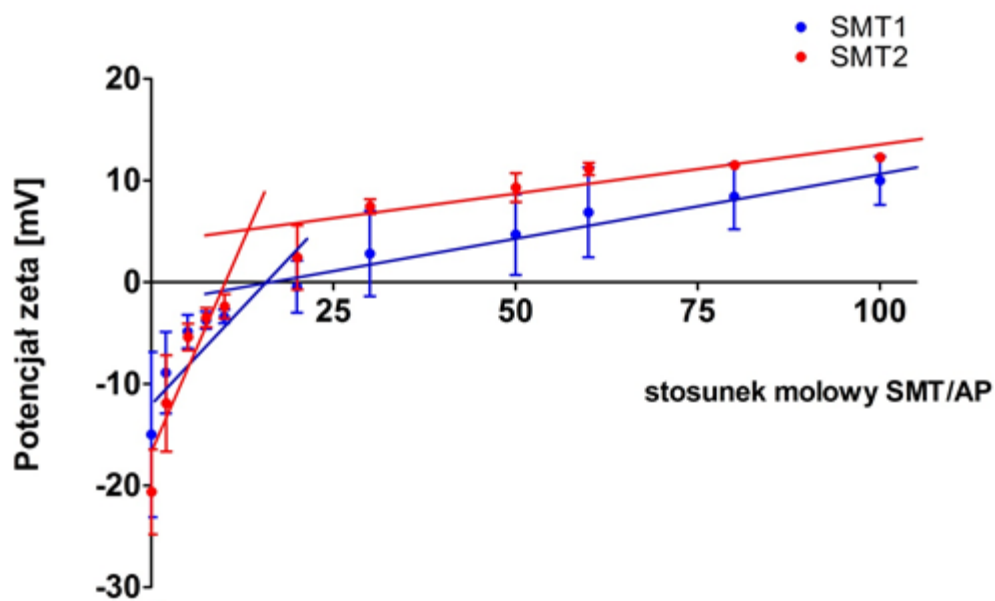
Pomiar potencjału zeta wykorzystano w celu oceny zmian ładunku powierzchniowego kompleksów oraz interakcji zachodzących pomiędzy dendrymerami a białkiem. Wyznaczenie potencjału zeta cząsteczek było możliwe dzięki zastosowaniu metody analizy fazy rozproszenia światła PALS (phase analysis light scattering) wynikającej z pomiarów elektroforetycznych oraz laserowego pomiaru prędkości metodą Dopplera (LDV). Stężenie białek stosowanych w badaniu było utrzymywane na stałym poziomie  $0,5 \mu\text{M}$ , podczas gdy dendrymery SMT1 i SMT2 dodawano w rosnących stężeniach, w zakresie od 0 do  $50 \mu\text{M}$ .

Oba dendrymery wpływały na potencjał zeta wybranych trzech enzymów. Każde białko badane przed dodaniem dendrymeru miało ujemne wartości potencjału zeta (AST: - 12 mV, AP: - 17 mV, LDH: - 5 mV). Dendrymery zmieniały początkowe wartości potencjału zeta białek, z ujemnych na dodatnie aż do osiągnięcia plateau, co pozwoliło wyznaczyć maksymalną liczbę cząsteczek dendrymeru przyłączonych do jednej cząsteczki białka. W przypadku dendrymerów obu generacji plateau zostało osiągnięte poniżej +15 mV. Zmiany potencjału zeta wybranych białek w obecności dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych zostały przedstawione na Rycinach 17 (SMT:AP), 18 (SMT:AST), 19 (SMT:LDH).

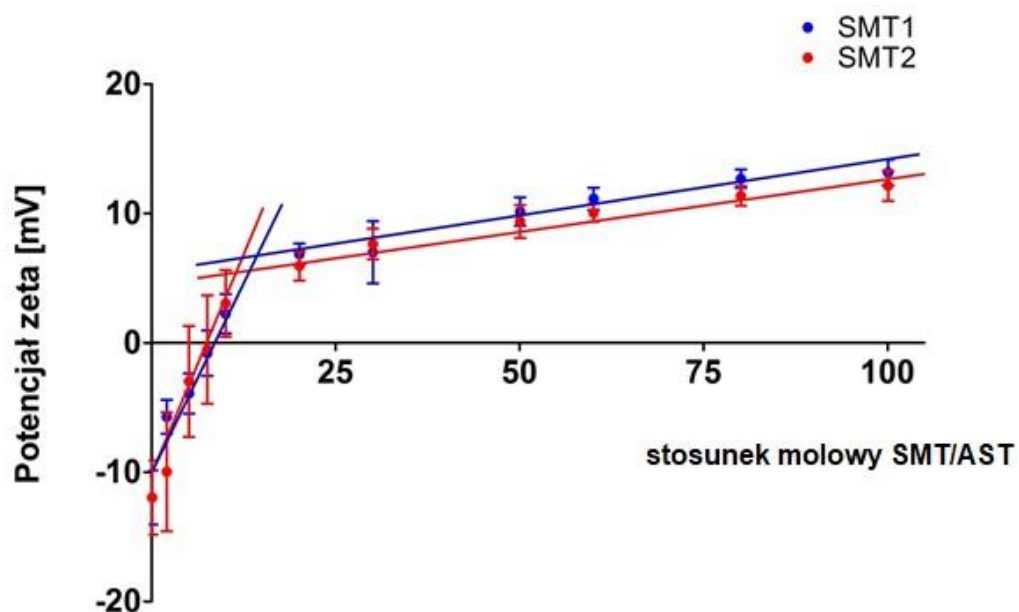
Analiza potencjału zeta w funkcji stosunku molowego dendrymer/białko pozwoliła określić ile cząsteczek dendrymeru może się związać z białkiem. Liczbę cząsteczek dendrymerów przypadających na cząsteczkę każdego z enzymów przedstawiono w tabeli 3. Liczba cząsteczek dendrymeru generacji pierwszej przypadająca na jedną cząsteczkę AP i LDH była na takim samym poziomie i wynosiła 11. W przypadku AST wynosiła ona 14. Dla dendrymerów SMT2 wyniki różniły się nieznacznie. 12 cząsteczek dendrymeru SMT2 przypadało na jedną cząsteczkę zarówno AST jak i AP. Natomiast w przypadku LDH, dendrymery SMT2 wiązały się w stosunku 8:1.

Tabela 3. Liczba dendrymerów związanych z jedną cząsteczką białka, obliczona na podstawie pomiaru potencjału zeta.

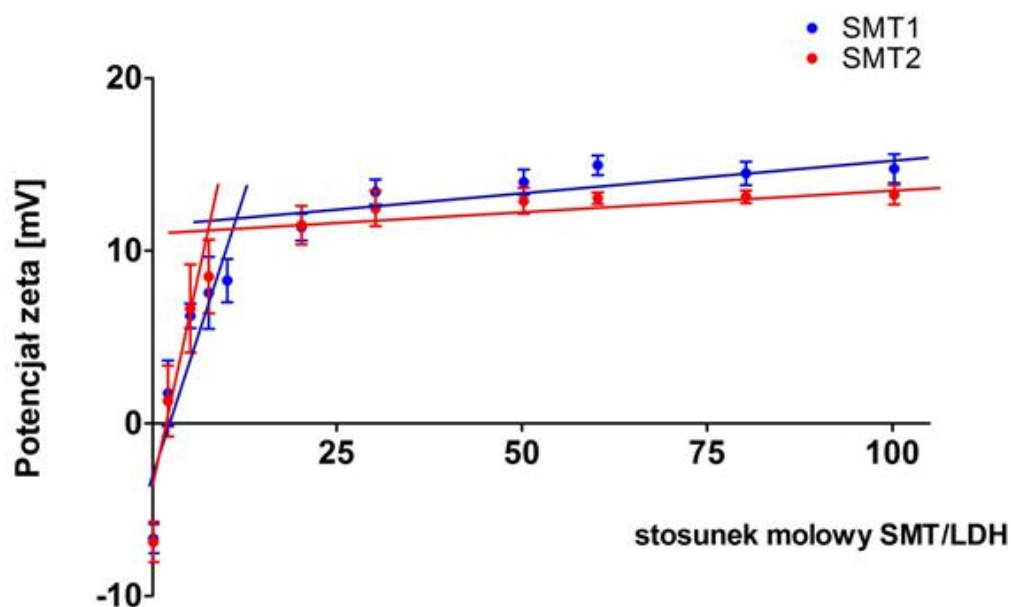
	SMT1	SMT2
AST	14	12
AP	11	12
LDH	11	8



Ryc. 17. Zmiany potencjału zeta fosfatazy alkalicznej ( $C = 0,5 \mu\text{M}$ ) pod wpływem dendrymerów SMT1 i SMT2. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n \geq 3$ .



Ryc. 18. Zmiany potencjału zeta aminotransferazy asparaginianowej ( $C = 0,5 \mu\text{M}$ ) pod wpływem dendrymerów SMT1 i SMT2. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n \geq 3$ .

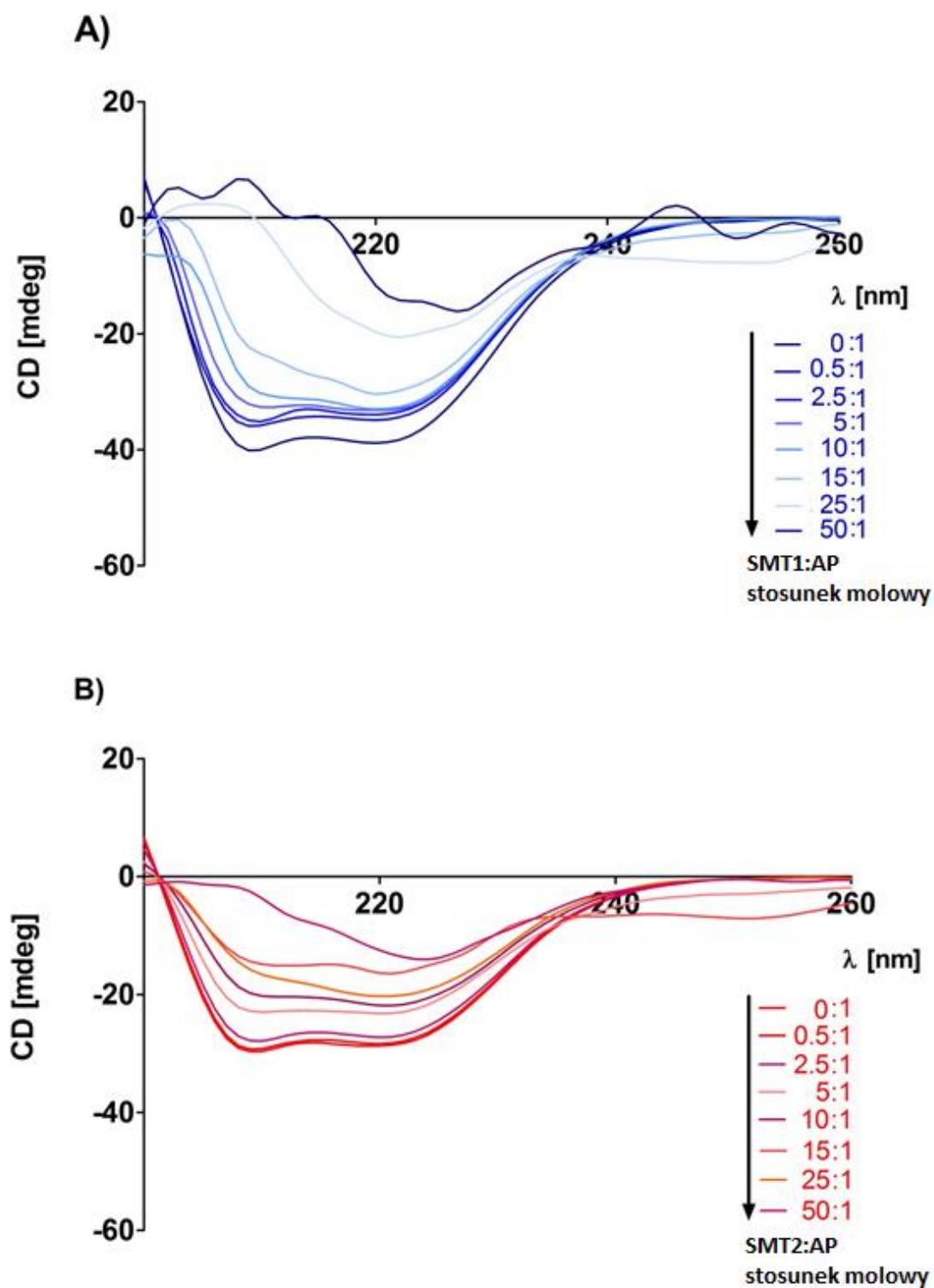


Ryc. 19. Zmiany potencjału zeta dehydrogenazy L-mleczanowej ( $C = 0,5 \mu\text{M}$ ) pod wpływem dendrymerów SMT1 i SMT2. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n \geq 3$ .

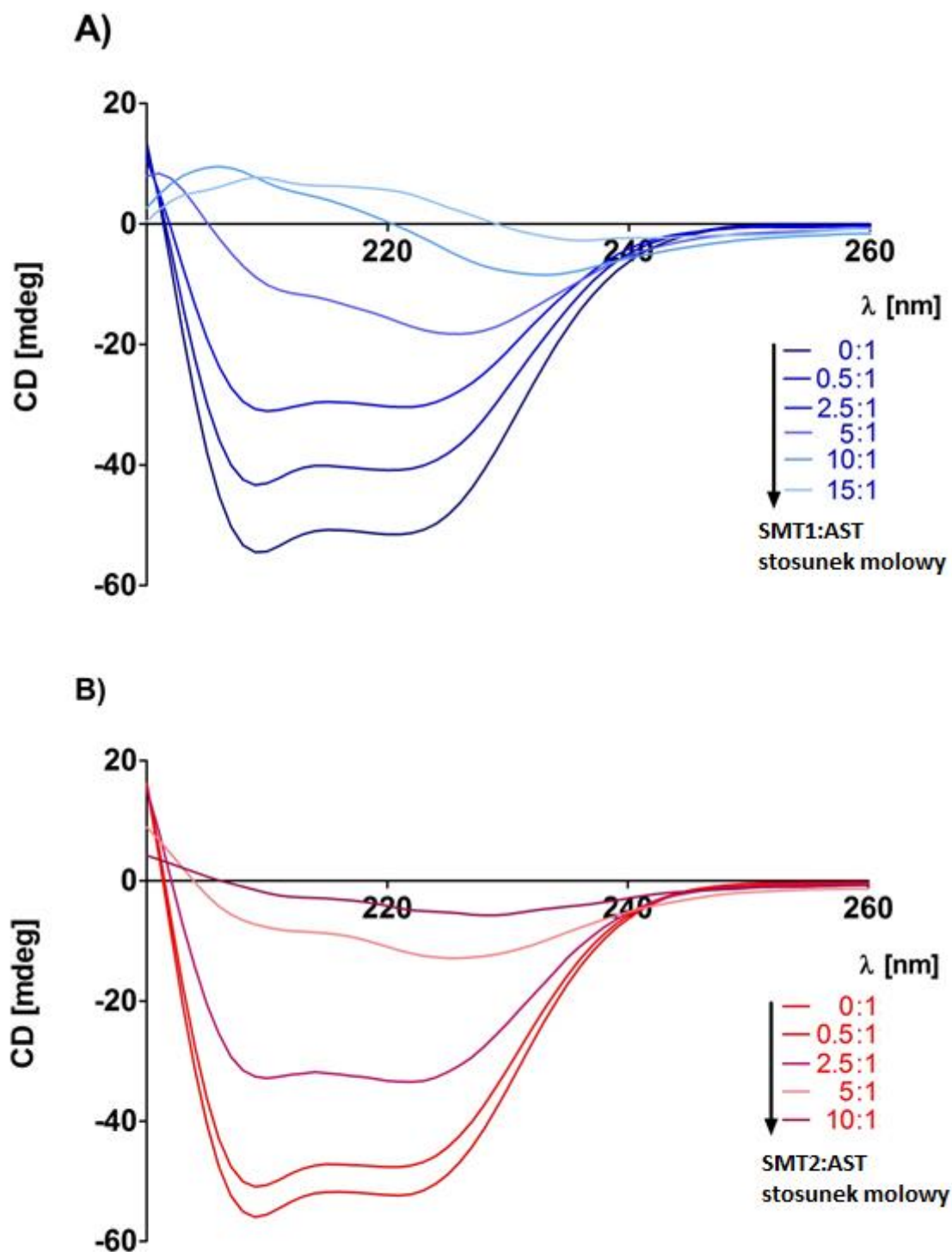
### 8.1.3. Zmiany struktury drugorzędowej białek

W pracy przeprowadzono również badania dotyczące zmian struktury drugorzędowej AST, AP oraz LDH, pod wpływem dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z zastosowaniem techniki dichroizmu kołowego. Na podstawie kształtu widm CD wszystkich trzech białek stwierdzono obecność  $\alpha$ -helisy, która posiada dwa charakterystyczne minima, przy  $\lambda = 208$  nm oraz  $\lambda = 222$  nm. Dodanie dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych obu generacji powodowało zmiany w intensywności sygnału w obu minimach w widmach CD, co świadczy o zmianach w strukturze drugorzędowej białek. Może to być wynikiem wiązania nanocząsteczek z białkiem w sposób zależny od stężenia. Widma AP, AST oraz LDH w obecności dendrymerów SMT1 i SMT2 przedstawiono odpowiednio na Ryc. 20, 21 oraz 22. Zmiany eliptyczności molowej w minimach ( $\lambda = 208$  nm,  $\lambda = 222$  nm) przedstawiono jako stosunek średniej eliptyczności molowej białek w obecności dendrymerów, do eliptyczności molowej samego białka ( $\Theta/\Theta_0$ ) (Ryc. 23 dla AP, 24 dla AST oraz 25 dla LDH). Dendrymery hybrydowe powodowały spadek eliptyczności molowej białek do zera dla AP (SMT1 - 20:1), AST (SMT1 - 7,5:1; SMT2 - 10:1) i LDH (SMT1 - 10:1), w sposób zależny od stężenia, przy  $\lambda = 208$  nm. W minimum  $\lambda = 222$  nm, spadek współczynnika eliptyczności molowej zależny od stężenia dendrymeru jest widoczny dla białek AST i LDH. Minimalna wartość współczynnika eliptyczności molowej jest w tym przypadku osiągana dla AST w obecności SMT1 w stężeniu 15  $\mu$ M i SMT2 w stężeniu 10  $\mu$ M, a dla LDH w stężeniu 15  $\mu$ M dla obu dendrymerów. Natomiast w przypadku fosfatazy alkalicznej przy  $\lambda = 222$  nm, dendrymer generacji drugiej powodował niewielki spadek współczynnika eliptyczności molowej do poziomu 80% w stężeniu 20  $\mu$ M, a dendrymer generacji pierwszej, w tym samym stężeniu, do poziomu 40% wartości współczynnika eliptyczności molowej AP. Stąd, wpływ dendrymerów SMT na strukturę drugorzędową białek, był mniejszy w przypadku AP, w porównaniu z AST oraz LDH. Ponadto, można zauważyć, że wpływ dendrymerów generacji pierwszej na oba minima był większy niż dendrymerów generacji drugiej, co można wywnioskować na podstawie zmian współczynnika eliptyczności molowej badanych białek (Ryc. 23, 24, 25).

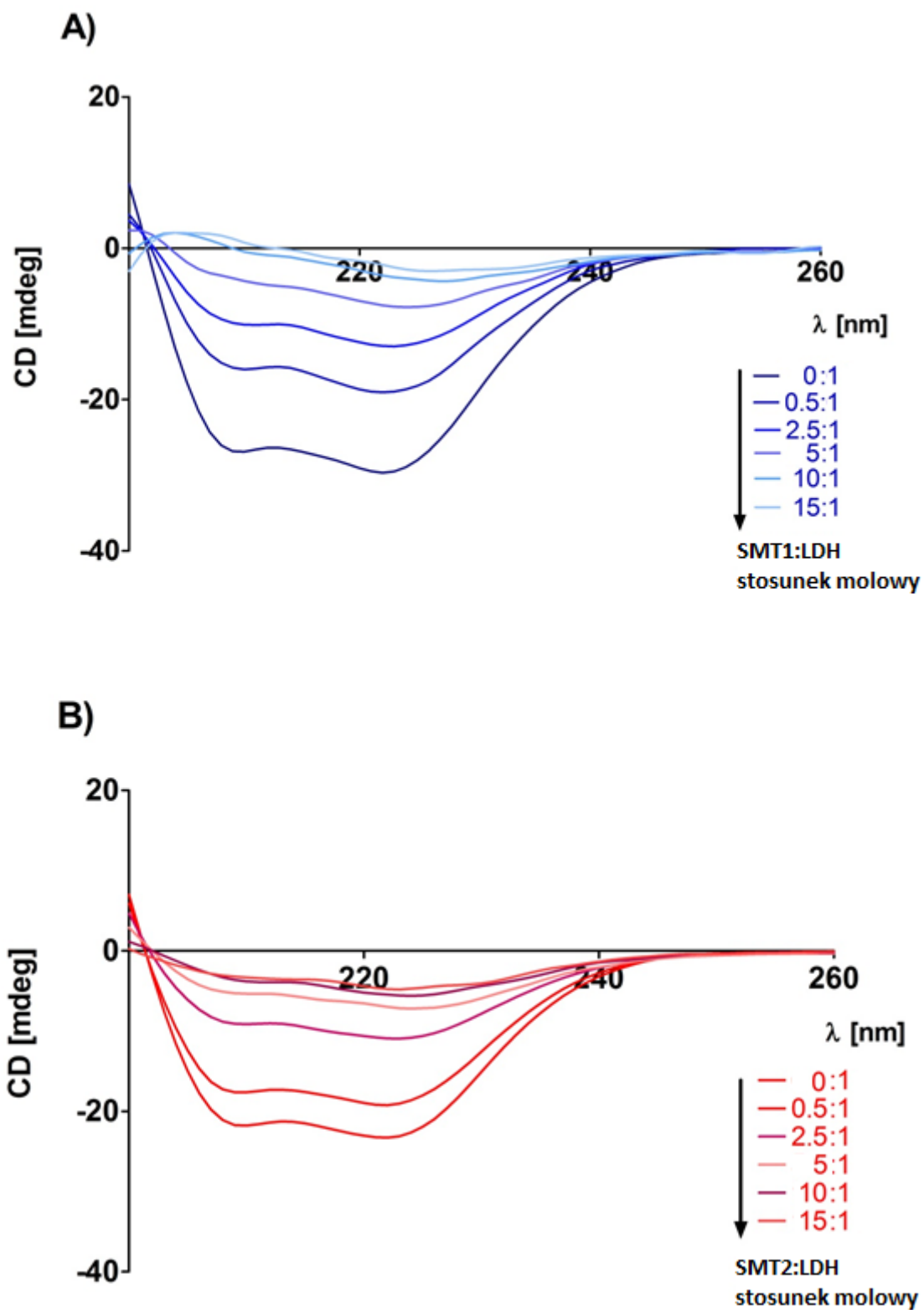




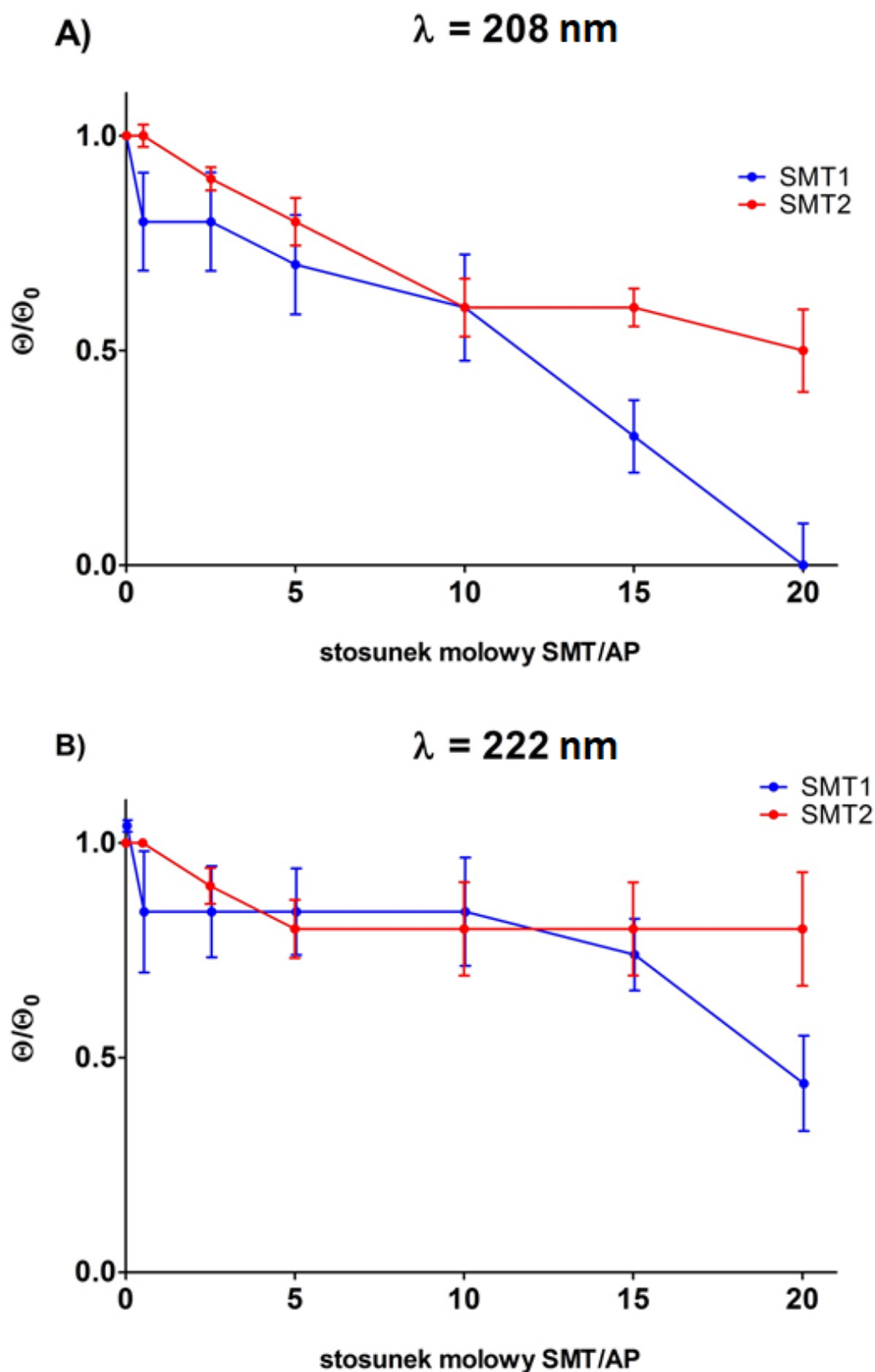
Ryc. 20. Widma dichroizmu kołowego fosfatazy alkalicznej ( $C = 1 \mu\text{M}$ ) w obecności dendrymerów SMT1 (A) oraz SMT2 (B).  $n \geq 3$ .



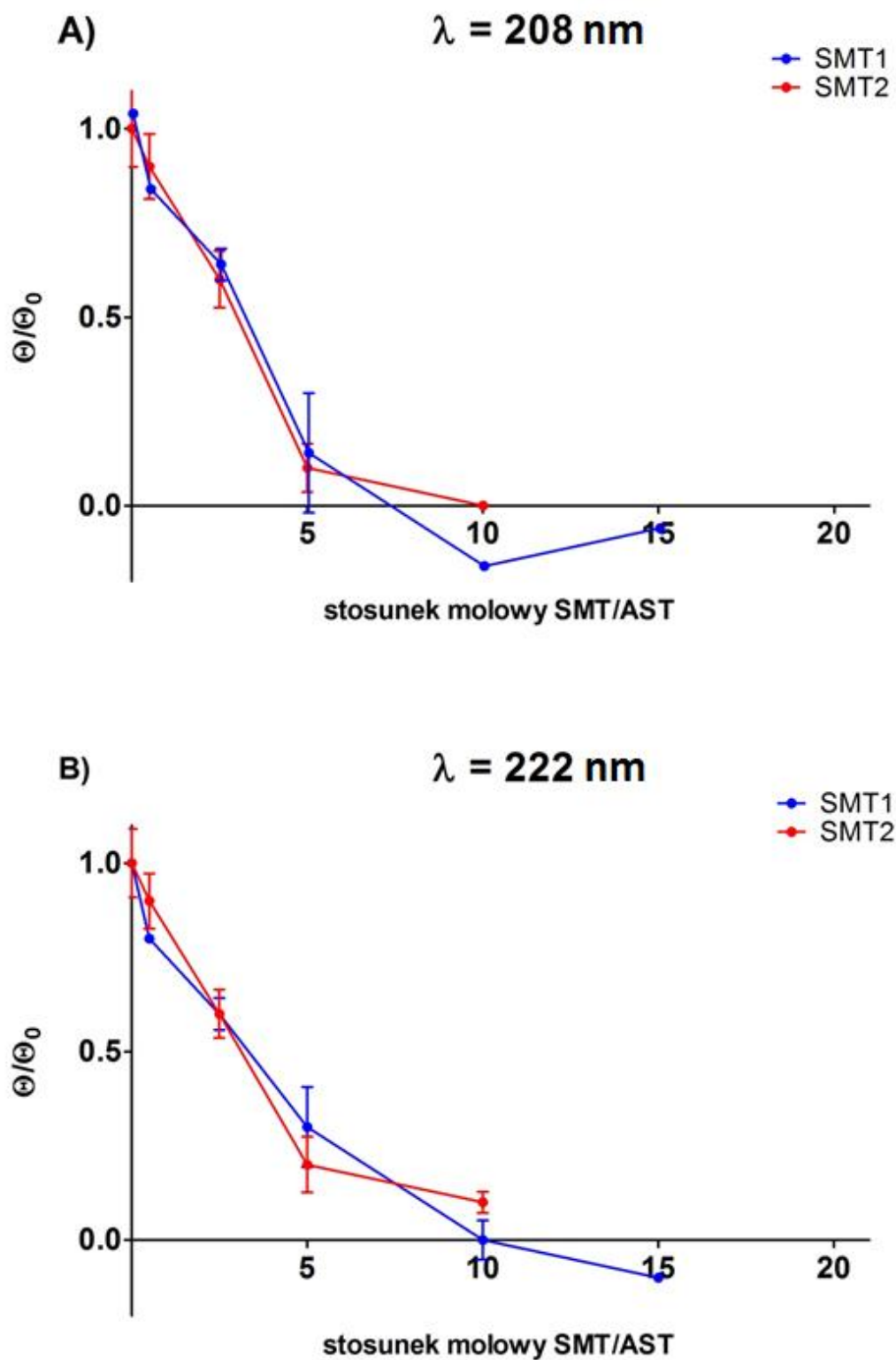
Ryc. 21. Widma dichroizmu kołowego aminotransferazy asparaginianowej ( $C = 1 \mu\text{M}$ ) w obecności dendrymerów SMT1 (A) oraz SMT2 (B).  $n \geq 3$ .



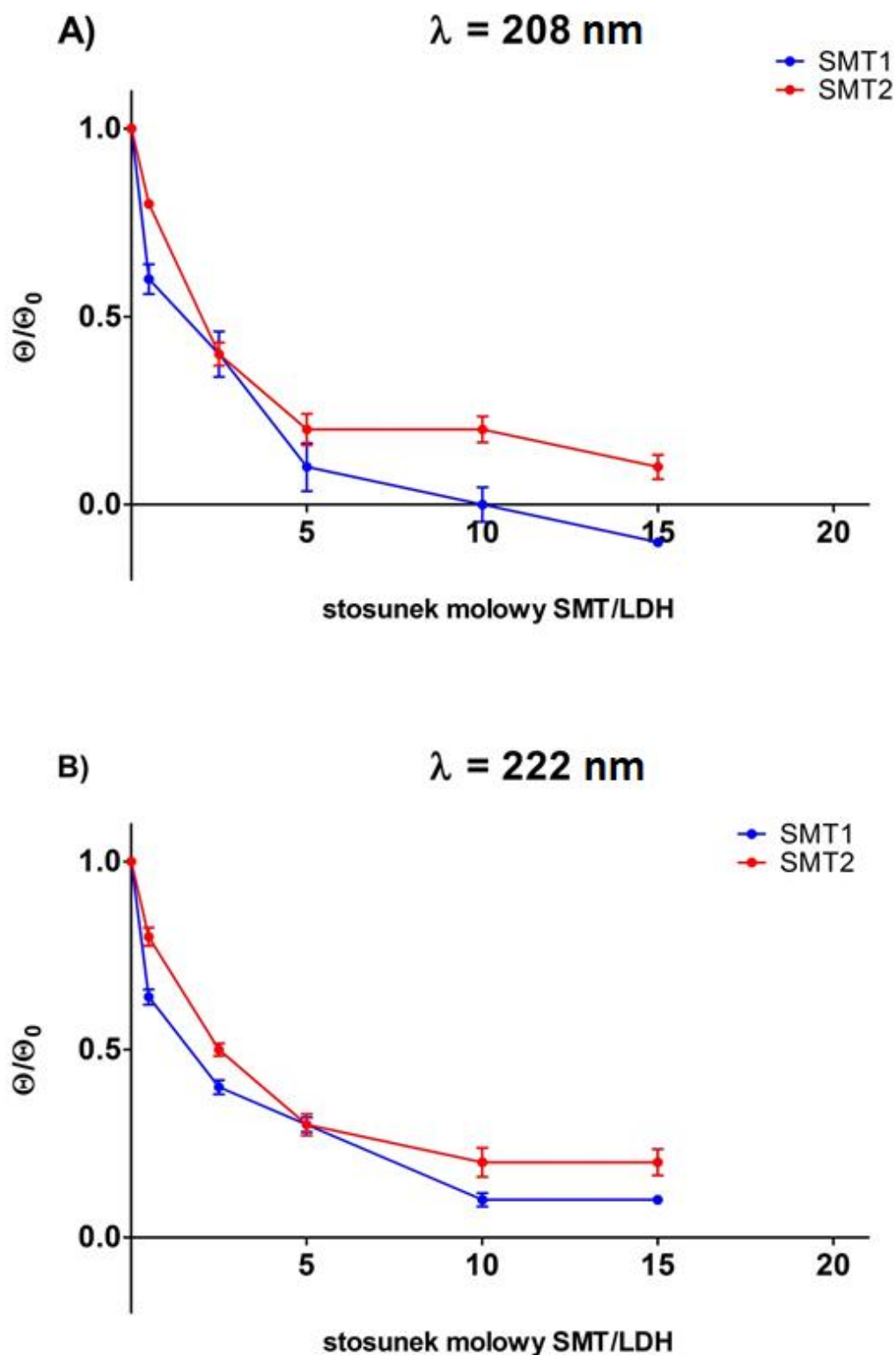
Ryc. 22. Widma dichroizmu kołowego dehydrogenazy L-mleczanowej ( $C = 1 \mu\text{M}$ ) w obecności dendrymerów SMT1 (A) oraz SMT2 (B).  $n \geq 3$ .



Ryc. 23. Zależność współczynnika eliptyczności molowej  $\Theta/\Theta_0$  od stosunku molowego SMT/AP, gdzie  $\Theta$  – eliptyczność molowa AP w obecności dendrymerów;  $\Theta_0$  – eliptyczność molowa AP bez dendrymerów.  $C = 1 \mu\text{M}$ . Wartość  $\Theta$  i  $\Theta_0$  odczytano dla dwóch długości fali  $\lambda = 208 \text{ nm}$  (A) oraz  $\lambda = 222 \text{ nm}$  (B).  $n \geq 3$ .



Ryc. 24. Zależność współczynnika eliptyczności molowej  $\Theta/\Theta_0$  od stosunku molowego SMT/AST, gdzie  $\Theta$  – eliptyczność molowa AST w obecności dendrymerów;  $\Theta_0$  – eliptyczność molowa AST bez dendrymerów.  $C = 1 \mu\text{M}$ . Wartość  $\Theta$  i  $\Theta_0$  odczytano dla dwóch długości fali  $\lambda = 208 \text{ nm}$  (A) oraz  $\lambda = 222 \text{ nm}$  (B).  $n \geq 3$ .



Ryc. 25. Zależność współczynnika eliptyczności molowej  $\Theta/\Theta_0$  od stosunku molowego SMT/LDH, gdzie  $\Theta$  – eliptyczność molowa LDH w obecności dendrymerów;  $\Theta_0$  – eliptyczność molowa LDH bez dendrymerów.  $C = 1 \mu\text{M}$ . Wartość  $\Theta$  i  $\Theta_0$  odczytano dla dwóch długości fali  $\lambda = 208 \text{ nm}$  (A) oraz  $\lambda = 222 \text{ nm}$  (B).  $n \geq 3$ .

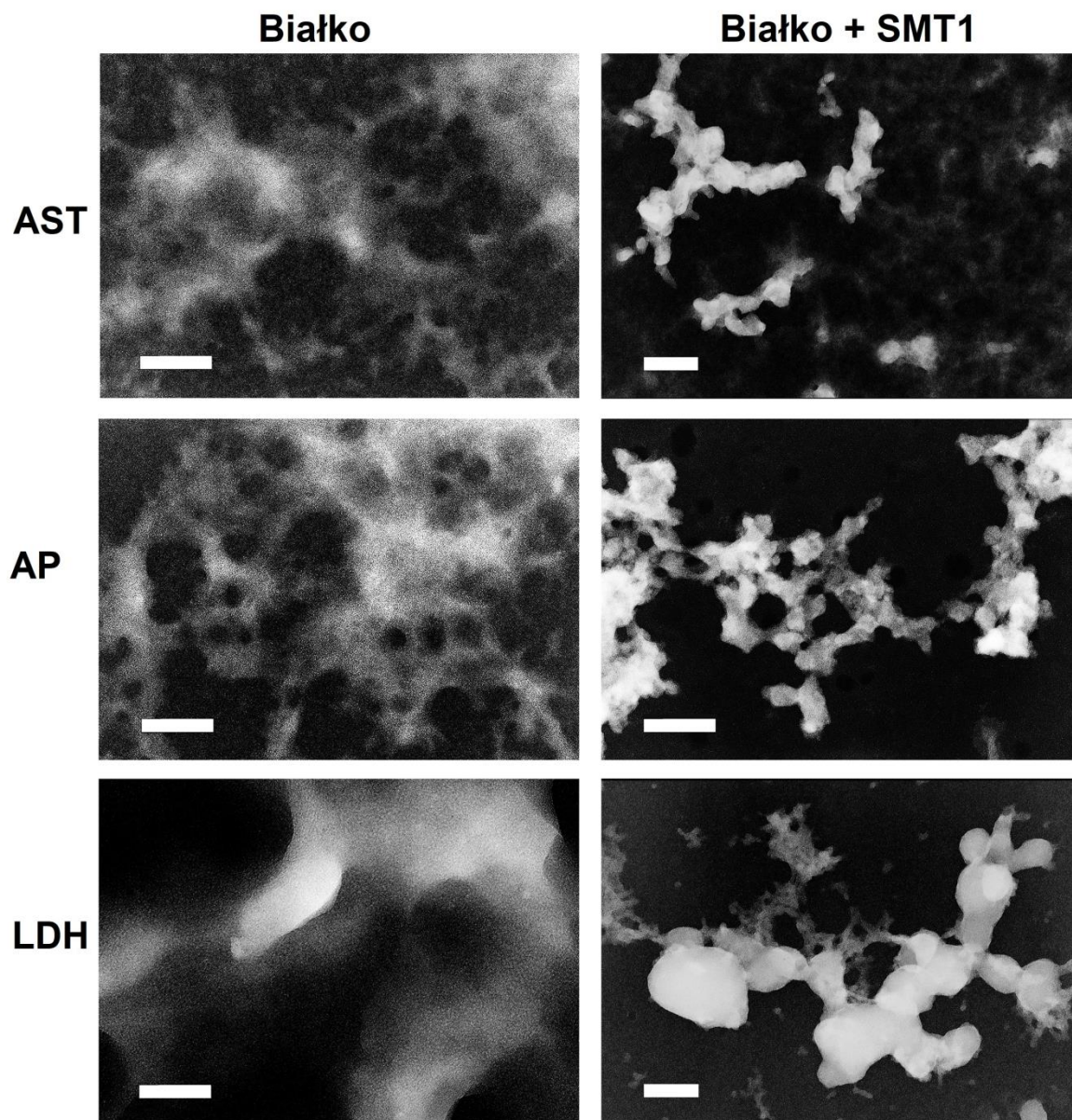
#### 8.1.4. Wizualizacja kompleksów dendrymerów SMT z białkami

Kolejnym etapem badania oddziaływań dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z białkami była wizualizacja zmian zachodzących w strukturze enzymów oraz utworzonych z dendrymerami kompleksów. Oceny dokonano z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Jako, że wyniki uprzednio dokonanej analizy nie wskazywały na duże różnice w sposobie oddziaływania dendrymerów generacji pierwszej i drugiej, na Ryc. 26 przedstawiono jedynie zdjęcia białek w obecności dendrymeru SMT1.

Same białka były widoczne jako fibrylarny materiał o różnej gęstości elektronowej. Podczas gdy, białko AST w obecności dendrymerów SMT tworzyło globularne kształty o wielkości około 40 – 80 nm, to po dodaniu dendrymerów do białka AP obserwowano nieregularne zagregowane formy, których wielkość sięgała do 150 nm. Z kolei dodanie dendrymerów do roztworu białka LDH skutkowało pojawieniem się kulistych elektronowo gęstych struktur, których rozmiar nie przekraczał 200 nm. Wyniki uzyskane podczas analizy w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wskazują na zdolność tworzenia kompleksów przez dendrymery SMT z badanymi białkami.

Należy zwrócić uwagę, że próbki przygotowane do obrazowania z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego muszą zostać uprzednio wysuszone, co może wpłynąć na otrzymane wyniki. Jednakże, można stwierdzić, iż doszło do utworzenia kompleksów pomiędzy dendrymerami karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowymi, a wybranymi enzymami.





Ryc. 26. Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego białek AP, AST oraz LDH bez (panel lewy) oraz w obecności dendrymerów SMT1 (panel prawy). Skala = 100 nm.



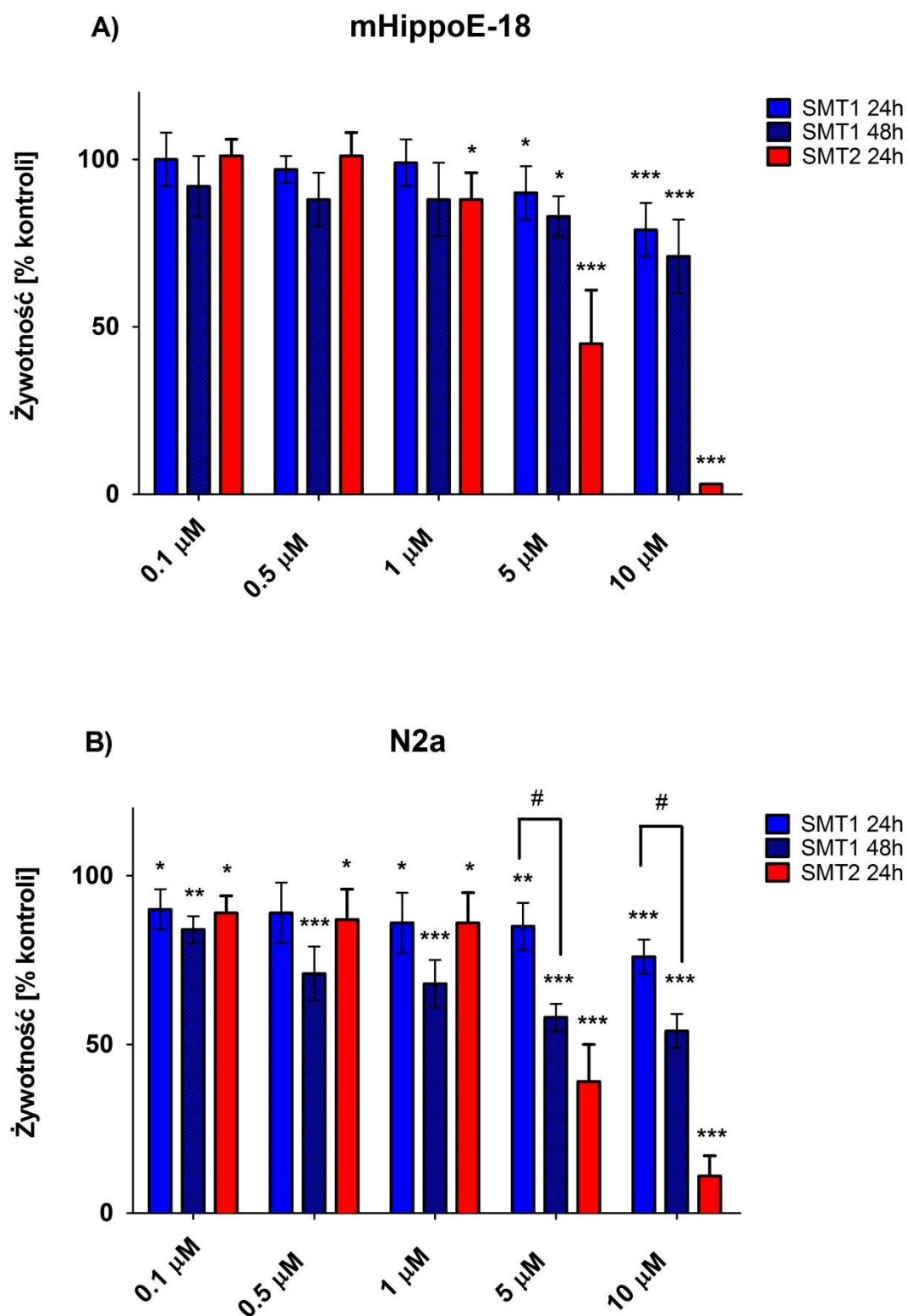
## 8.2. Wpływ dendrymerów hybrydowych na mysie komórki nerwowe linii N2a i mHippoE-18

Biorąc pod uwagę szerokie zastosowanie dendrymerów w badaniach przeciwnowotworowych i ich zdolność do zapobiegania tworzeniu się włókienek amyloidowych zaangażowanych w choroby neurodegeneracyjne, do oceny wpływu dendrymerów SMT na komórki, wybrane zostały dwie różne mysie linie komórek nerwowych: N2a oraz mHippoE-18. Mysią linię nowotworową stanowiły komórki nerwiaka płodowego N2a (neuroblastoma). Linia komórkowa N2a stanowiła model do badania potencjalnych efektów toksycznych akumulacji nanocząstek tlenku miedzi w mózgu, jak i do badania neurotoksyczności, czy choroby Alzheimera (Provost, 2010; Salto i wsp., 2015). Ponadto, była ona również wykorzystywana jako model w badaniach dotyczących ochronnego działania dendrymerów w infekcjach prionowych oraz toksyczności związanej z powstawaniem  $\beta$ -amyloidu. Mysią linię nienowotworową immortalizowaną stanowiły embrionalne komórki hipokampalne mHippoE-18. Linia ta stanowi odpowiedni model do opracowywania środków terapeutycznych ukierunkowanych na choroby i zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego. Co ważne, badania z wykorzystaniem linii komórkowej mHippoE-18 wydają się szczególnie atrakcyjne z punktu widzenia potencjału zastosowania dendrymerów jako leków przeciwamyloidowych, ponieważ uszkodzenie hipokampu jest związane zarówno z chorobą Alzheimera, jak i chorobą Parkinsona (Lazniewska i wsp., 2013a; Lazniewska i wsp., 2013b).

### 8.2.1. Cytotoksyczność dendrymerów SMT wobec mysich linii komórkowych

Pierwszym etapem badania wpływu dendrymerów hybrydowych dwóch generacji na mysie linie komórkowe było określenie cytotoksyczności przy użyciu testu MTT. Jedynie niewielki spadek żywotności komórek linii N2a oraz mHippoE-18 zaobserwowano po ich 24 godzinnej inkubacji z dendrymerami SMT1. Przy najwyższym użytym stężeniu (10  $\mu\text{M}$ ) żywotność komórek mHippoE-18 spadła do poziomu 79%, natomiast komórek N2a do 76%, w stosunku do nietraktowanej kontroli (przyjętej jako 100%). Dendrymery SMT2, po 24 godzinnej inkubacji, powodowały zależne od stężenia zmniejszenie żywotności komórek obu linii (Ryc. 27). Żywotność komórek obu linii po 24 godzinnej inkubacji z dendrymerami SMT2, w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , spadała poniżej 10% w porównaniu do nietraktowanej kontroli przyjętej jako 100%. Stężenie cytotoksyczne 50% (CC50) zdefiniowano jako stężenie dendrymeru, które powodowało spadek żywotności komórek o 50% w stosunku do nietraktowanej kontroli. Wartość CC50 obliczono tylko dla dendrymerów SMT2, w związku z niewielką toksycznością dendrymerów generacji pierwszej po 24 godzinach inkubacji. Wartość CC50 dla SMT2 w stosunku do komórek mHippoE-18 wynosiła  $3,5 \pm 1,2 \mu\text{M}$ , a dla SMT2/N2a była równa  $3,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$ . Wyniki wskazują, że komórki obu linii, po 24 godzinach inkubacji, są bardziej wrażliwe na działanie dendrymerów generacji drugiej.

Ze względu na niewielką cytotoksyczność dendrymerów generacji pierwszej po 24 godz., zdecydowano o wydłużeniu czasu inkubacji dla dendrymerów SMT1 do 48 godzin. Uzyskane wyniki wskazują, iż w przypadku komórek N2a, cytotoksyczność dendrymerów SMT1 zwiększyła się i była zależna od ich stężenia. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w żywotności komórek N2a po 24 i 48 godzinach inkubacji, dla stężeń 5  $\mu\text{M}$  (do 58%) i 10  $\mu\text{M}$  (do 54%) (Ryc. 27). Wartość CC50 dendrymerów SMT1 dla komórek N2a po 48 godzinach inkubacji wynosiła  $14,3 \pm 1,8 \mu\text{M}$ . W przypadku komórek mHippoE-18 zaobserwowano nieznaczny spadek żywotności po 48 godzinach, który nie był istotny statystycznie w porównaniu do wyników uzyskanych po 24 godzinnej inkubacji.



Ryc. 27. Żywotność komórek mHippoE-18 (A) oraz N2a (B) po 24 godz. inkubacji z SMT1 i SMT2 oraz po 48 godz. inkubacji z SMT1. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli przyjętej jako 100%. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$   $n = 6$ . # – istotna statystycznie różnica pomiędzy czasem inkubacji 24 a 48 godz.

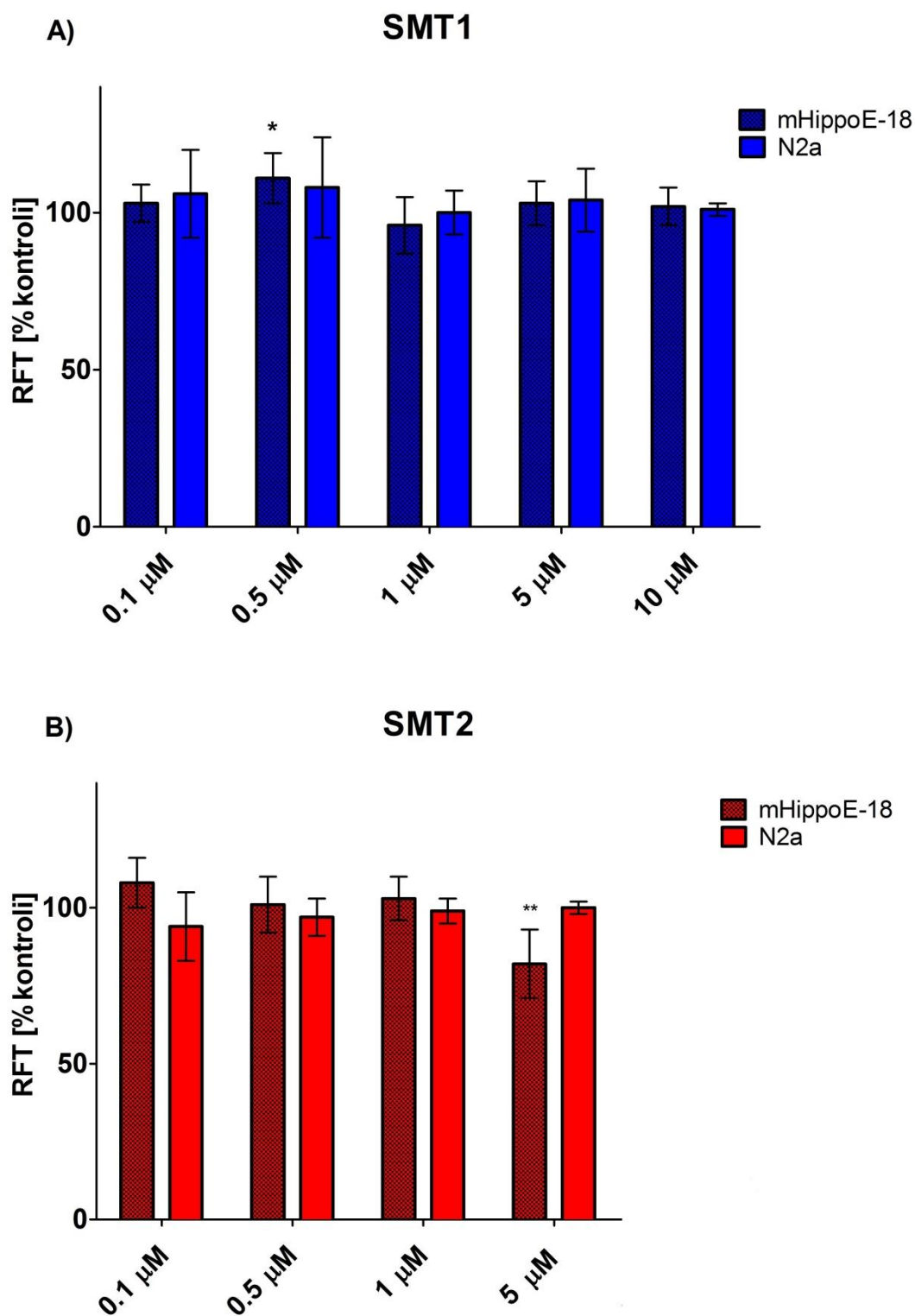
### 8.2.2. Poziom reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach

Kolejnym etapem badań była ocena zmian w poziomie reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach za pomocą sondy fluorescencyjnej - H<sub>2</sub>DCFDA. Komórki obu linii poddano 24 godzinnej inkubacji z dendrymerami karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowymi generacji pierwszej i drugiej. Dla dendrymeru SMT1 zastosowano 5 stężeń (0,1 μM, 0,5 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM) wykorzystanych również w badaniu cytotoksyczności. Jednakże, ze względu na wysoką cytotoksyczność dendrymeru SMT2 w stężeniu 10 μM, zarówno dla linii N2a jak i mHippoE-18, nie uwzględniono go w oznaczeniach reaktywnych form tlenu w komórkach.

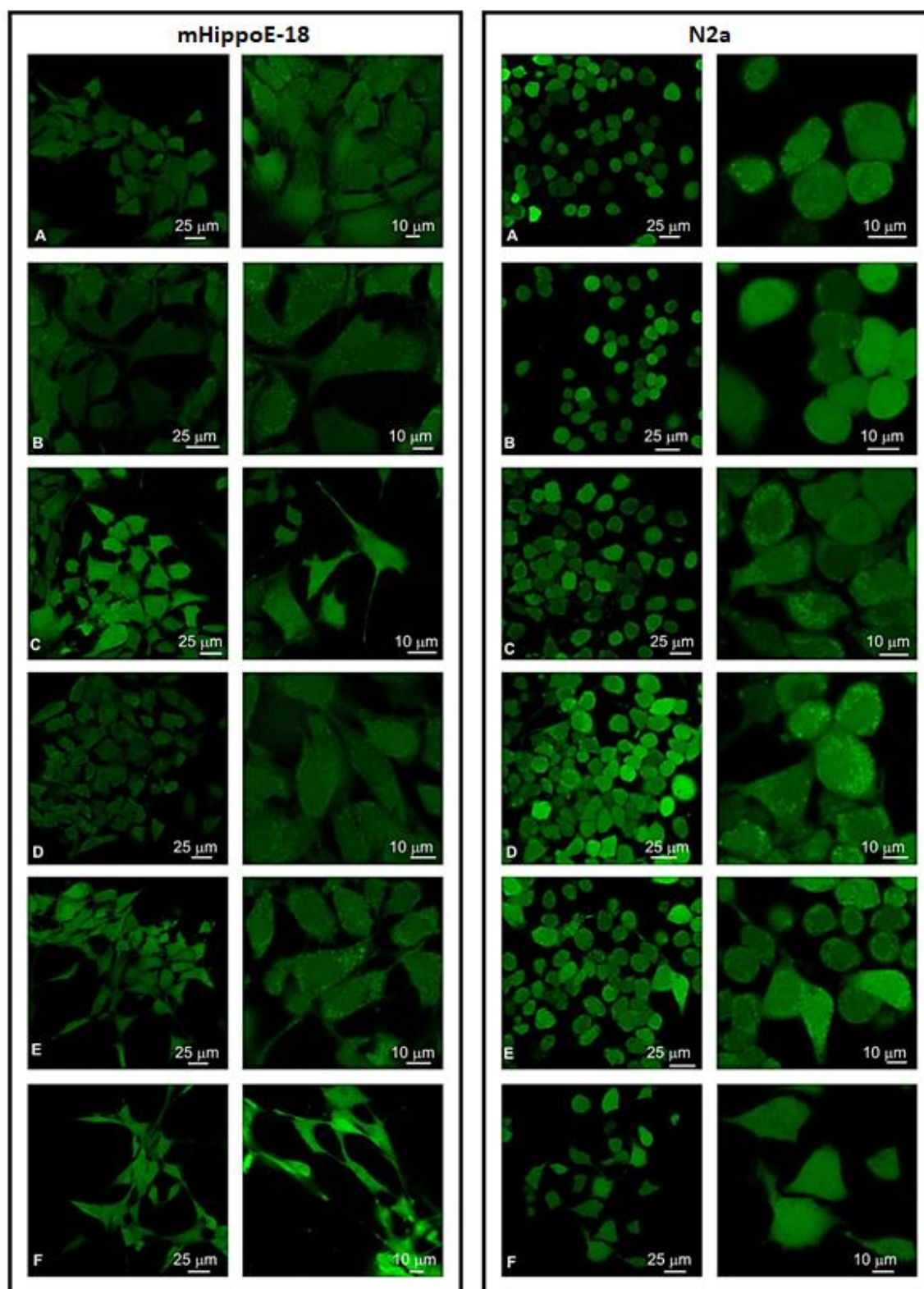
Otrzymane wyniki wykazały niewielki (do poziomu 105%), aczkolwiek istotny statystycznie, wzrost poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach mHippoE-18 dla stężenia 0,5 μM w przypadku dendrymerów SMT1 oraz niewielki (do poziomu 80%) istotny statystycznie spadek ilości reaktywnych form tlenu w przypadku dendrymerów SMT2 dla stężenia 5 μM.

Pozostałe stężenia dendrymerów SMT1 oraz SMT2 nie powodowały istotnych statystycznie zmian w poziomie reaktywnych form tlenu dla obu linii komórkowych poddanych 24 godzinnej inkubacji, w porównaniu do kontroli nietraktowanej, przyjętej jako 100% (Ryc. 28).

Dodatkowo, próbki po 24 godzinnej inkubacji z dendrymerem SMT1 wizualizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego (Ryc. 29). Wizualizacja komórek N2a i mHippoE-18 potwierdziła brak zmian w intensywności fluorescencji komórek w obecności dendrymeru, po wybarwieniu sondą H<sub>2</sub>DCFDA, co wskazuje na brak zmian w poziomie RFT. Przedstawione wyniki potwierdzają rezultaty uzyskane za pomocą czytnika mikroplątek BIOTEK PowerWave HT.



Ryc. 28. Zmiany w poziomie reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach linii mHippoE-18 oraz N2a po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 (A) oraz SMT2 (B). Pomiarów dokonano z użyciem sondy  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli przyjętej jako 100%.  $n = 6$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

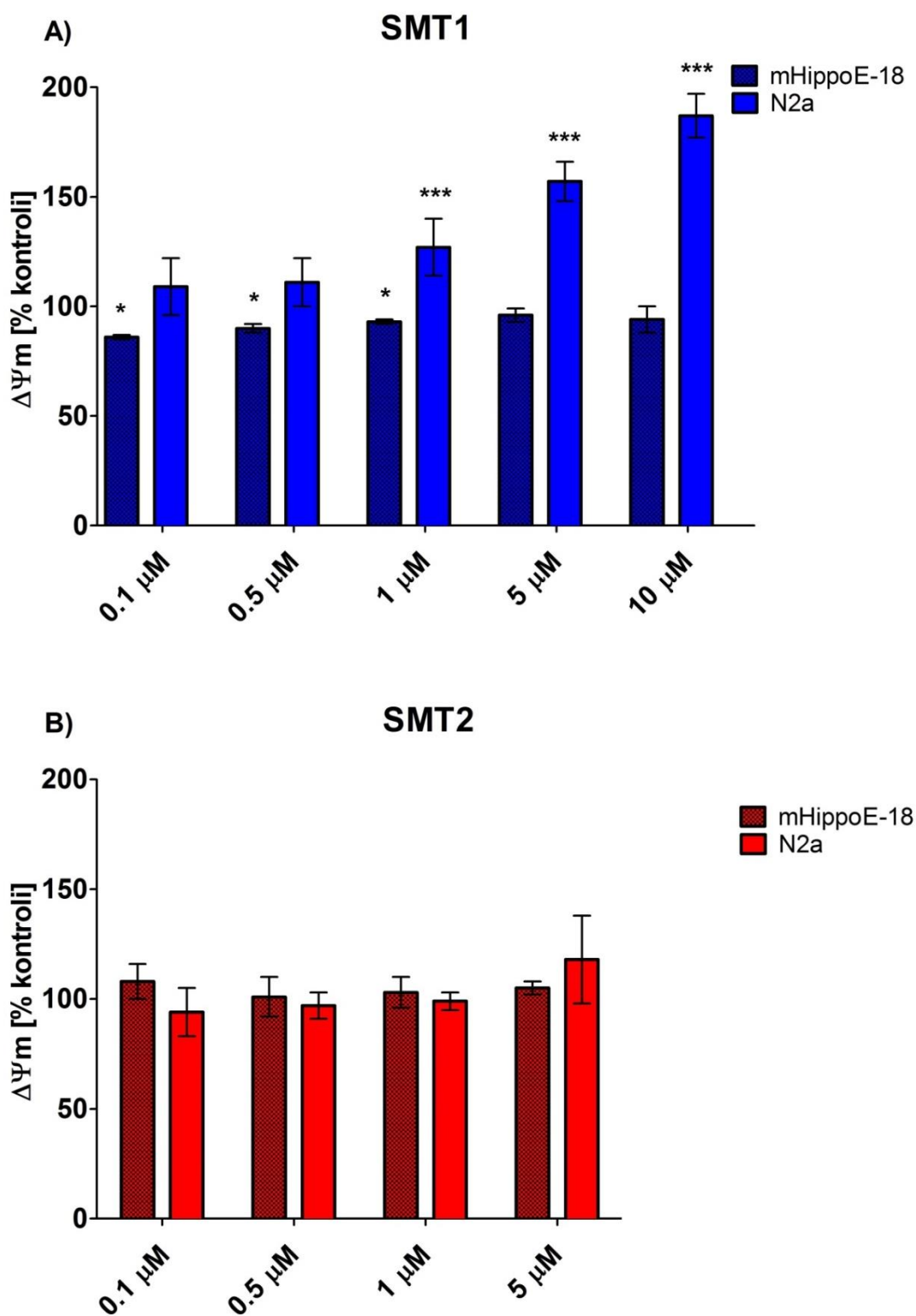


Ryc. 29. Zmiany w poziomie reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach linii mHippoE-18 (lewy panel) oraz N2a (prawy panel) po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego z wykorzystaniem sondy H<sub>2</sub>DCFDA. A – kontrola, B – 0,1 μM, C – 0,5 μM, D – 1 μM, E – 5 μM, F – 10 μM.

### 8.2.3. Zmiany mitochondrialnego potencjału błonowego

Następnym etapem pracy, po ocenie zmian w poziomie reaktywnych form tlenu w komórkach, było określenie zmian mitochondrialnego potencjału błonowego ( $\Psi_m$ ). Pomiarów dokonano z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej JC-1.

Ze względu na brak istotnych zmian w produkcji RFT po 24 godzinnej inkubacji z dendrymerami SMT obu generacji, nie spodziewano się zmian w mitochondrialnym potencjale błonowym. Jednakże, po 24 godzinnej inkubacji zaobserwowano hiperpolaryzację błony mitochondrialnej komórek N2a. Zmiany te były zależne od stężenia badanego dendrymeru SMT1 i dla najwyższego zastosowanego stężenia dendrymeru wartość mitochondrialnego potencjału błonowego wyniosła około 192% (w porównaniu do kontroli przyjętej jako 100%). W przypadku linii mHippoE-18 doszło jedynie do nieznacznego, jednakże istotnego statystycznie, spadku  $\Psi_m$  pod wpływem dendrymeru SMT1, w stężeniach od 0,1  $\mu\text{M}$  do 1  $\mu\text{M}$  – potencjał mitochondrialny nie spadał poniżej 80% kontroli (Ryc. 30A). W przypadku SMT2, nie stwierdzono istotnych zmian potencjału mitochondrialnego dla obu linii komórkowych po 24 godzinnej inkubacji (Ryc. 30B).



Ryc. 30. Zmiany błonowego potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi_m$ ) w komórkach linii mHippoE-18 oraz N2a po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 (A) oraz SMT2 (B). Pomiarów dokonano z użyciem sondy JC-1. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli przyjętej jako 100%. n = 6, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.



#### 8.2.4. Zmiany poziomu reaktywnych form tlenu, mitochondrialnego potencjału błonowego oraz żywotności komórek mHippoE-18 i N2a pod wpływem dendrymeru SMT1 w zależności od czasu inkubacji

Analiza wyników dotyczących wpływu dendrymerów SMT1 oraz SMT2 na wybrane parametry odpowiedzi komórkowej dwóch mysich linii komórkowych wykazała, że dendrymer SMT1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  nie wywiera znaczącego wpływu na komórki mHippoE-18, a jednocześnie wpływa na komórki N2a. Dendrymer SMT2 wykazywał znaczną toksyczność w stosunku do obu linii komórkowych, przy jednoczesnym braku zmian w ilości reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach oraz w mitochondrialnym potencjale błonowym po 24 godzinach inkubacji. Dlatego też, zdecydowano się na analizę poziomu reaktywnych form tlenu, mitochondrialnego potencjału błonowego oraz żywotności komórek mHippoE-18 (Tabela 4) oraz N2a (Tabela 5) pod wpływem dendrymeru SMT1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  w czasie 0,5 – 48 godzin.

W przypadku komórek linii mHippoE-18 nie zauważono zmian w poziomie RFT w czasie oraz jedynie niewielki spadek potencjału mitochondrialnego i żywotności po 48 godz. inkubacji. Jednakże, nie wykazano istotnie statystycznych różnic w wartościach ww. parametrów pomiędzy czasami inkubacji 24 a 48 godzin.

Natomiast inkubacja komórek N2a z dendrymerem SMT1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  wykazała istotny statystycznie wzrost poziomu reaktywnych form tlenu do około 120% oraz wzrost potencjału mitochondrialnego do 170%, w porównaniu do kontroli, już po 30 minutach. W przypadku RFT, ich poziom spadał po 3 godzinach do poziomu kontroli, a po 48 godzinach poniżej poziomu kontroli, tj. do 84%. Spadek ten był istotny statystycznie. Hiperpolaryzacja błony mitochondrialnej utrzymywała się do 24 godzin, po czym dochodziło do depolaryzacji błony i spadku potencjału mitochondrialnego do 80% w porównaniu do kontroli. Spadek w poziomie RFT oraz spadek mitochondrialnego potencjału błonowego po 48 godzinnej inkubacji korespondowały ze spadkiem żywotności komórek N2a do 58%, który był istotny statystycznie w porównaniu do czasu inkubacji 24 godz.

Tabela 4. Zmiany poziomu reaktywnych form tlenu, mitochondrialnego potencjału błonowego oraz żywotności komórek mHippoE-18 w czasie, w porównaniu z kontrolą dla dendrymeru SMT1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  ( $n > 6$ ,  $*p < 0,05$ ,  $\uparrow/\downarrow$  – statystycznie istotny wzrost/spadek w porównaniu do kontroli; # – statystycznie istotna różnica pomiędzy czasem inkubacji 24 a 48 godziny).

<b>mHippoE-18</b>	<b>SMT1 5<math>\mu\text{M}</math></b>		
<b>Czas [godz.]</b>	RFT	$\Delta\Psi\text{m}$	Żywotność
0	100,0	100,0	100,0
0,5	101,5 $\pm$ 6,7	101,3 $\pm$ 5,0	
1	100,0 $\pm$ 6,2	98,7 $\pm$ 4,5	
3	100,0 $\pm$ 2,6	98,8 $\pm$ 4,5	
6	99,5 $\pm$ 2,1	100,5 $\pm$ 5,4	
24	102,6 $\pm$ 7,1	96,1 $\pm$ 1,3	90,2 $\pm$ 7,6
48	99,3 $\pm$ 2,7	94,5 $\pm$ 3,3* $\downarrow$	82,6 $\pm$ 5,6* $\downarrow$

Tabela 5. Zmiany poziomu reaktywnych form tlenu, mitochondrialnego potencjału błonowego oraz żywotności komórek N2a w czasie, w porównaniu z kontrolą dla dendrymeru SMT1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  ( $n > 6$ ,  $*p < 0,05$ ,  $\uparrow/\downarrow$  – statystycznie istotny wzrost/spadek w porównaniu do kontroli; # – statystycznie istotna różnica pomiędzy czasem inkubacji 24 a 48 godziny).

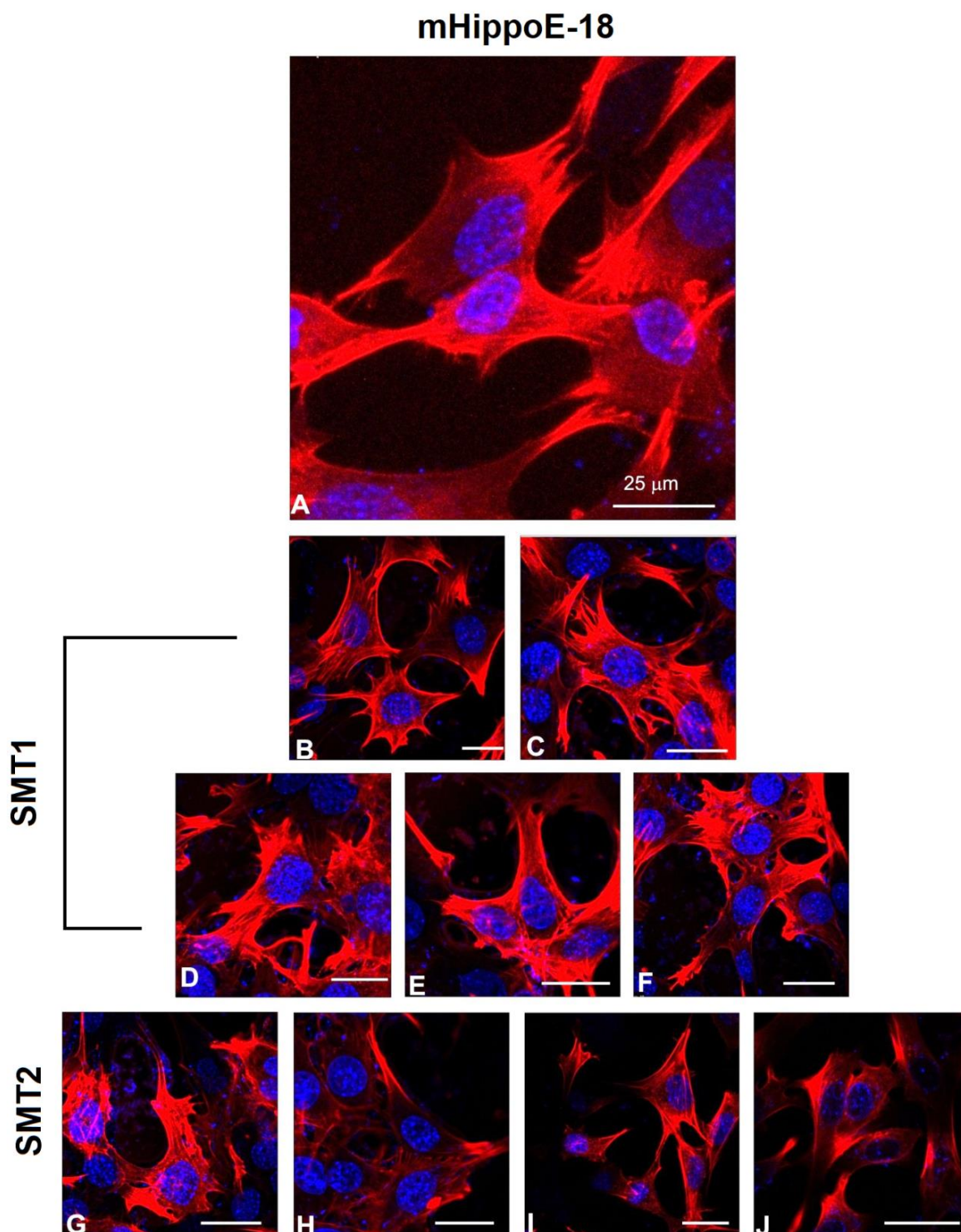
<b>N2a</b>	<b>SMT1 5<math>\mu\text{M}</math></b>		
<b>Czas [godz.]</b>	RFT	$\Delta\Psi\text{m}$	Żywotność
0	100,0	100,0	100,0
0,5	119,8 $\pm$ 10,2* $\uparrow$	169,5 $\pm$ 10,9* $\uparrow$	
1	115,1 $\pm$ 13,2*	160,9 $\pm$ 7,0*	
3	99,7 $\pm$ 2,6	160,8 $\pm$ 9,3*	
6	100,8 $\pm$ 3,8	163,5 $\pm$ 12,7*	
24	103,8 $\pm$ 10,3	156,7 $\pm$ 8,7*	84,6 $\pm$ 7,2* $\downarrow$
48	84,6 $\pm$ 1,6* $\downarrow$ #	80,9 $\pm$ 3,3* $\downarrow$ #	58,2 $\pm$ 4,1* $\downarrow$ #

### 8.2.5. Morfologia komórek linii N2a oraz mHippoE-18

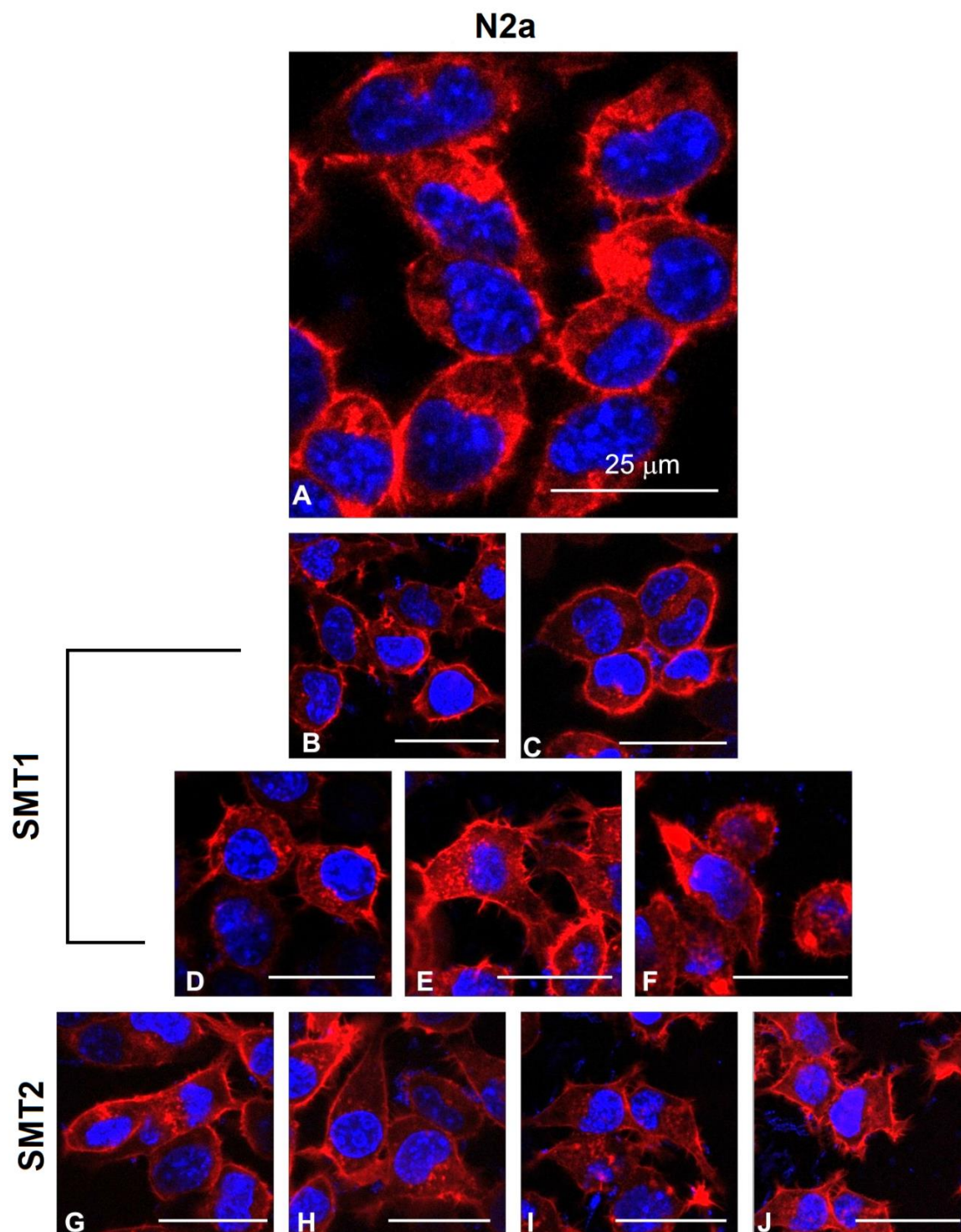
Morfologię komórek analizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8. W utrwalonych komórkach linii N2a oraz mHippoE-18 wybarwiono filamenty aktynowe znakowaną fluorescencyjnie falloidyną, podczas gdy jądro komórkowe zostało wybarwione DAPI (Ryc. 31, 32).

W przypadku komórek linii mHippoE-18, 24 godzinna inkubacja z dendrymerami SMT1 w zakresie stężeń od 0,1  $\mu\text{M}$  do 10  $\mu\text{M}$ , nie spowodowała zmian w ich morfologii (Ryc. 31A-F). Podobnie po inkubacji komórek N2a z SMT1 w stężeniach od 0,1  $\mu\text{M}$  do 1  $\mu\text{M}$  nie obserwowano zmian w morfologii (Ryc. 32A-D). Jednak już wzrost stężenia dendrymeru do 5  $\mu\text{M}$  spowodował dezorganizację cytoszkieletu, pojawienie się dodatkowych wypustek cytoplazmatycznych oraz niewielką kondensację chromatyny w komórkach N2a (Ryc. 32E). Efekt ten nasilał się wraz ze wzrostem stężenia dendrymeru (Ryc. 32F). Co więcej, w obecności dendrymeru SMT1 w stężeniach 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ , rozmiar komórek zwiększył się w stosunku do komórek kontrolnych.

Podczas gdy inkubacja komórek linii N2a oraz mHippoE-18 z dendrymerami SMT2 w stężeniach do 1  $\mu\text{M}$  nie powodowała zmian w morfologii obu analizowanych linii komórkowych (Ryc. 31G-I, 32G-I), to dendrymer SMT2 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  spowodował zmiany w ich morfologii (Ryc. 31J, 32J). W obu liniach zwiększył się rozmiar komórek (Ryc. 31J, 32J). Ponadto, zaobserwowano dezorganizację cytoszkieletu oraz pojawienie się dodatkowych wypustek cytoplazmatycznych (Ryc. 31J, 32J). Co więcej podobnie jak w przypadku dendrymeru SMT1 stosowanego w wyższych stężeniach, po dodaniu do obu linii komórkowych 5  $\mu\text{M}$  dendrymeru SMT2 zauważono niewielką kondensację chromatyny (Ryc. 31J, 32J).



Ryc. 31. Zmiany morfologiczne w komórkach linii mHippoE-18 po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 i SMT2. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Komórki wybarwiono DAPI (niebieska fluorescencja) oraz falloidyną Texas Red-X (czerwona fluorescencja). A – kontrola; SMT1: B – 0,1  $\mu\text{M}$ , C – 0,5  $\mu\text{M}$ , D – 1  $\mu\text{M}$ , E – 5  $\mu\text{M}$ , F – 10  $\mu\text{M}$ ; SMT2: G – 0,1  $\mu\text{M}$ , H – 0,5  $\mu\text{M}$ , I – 1  $\mu\text{M}$ , J – 5  $\mu\text{M}$ . Skala = 25  $\mu\text{m}$ .



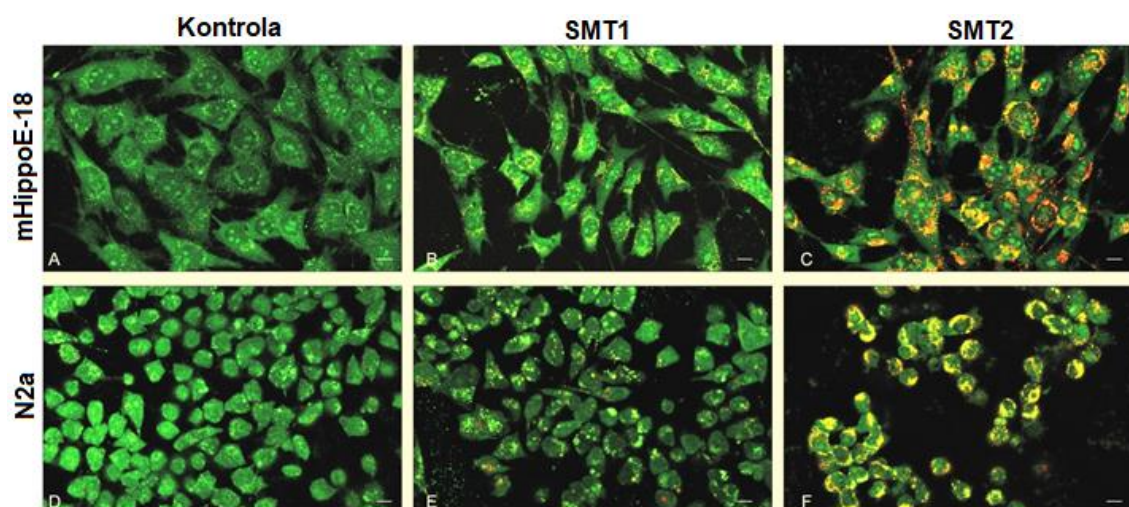
Ryc. 32. Zmiany morfologiczne w komórkach linii N2a po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 i SMT2. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Komórki wybarwiono DAPI (niebieska fluorescencja) oraz falojdyną Texas Red-X (czerwona fluorescencja). A – kontrola; SMT1: B – 0,1  $\mu\text{M}$ , C – 0,5  $\mu\text{M}$ , D – 1  $\mu\text{M}$ , E – 5  $\mu\text{M}$ , F – 10  $\mu\text{M}$ ; SMT2: G – 0,1  $\mu\text{M}$ , H – 0,5  $\mu\text{M}$ , I – 1  $\mu\text{M}$ , J – 5  $\mu\text{M}$ . Skala = 25  $\mu\text{m}$ .



## 8.2.6. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych

### 8.2.6.1. Podwójne barwienie oranż akrydyny/bromek etydyny (AO/EB)

Opisane powyżej zmiany żywotności oraz w mitochondrialnym potencjale błonowym, jak również zmiany morfologiczne po 24 godzinnej inkubacji z dendrymerami SMT1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ , mogły być związane z indukcją apoptozy w komórkach neuroblastomy (N2a). Dlatego też, zdecydowano się na analizę podwójnie wybarwionych (AO/EB) komórek linii N2a oraz mHippoE-18 poddanych inkubacji z dendrymerami SMT1 oraz SMT2 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Analiza próbek potwierdziła wysoką toksyczność dendrymerów generacji drugiej oraz ujawniła silne zmiany morfologiczne dla obu linii komórkowych (Ryc. 33). Wybarwione komórki obserwowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8. Dane zebrane z konfokalnych obrazów wybarwionych komórek pozwoliły na określenie frakcji komórek żywych, nekrotycznych oraz apoptotycznych (Tabela 6). Dla każdej próbki analizowano, co najmniej 250 komórek (50 komórek z 5 pól widzenia).



Ryc. 33. Zdjęcia komórek linii mHippoE-18 i N2a po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 i SMT2 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Komórki wybarwiono oranżem akrydyny (zielona fluorescencja) oraz bromkiem etydyny (czerwona fluorescencja). Żywe komórki – morfologicznie prawidłowe z zielonym jądrem; komórki apoptotyczne – posiadają zielone jądro ze skondensowaną lub pofragmentowaną czerwoną chromatyną; komórki nekrotyczne – morfologicznie prawidłowe z czerwonym jądrem. Skala = 10  $\mu\text{M}$ .

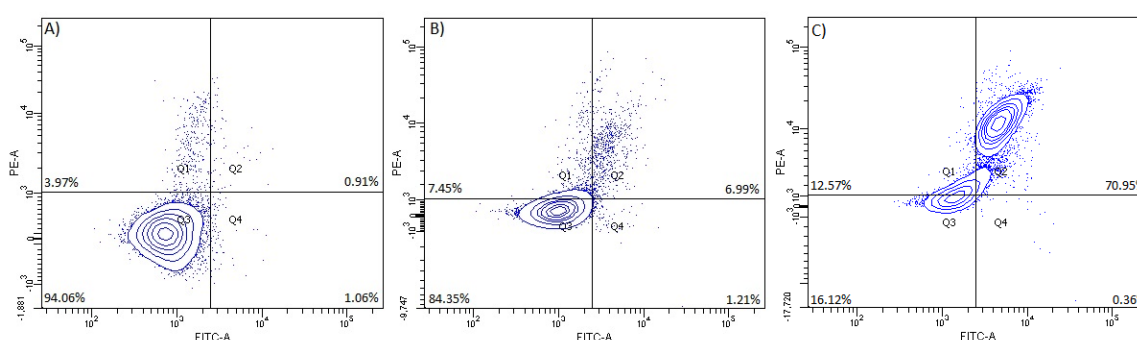
Uzyskane wyniki wykazały, że 5  $\mu$ M stężenie dendrymerów SMT1 powodowało istotny statystycznie niewielki wzrost (do 16,6%) frakcji komórek apoptotycznych linii N2a w porównaniu z komórkami kontrolnymi oraz mHippoE-18. Doprowadziło to do zmniejszenia frakcji komórek żywych N2a (do 83%). Inkubacja komórek przez 24 godziny z dendrymerem SMT2 przyczyniła się do znacznego zwiększenia frakcji komórek apoptotycznych, jednocześnie zmniejszając frakcję komórek żywych linii N2a (do 28,6%) oraz mHippoE-18 (do 49,8%).

Tabela 6. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych w komórkach linii mHippoE-18 oraz N2a po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 i SMT2 w stężeniu 5 $\mu$ M. Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem podwójnego barwienia – oranż akrydyny (AO)/bromek etydyny (EB). Otrzymane wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe. Każde powtórzenie składało się z co najmniej 250 zliczonych komórek. n = 3; \* p < 0,05;  $\uparrow/\downarrow$  – istotny statystycznie wzrost/spadek w porównaniu do kontroli; # – istotne statystycznie różnice pomiędzy komórkami linii N2a i mHippoE-18.

mHippoE-18			
Komórki	Kontrola	SMT1	SMT2
Żywe	98,5 $\pm$ 0,9	95,89 $\pm$ 2,7	49,8 $\pm$ 6,3* $\downarrow$
Nekrotyczne	0,4 $\pm$ 0,9	0,54 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 7,7
Apoptotyczne	1,1 $\pm$ 0,9	3,58 $\pm$ 1,9	47,6 $\pm$ 9,9* $\uparrow$
N2a			
Komórki	Kontrola	SMT1	SMT2
Żywe	98,4 $\pm$ 1,2	83,0 $\pm$ 7,9*# $\downarrow$	28,6 $\pm$ 1,6*# $\downarrow$
Nekrotyczne	0,2 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 3,1
Apoptotyczne	1,4 $\pm$ 1,2	16,6 $\pm$ 4,4*# $\uparrow$	69,9 $\pm$ 13,4* $\uparrow$

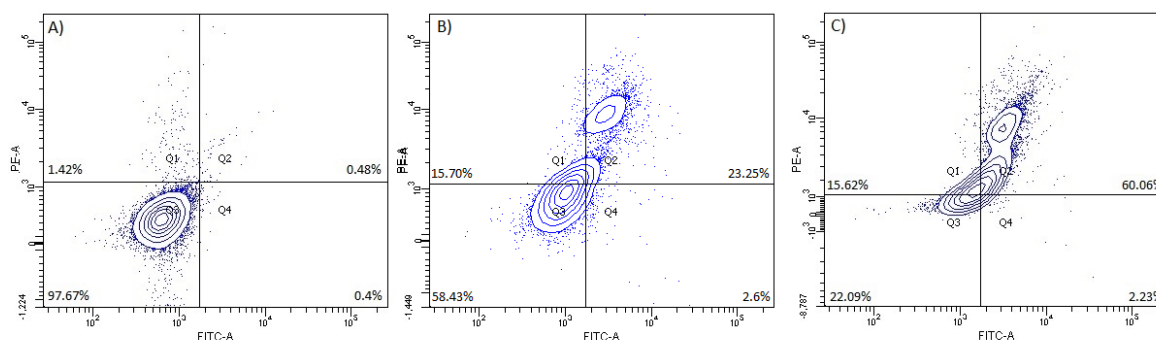
### 8.2.6.2. Podwójne barwienie aneksyna V/jodek propidyny (PI)

Aby potwierdzić uzyskane wcześniej wyniki dotyczące wielkości frakcji komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych, po inkubacji z dendrymerami SMT, wykonano analizę cytometryczną komórek linii N2a oraz mHippoE-18 wybarwionych aneksyną V i jodkiem propidyny (Ryc. 34, 35). Analiza komórek poddanych podwójnemu barwieniu (Ann-V/PI) wykazała, że po inkubacji komórek linii N2a z dendrymerami SMT w stężeniu 5  $\mu$ M, frakcja żywych komórek zmniejszyła się z 97,7% dla kontroli do 61,6% i 16,1%, odpowiednio dla pierwszej i drugiej generacji dendrymeru. Jednocześnie populacja komórek apoptotycznych wzrosła z 0,9% dla kontroli do 23,3% (SMT1) i 69,3% (SMT2). Inkubacja komórek mHippoE-18 z dendrymerami SMT1 doprowadziła do lekkiego spadku (do 77,2%) populacji komórek żywych oraz niewielkiego wzrostu frakcji komórek apoptotycznych (do 10,4%). Wpływ dendrymerów SMT2 na komórki hipokampa był podobny do ich wpływu na komórki N2a. Frakcja komórek żywych i apoptotycznych uległa drastycznej zmianie w porównaniu do kontroli. Ilość żywych komórek zmniejszyła się do 18,9%, a frakcja komórek apoptotycznych wzrosła do 64,6% (Tabela 7). Obie metody z wykorzystaniem podwójnego barwienia wskazują na znaczny wzrost frakcji komórek apoptotycznych w obu liniach po inkubacji z dendrymerem SMT2, a różnice w wartościach mogą być spowodowane różnicami w stosowanych metodach.



Ryc. 34. Przykładowe wykresy kropkowe komórek linii mHippoE-18 po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 oraz SMT2 w stężeniu 5  $\mu$ M. Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem metody z aneksyną V i jodkiem propidyny (PI) za pomocą cytometru przepływowego. A – kontrola, B – komórki po inkubacji z SMT1, C – komórki po inkubacji z SMT2.





Ryc. 35. Przykładowe wykresy kropkowe komórek linii N2a po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 oraz SMT2 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem metody z aneksyną V i jodkiem propidyny (PI) za pomocą cytometru przepływowego. A – kontrola, B – komórki po inkubacji z SMT1, C – komórki po inkubacji z SMT2.

Tabela 7. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych w komórkach linii mHippoE-18 oraz N2a po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 i SMT2 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem metody z aneksyną V i jodkiem propidyny (PI) za pomocą cytometru przepływowego. Otrzymane wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n = 3$ ; \*  $p < 0,05$ ;  $\uparrow/\downarrow$  – istotny statystycznie wzrost/spadek w porównaniu do kontroli; # – istotne statystycznie różnice pomiędzy komórkami linii N2a i mHippoE-18.

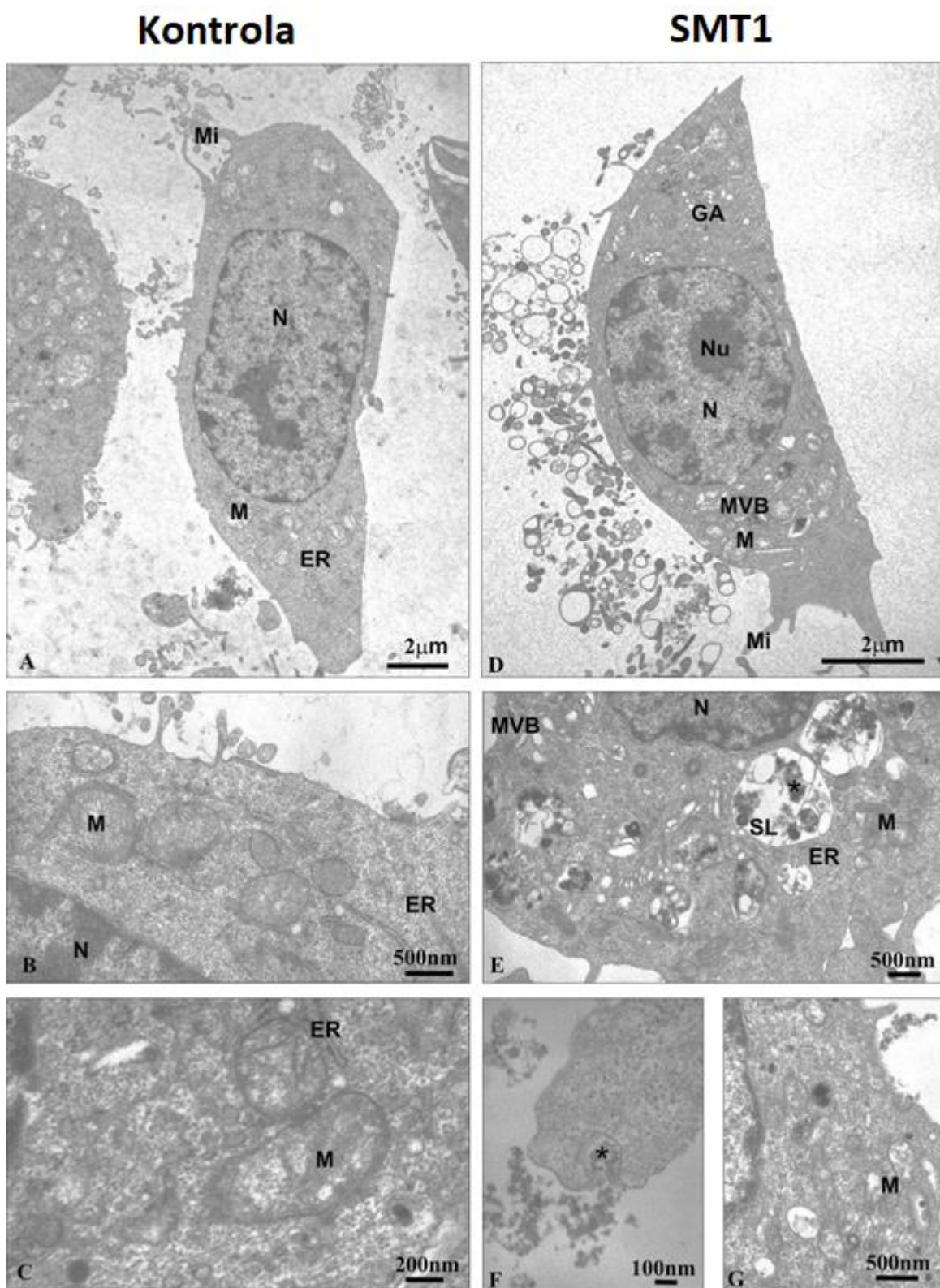
mHippoE-18			
Komórki	Kontrola	SMT1	SMT2
Żywe	94,1 $\pm$ 1,0	77,7 $\pm$ 5,8* $\downarrow$	18,9 $\pm$ 3,2* $\downarrow$
Nekrotyczne	4,0 $\pm$ 0,8	12,5 $\pm$ 5,1* $\uparrow$	16,5 $\pm$ 4,0* $\uparrow$
Apoptotyczne	2,0 $\pm$ 0,7	10,4 $\pm$ 1,0* $\uparrow$	64,6 $\pm$ 8,1* $\uparrow$
N2a			
Komórki	Kontrola	SMT1	SMT2
Żywe	97,7 $\pm$ 1,0	61,6 $\pm$ 5,1*# $\downarrow$	16,1 $\pm$ 4,2* $\downarrow$
Nekrotyczne	1,4 $\pm$ 0,5	15,1 $\pm$ 1,5* $\uparrow$	14,6 $\pm$ 1,4* $\uparrow$
Apoptotyczne	0,9 $\pm$ 0,2	23,3 $\pm$ 5,8*# $\uparrow$	69,3 $\pm$ 6,0* $\uparrow$

### 8.2.7. Ultrastruktura komórek N2a

Analizę mikroskopową TEM przeprowadzono w celu oceny zmian ultrastrukturalnych w komórkach N2a pod wpływem dendrymerów SMT1 i SMT2. Nietraktowane komórki kontrolne posiadały prawidłową ultrastrukturę, liczne mikrokosmki (Mi), retikulum endoplazmatyczne (ER) i mitochondria (M) w cytoplazmie (Ryc. 36A-C) oraz równomiernie rozłożoną chromatynę w jądrze (N) (Ryc. 36A). Ultrastruktura komórek inkubowanych z dendrymerami SMT1 (5  $\mu$ M) została nieznacznie zmieniona (Ryc. 36D). W komórkach pojawiły się struktury wielopęcherzykowe (MVB) (Ryc. 36D, E). Ponadto, inkubacja komórek linii N2a z dendrymerami generacji pierwszej spowodowała utworzenie lizosomów wtórnych (SL) z widocznym granularnym elektronowogęstym materiałem (Ryc. 36E\*). Dodatkowo matrix mitochondrialna była rozrzedzona (Ryc. 36E, G).

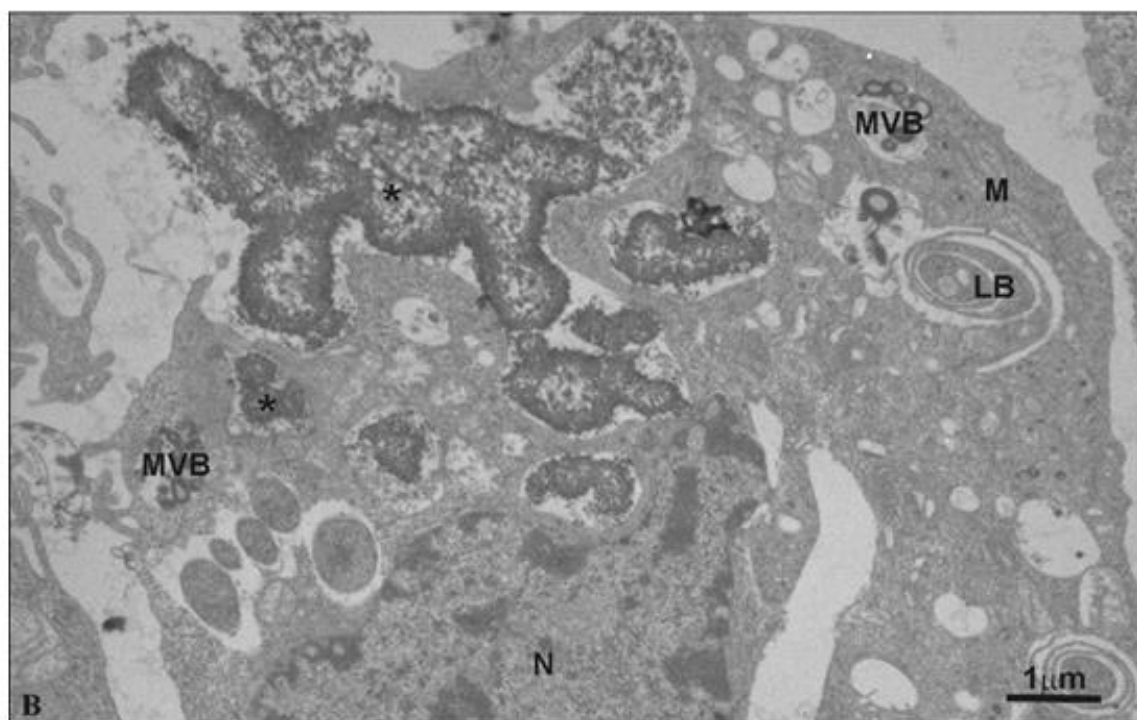
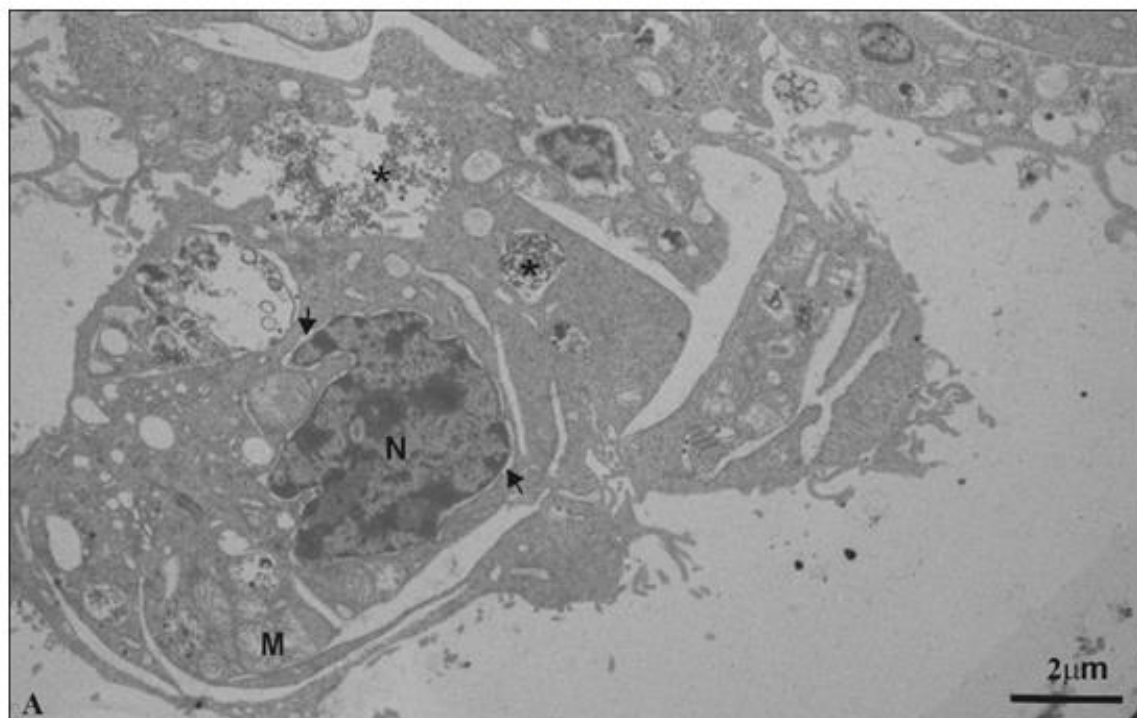
Natomiast ultrastruktura komórek inkubowanych w obecności SMT2 została znacząco zmieniona (Ryc. 37A, B). W jądrach komórkowych zaobserwowano marginalizację i kondensację chromatyny, oddzielenie i rozwarstwienie otoczki jądrowej od chromatyny. Dodatkowo, w komórkach pojawiły się liczne struktury wielopęcherzykowe i lamelarne oraz liczne wtórne lizosomy (Ryc. 37A). Ponadto, mitochondria były spuchnięte i posiadały zdeorganizowane grzebienie mitochondrialne (Ryc. 37A, B).

Dodatkowo, prawdopodobnie obserwowano proces endocytozy dla komórek inkubowanych zarówno pierwszą jak i drugą generacją dendrymerów SMT (Ryc. 36F, 37B). Jednakże istniała znacząca różnica w ilości poddawanych endocytozie dendrymerów w zależności od ich generacji. Na podstawie zdjęć można przypuszczać, że dendrymery SMT1 były pobierane jako pojedyncze nanocząstki (Ryc. 36F\*), podczas gdy dendrymery SMT2 były pobierane w postaci dużych agregatów (Ryc. 37B\*).



Ryc. 36. Ultrastruktura komórek N2a po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1. A, B, C - kontrola; D, E, F, G – dendrymer SMT1 w stężeniu 5 μM. N - jądro, Nu - jąderko, M - mitochondria, MVB - wielopęcherzykowe ciała, GA - aparat Golgiego, ER - retikulum endoplazmatyczne, Mi - mikrocosmki, SL - wtórne lizosomy, \* - ziarnisty materiał elektronowo gęsty.

## SMT2



Ryc. 37. Ultrastruktura komórek N2a po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT2 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  (A, B). N - jądro, M - mitochondria, MVB - wielopęcherzykowe ciała, LB - ciała lamellarne,  $\uparrow$  - oddzielenie blaszki jądrowej od chromatyny, \* - ziarnisty materiał elektronowo gęsty.

### 8.3. Dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe jako nanoosińniki siRNA

Ze wzgłędu na fakt, iż rodzina Bcl-2 obejmuje zarówno geny odpowiedzialne za śmierć komórek, takie jak bax, bcl-xS, bad, bak i bik, jak i te, które pełnią funkcję ochronną, takie jak bcl-2, bcl-xL i mcl-1, a antyapoptotyczni członkowie tej rodziny często ulegają nadekspresji w ludzkich nowotworach (w tym w białaczkach i chłoniakach) i mogą pośredniczyć w oporności na chemioterapię oraz promieniowanie, to właśnie spośród tej rodziny zdecydowano się wybrać sekwencje docelowe dla antyapoptotycznego siRNA. Stąd wybrano trzy rodzaje siRNA tj. siBcl-2, siBcl-xl oraz siMcl-1, których zadaniem było selektywne wyciszenie genów, a w konsekwencji indukcja apoptozy (Merry i Korsmeyer, 1997; Akar i wsp., 2008; Takahashi i wsp., 2013; Dzitruk i wsp., 2015 ).

W celu określenia czy dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe mogą być potencjalnymi nośnikami dla antyapoptotycznego siRNA, w pierwszym etapie zastosowano szereg metod biofizycznych w celu analizy tworzenia kompleksów pomiędzy dendrymerami SMT a siRNA.

Ze wzgłędu na fakt, iż wszystkie z wybranych siRNA posiadają sekwencję składającą się z 21 par zasad oraz ten sam ładunek, a otrzymane eksperymentalnie wyniki nie wykazały istotnych statystycznie różnic, zdecydowano się na przedstawienie wyników dotyczących tylko jednego siRNA dla każdej z metod biofizycznych.

Do oceny wpływu dendrypleksów złożonych z antyapoptotycznego siRNA oraz SMT na komórki wybrano linię komórek ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej – HL-60.

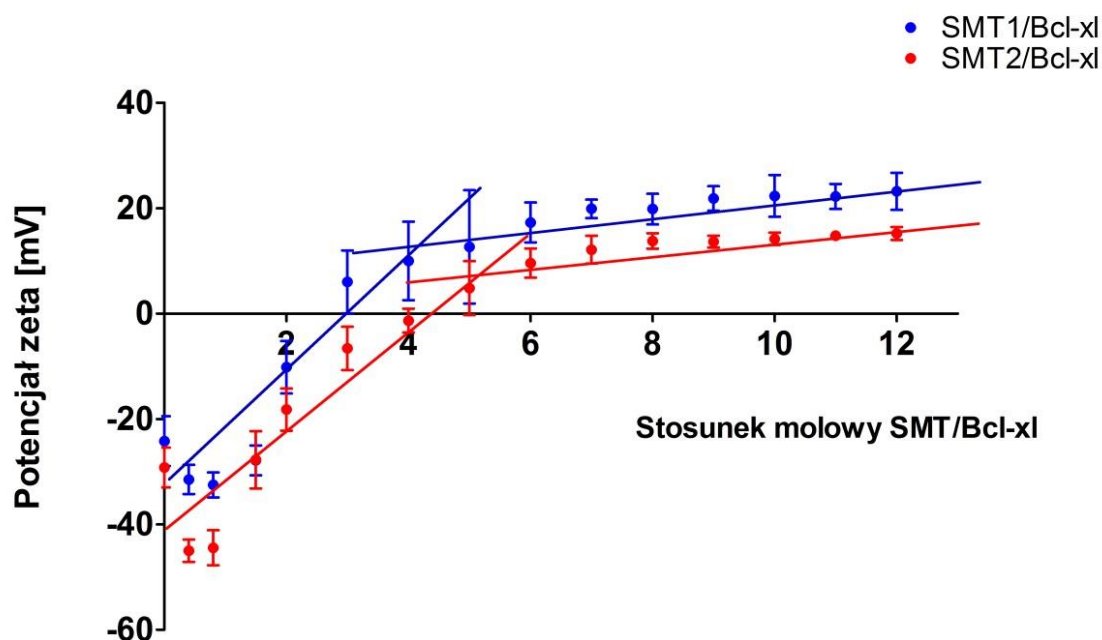
Dane literaturowe wskazują na nadekspresję Bcl-2 w komórkach macierzystych białaczki, a także na przedłużenie życia u myszy z ostrą białaczką szpikową w przypadku inhibicji Bcl-2. Dodatkowo, komórki HL-60 wykorzystywane były jako model do oceny zdolności dendrymerów do portu genów, w tym siRNA (Creixell i Peppas, 2012; Dzitruk i wsp., 2015; Lagadinou i wsp., 2013). Wydaje się zatem, że komórki te mogą stanowić idealny model do oceny dendrymerów hybrydowych SMT jako nośników siRNA.

Aby sprawdzić, czy badany układ dendrymer/antyapoptotyczne siRNA nie jest toksyczny dla komórek prawidłowych, wykorzystano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) wyizolowane z krwi.



### 8.3.1. Potencjał zeta

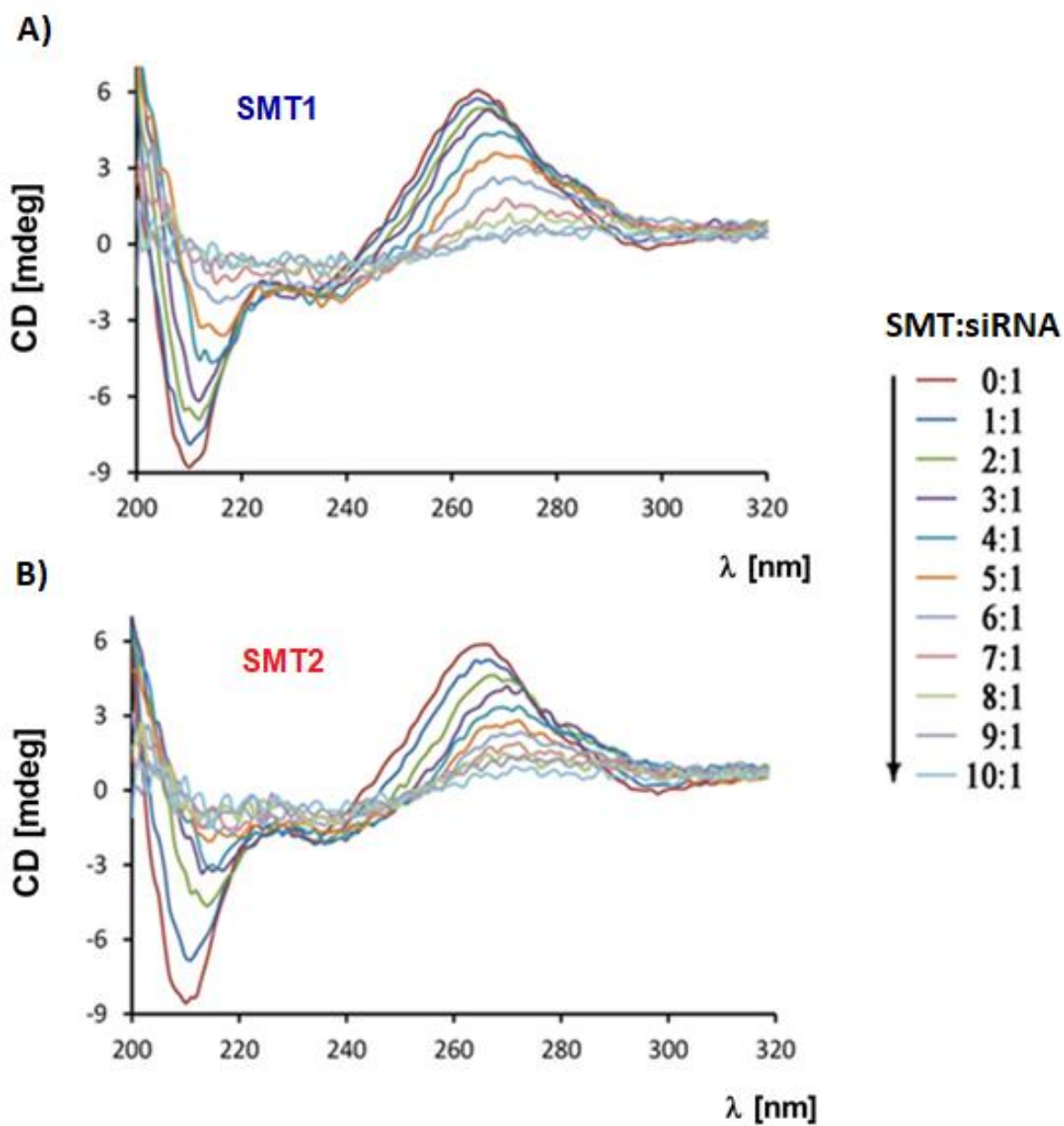
Pomiar potencjału zeta wykorzystano w celu oceny ładunku powierzchniowego kompleksów oraz oddziaływań zachodzących pomiędzy dendrymerami a siRNA. W przypadku potencjału zeta przedstawione wyniki dotyczą siBcl-xl. Stężenie siBcl-xl stosowane do pomiarów było utrzymywane na stałym poziomie  $0,5 \mu\text{M}$ , podczas gdy dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe dodawano w rosnących stężeniach, do stosunku molowego 12:1 (SMT:siRNA). siBcl-xl wykazywał ujemną wartość potencjału zeta równą  $-29,2 \pm 4,7 \text{ mV}$ . Dendrymery hybrydowe obu generacji zmieniły wartość potencjału zeta siBcl-xl z ujemnej na dodatnią. Dla SMT1 wartość ta wzrosła do  $18,2 \pm 3,5 \text{ mV}$ , podczas gdy dla SMT2 do  $15,2 \pm 1,2 \text{ mV}$  dla stosunku molowego 12:1 (Ryc. 38). Analiza potencjału zeta w funkcji stosunku molowego dendrymer/siRNA, pozwoliła określić ile cząsteczek dendrymeru może się związać z siRNA. Liczba cząsteczek dendrymeru generacji pierwszej przypadających na jedną cząsteczkę siRNA wynosiła 5,5 (SMT1:siBcl-xl), natomiast dla SMT2 wyniosła 4,4.



Ryc. 38. Zmiany potencjału zeta siRNA (siBcl-xl) ( $C = 0,5 \mu\text{M}$ ) pod wpływem dendrymerów SMT1 i SMT2. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n \geq 3$ .

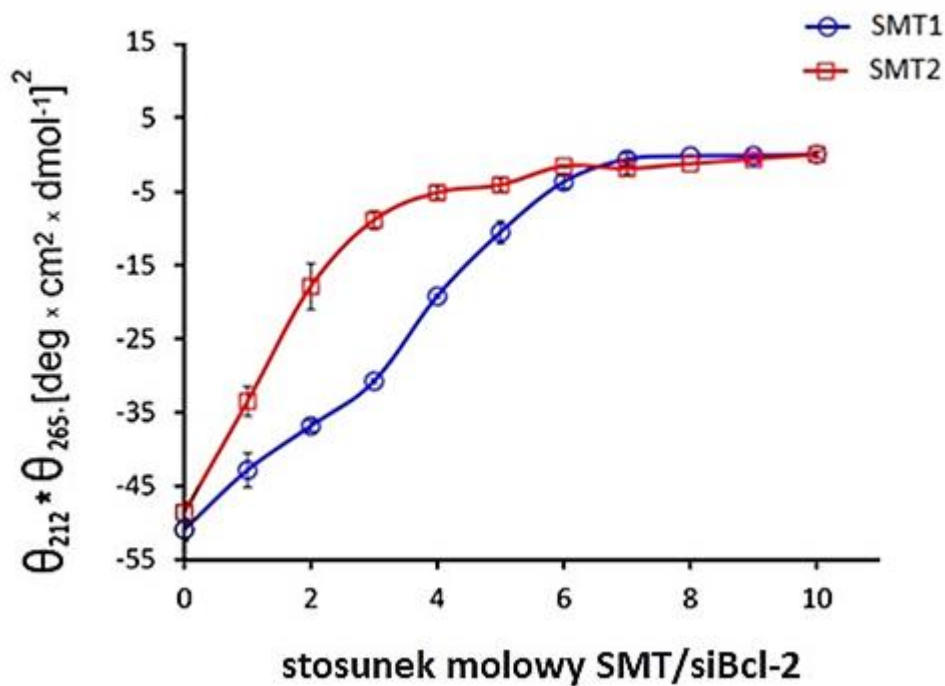
### 8.3.2. Zmiana struktury drugorzędowej siRNA

W pracy przeprowadzono również badania dotyczące określenia zmian struktury drugorzędowej siRNA (siBcl-2) pod wpływem dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z zastosowaniem techniki dichroizmu kołowego. Widma CD rejestrowano w zakresie długości fali  $\lambda = 200 - 320$  nm. Wyniki przedstawiono na Rycinie 39. Intensywność sygnału malała pod wpływem dendrymerów w minimum ( $\lambda = 212$  nm) oraz maksimum ( $\lambda = 265$ ). Zmiany eliptyczności molowej siRNA siBcl-2, obliczone jako iloczyn maksymalnych wartości eliptyczności przy  $\lambda = 212$  nm oraz  $\lambda = 265$  nm ( $\Theta_{212} \times \Theta_{265}$ ) zostały przedstawione na Rycinie 40. Zmiany eliptyczności molowej dla siBcl-2 zależały od stężenia dendrymerów i wskazywały na tworzenie kompleksów pomiędzy siRNA i dendrymerami. Wraz ze wzrostem stężenia dendrymerów dochodziło do wzrostu eliptyczności molowej aż do osiągnięcia plateau. Wynika stąd, że cząsteczki dendrymeru SMT1 oraz SMT2 stopniowo wiążą się z siRNA, aż do momentu wysycenia cząsteczki siRNA (osiągnięcia plateau) w stosunku molowym 6:1 (SMT1:siRNA) i 3:1 (SMT2:siRNA) (Ryc. 40).



Ryc. 39. Widma CD siBcl-2 ( $C = 1 \mu\text{M}$ ) w obecności dendrymeru SMT1 (A) oraz dendrymeru SMT2 (B) w rosnącym stosunku molowym.  $n \geq 3$ .



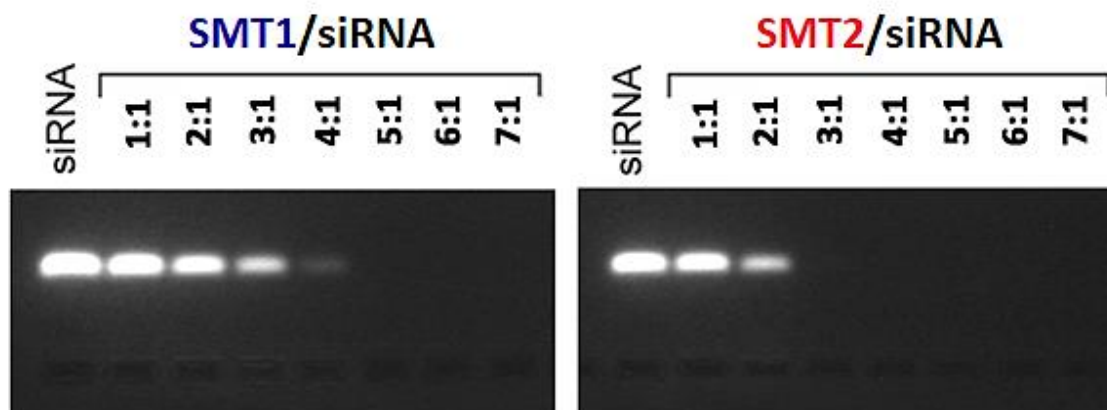


Ryc. 40. Zależność eliptyczności molowej siBcl-2 ( $C = 1 \mu\text{M}$ ) obliczonej jako iloczyn maksymalnych wartości eliptyczności przy  $\lambda = 212 \text{ nm}$  i  $\lambda = 265 \text{ nm}$  od stosunku molowego SMT/siBcl-2. Wyniki przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n \geq 3$ .

### 8.3.3. Elektroforeza żelowa

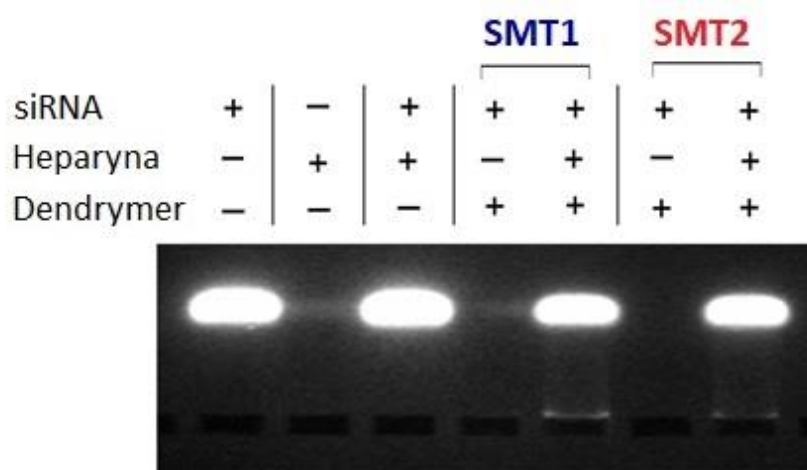
Analiza tworzenia kompleksów SMT/siRNA możliwa była dzięki wizualizacji elektroforegramów siRNA znakowanego fluoresceiną bez i w obecności dendrymerów SMT generacji pierwszej i drugiej. Elektroforegramy siBcl-2 skompleksowanego z dendrymerami SMT1 oraz SMT2 zostały przedstawione na Rycinie 41. Dendrypleksy zostały przygotowane zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 7.2.6.

Otrzymane wyniki wskazują, że dendrymer SMT1 jest zdolny utworzyć kompleks z siRNA w stosunku 5:1 (SMT1:siRNA), podczas gdy SMT2 w stosunku molowym 3:1 (SMT2:siRNA). Wynika to ze stopniowego wygaszenia fluorescencji pochodzącej od nieskompleksowanego siRNA. Dendrymery tworząc kompleksy z siRNA powodują zmniejszenie się ilości nieskompleksowanego siRNA, aż do pełnego wysycenia, a więc również całkowitego wygaszenia fluorescencji.



Ryc. 41. Analiza tworzenia kompleksów dendrymer/siRNA. Dendrymery skompleksowano z siRNA (siBcl-2) znakowanym fluoresceiną. Kompleksy analizowano z wykorzystaniem elektroforezy na 3% żelu agarozowym. Pierwsza ścieżka pokazuje migrację nieskompleksowanego siRNA.

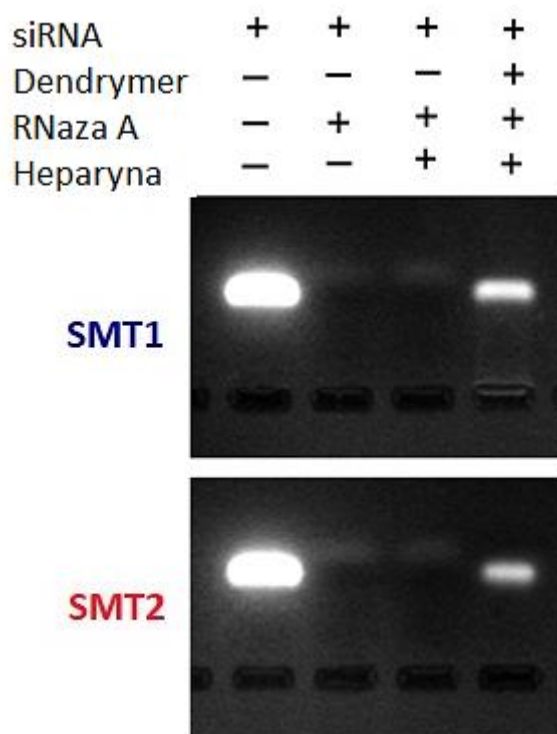
Dysocjacja dendrypleksów z uwolnieniem kwasów nukleinowych może zachodzić albo spontanicznie podczas pęcznienia dendrymeru (Shakya i wsp., 2016), albo poprzez konkurencyjne wiązanie z polianionami, w tym m.in. heparyną (Szewczyk i wsp., 2012). W celu oceny, czy siRNA może zostać uwolnione z kompleksów z dendrymerami SMT przeprowadzono analizę z wykorzystaniem heparyny oraz elektroforezy żelowej. Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno w przypadku dendrymerów generacji pierwszej jak i drugiej, dodanie heparyny powoduje uwolnienie siRNA z kompleksu (Ryc. 42).



Ryc. 42. Uwalnianie siRNA (siBcl-2) z dendrypleksów przez dodanie heparyny. Pierwsza ścieżka pokazuje migrację nieskompleksowanego siRNA. Druga ścieżka to migracja heparyny. Trzecia ścieżka pokazuje migrację siRNA w obecności heparyny (0,164 mg/ml). Kolejne ścieżki to migracja siRNA z powodu jej uwolnienia z kompleksów po dodaniu heparyny w stężeniu 0,164 mg/ml.

Dodatkowo, aby sprawdzić, czy dendrymery hybrydowe SMT wykazują również efekt ochronny w stosunku do siRNA, przed degradacją przez RNazę, została zastosowana ta sama technika. Elektroforeza w 3% żelu agarozowym znakowanego fluoresceiną siBcl-2 wykazała, że nieskompleksowane siRNA zostało całkowicie strawione w obecności RNazy A (Ryc. 43, druga ścieżka). Aby sprawdzić, czy dendrymery posiadają zdolność ochrony siRNA przed degradacją, dendrypleksy inkubowano w obecności RNazy A.

Po inkubacji z RNazą A, dodawano heparynę w celu uwolnienia siRNA z kompleksu i nakładano na żel agarozowy. Wizualizacja elektroforegramów wykazała, że inkubacja dendrypleksów z RNazą A nie prowadzi do całkowitej degradacji siRNA (Ryc. 43, czwarta ścieżka).



Ryc. 43. Ocena właściwości ochronnych dendrymerów SMT przed działaniem RNazy A w stosunku do siRNA (siBcl-2). Górny panel – SMT1, dolny panel – SMT2. Ścieżka pierwsza – migracja nieskompleksowanego siRNA. Ścieżka druga – migracja siRNA wcześniej inkubowanego z RNazą A. Trzecia ścieżka – migracja siRNA uprzednio inkubowanego z RNazą A w obecności heparyny (0,164 mg/ml). Czwarta ścieżka – migracja siRNA uwolnionego z dendrypleksów inkubowanych w obecności RNazy A.

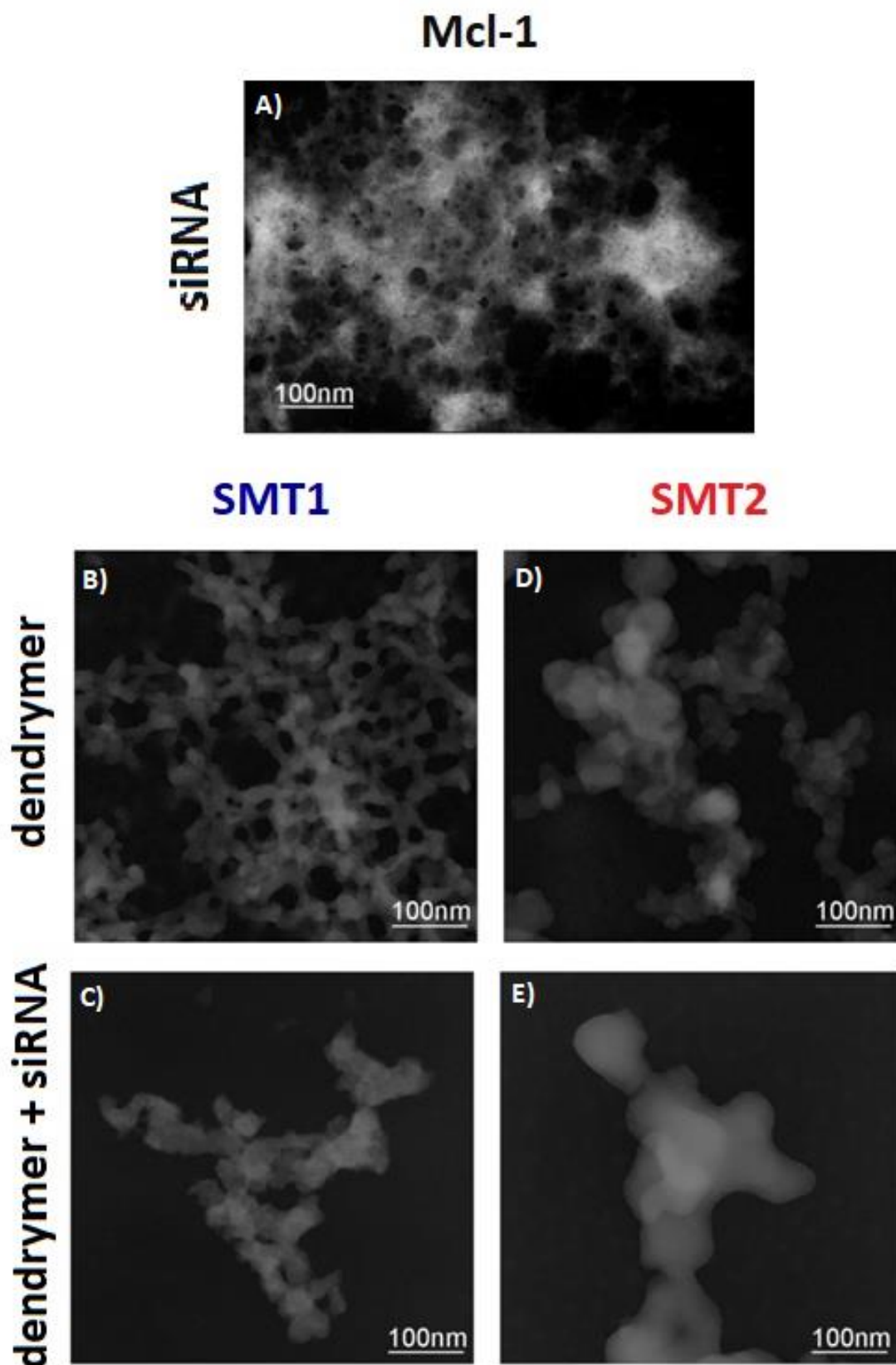
#### 8.3.4. Wizualizacja kompleksów dendrymerów SMT z siRNA

Kolejnym etapem badania oddziaływań dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z siRNA była ocena zmian zachodzących w strukturze dendrymerów oraz kompleksów utworzonych pomiędzy dendrymerami i siRNA. Oceny dokonano z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Jako, że wyniki uprzednio dokonanej analizy nie wskazywały na istotne statystycznie różnice w sposobie oddziaływania dendrymerów generacji pierwszej i drugiej z siBcl-2, siBcl-xl oraz siMcl-1, na Ryc. 44 przedstawiono jedynie zdjęcia dendrypleksów utworzonych z siMcl-1.

Na fotografii z transmisyjnego mikroskopu elektronowego obrazującej siMcl-1 zaobserwowano fibrylarną strukturę charakterystyczną dla siRNA (Ryc. 44A). Dendrymer SMT1 widoczny był jako posklejane globularne struktury o wielkości około 10 nm (Ryc. 44B), natomiast dendrymer SMT2 przybierał nieregularne formy o wielkości do 40 nm (Ryc. 44D).

Z kolei po 30 min inkubacji siRNA i dendrymerów obserwowano agregaty o wielkości około 100 nm dla dendrypleksów tworzonych przez SMT1 (Ryc. 44C) i 400 nm dla dendrypleksów tworzonych przez SMT2 (Ryc. 44E).

Z uzyskanych wyników można wnioskować, iż doszło do utworzenia kompleksów pomiędzy dendrymerami karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowymi SMT, a siRNA.



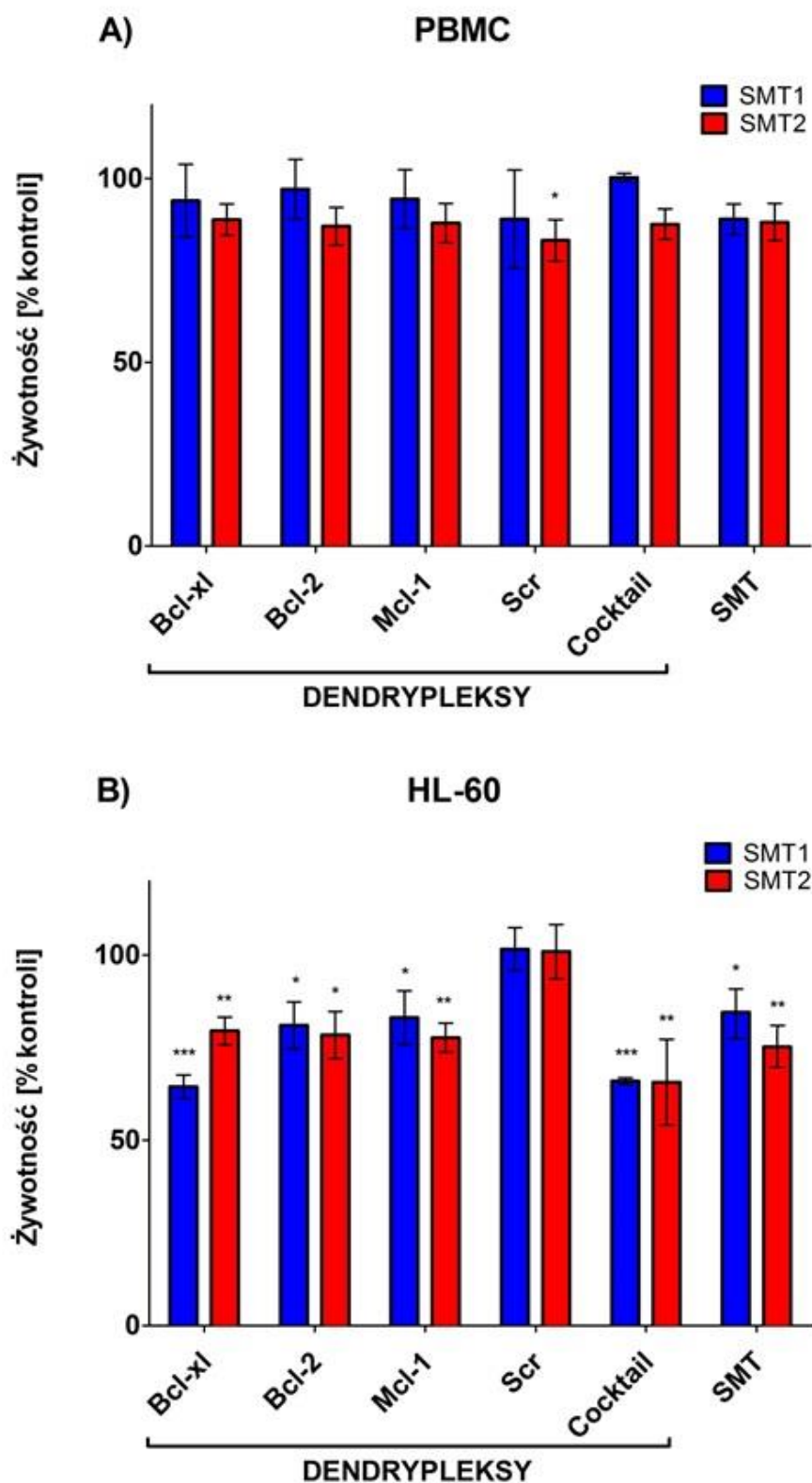
Ryc. 44. Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego siMcl-1 (A), dendrymerów SMT1 oraz SMT2 (B, D) oraz dendrypleksów SMT/siMcl-1 (C, E). Skala = 100 nm.

### 8.3.5. Cytotoksyczność dendrypleksów wobec komórek zawieszonych

Kolejnym etapem, po analizie tworzenia dendrypleksów pomiędzy dendrymerami SMT, a siRNA, była ocena ich cytotoksyczności w stosunku do komórek linii HL-60 oraz do komórek PBMC. Cytotoksyczność została oceniona po 24 godzinnej inkubacji z dendrypleksami z wykorzystaniem testu Alamar Blue (Ryc. 45).

Standardowy test cytotoksyczności Alamar Blue wykazał, że inkubacja z dendrymerami SMT w najwyższym stosowanym stężeniu (1  $\mu\text{M}$ ) nie powoduje żadnych istotnych statystycznie zmian w żywotności komórek PBMC (Ryc. 45A). Natomiast w przypadku linii HL-60, zauważalny był istotny statystycznie, niewielki spadek żywotności komórek do 85% w przypadku dendrymeru SMT1 oraz do 75% w przypadku dendrymeru SMT2. Tak więc, można przyjąć, że dendrymery SMT w użytym do eksperymentu stężeniu (1  $\mu\text{M}$ ) nie są cytotoksyczne w stosunku do komórek linii HL-60 oraz komórek PBMC. Ponadto, potwierdzono, że dendrypleksy złożone z dendrymerów SMT oraz sekwencji „scrambled” (Scr) nie wykazują cytotoksyczności w stosunku do komórek linii HL-60. Jednakże, istotny statystycznie niewielki spadek żywotności do 83% dla kompleksu SMT2/Scr zanotowano dla komórek PBMC.

W przypadku kompleksów dendrymerów SMT z aktywnymi, antyapoptotycznymi siRNA (siBcl-2, siBcl-xl, siMcl-1) oraz z ich mieszaniną (ang. „cocktail”) nie zauważono istotnie statystycznego spadku żywotności komórek PBMC po 24 godzinnej inkubacji (Ryc. 45A.). Natomiast dla linii komórek ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej (HL-60) zanotowano istotny statystycznie spadek w przypadku wszystkich wariantów aktywnych dendrypleksów. Najwyższy spadek żywotności, w porównaniu do kontroli, obserwowano dla kompleksów: SMT1/siBcl-xl (do 64%), SMT1/Cocktail (do 66%) oraz dla SMT2/Cocktail (do 65%) (Ryc. 45B).

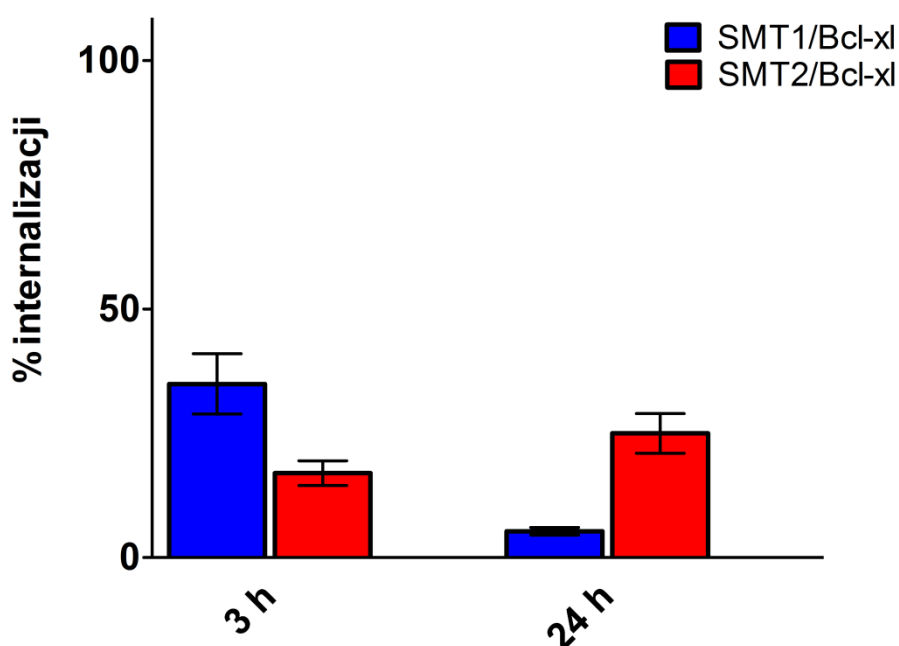


Ryc. 45. Żywotność komórek PBMC (A) oraz HL-60 (B) po 24 godzinnej inkubacji z dendrymerami SMT1 i SMT2 ( $C = 1 \mu\text{M}$ ) oraz dendrypleksami SMT/siRNA ( $C_{\text{siRNA}} = 100 \text{ nM}$ ) w stosunku molowym 10:1, określona za pomocą testu Alamar Blue ( $n = 6$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , kontrola = 100%).



### 8.3.6. Internalizacja dendrypleksów wyznakowanych fluoresceiną do komórek

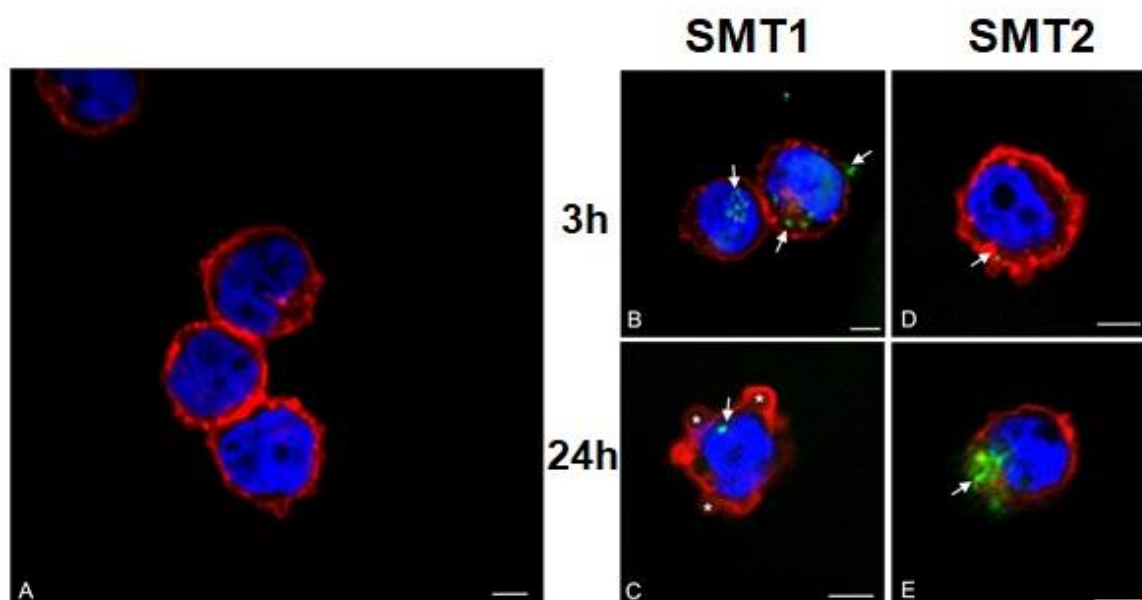
W kolejnym etapie, po ocenie tworzenia się kompleksów oraz cytotoksyczności, badano stopień wnikania dendrypleksów w czasie 3 i 24 godz. do komórek HL-60 (Ryc. 46). Nieskompleksowane, wyznakowane fluoresceiną siRNA nie wnika do komórki, co zostało eksperymentalnie potwierdzone. Ze względu na najwyższą cytotoksyczność, do oceny stopnia wnikania, wybrano kompleks SMT/siBcl-xl w stosunku molowym 10:1 ( $C_{\text{SMT}} = 1 \mu\text{M}$ ,  $C_{\text{siRNA}} = 100 \text{ nM}$ ). W przypadku dendrypleksów z SMT1 po 3 godz. została zaobserwowana internalizacja na poziomie około 35%, jednakże wartość ta spadła do zaledwie 5% po upływie 24 godzin. Przeciwną tendencję zaobserwowano dla dendrypleksów z SMT2, gdzie po 3 godz. internalizacja była na poziomie 17% i była niższa niż po 24 godz. (25%). Jednakże, stopień internalizacji dla kompleksów złożonych z SMT2 był poniżej poziomu osiągniętego przez SMT1/siBcl-xl.



Ryc. 46. Cytometryczna analiza stopnia internalizacji dendrypleksów w komórkach HL-60 w czasie 3 i 24 godz. Znakowany fluoresceiną siBcl-xl został skompleksowany z SMT1 lub SMT2 w stosunku molowym 10:1 ( $C_{\text{SMT}} = 1 \mu\text{M}$ ,  $C_{\text{siRNA}} = 100 \text{ nM}$ ). Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n = 3$ .

### 8.3.7. Analiza morfologiczna oraz wizualizacja wyznakowanych fluoresceiną dendrypleksów w komórkach zawieszinowych

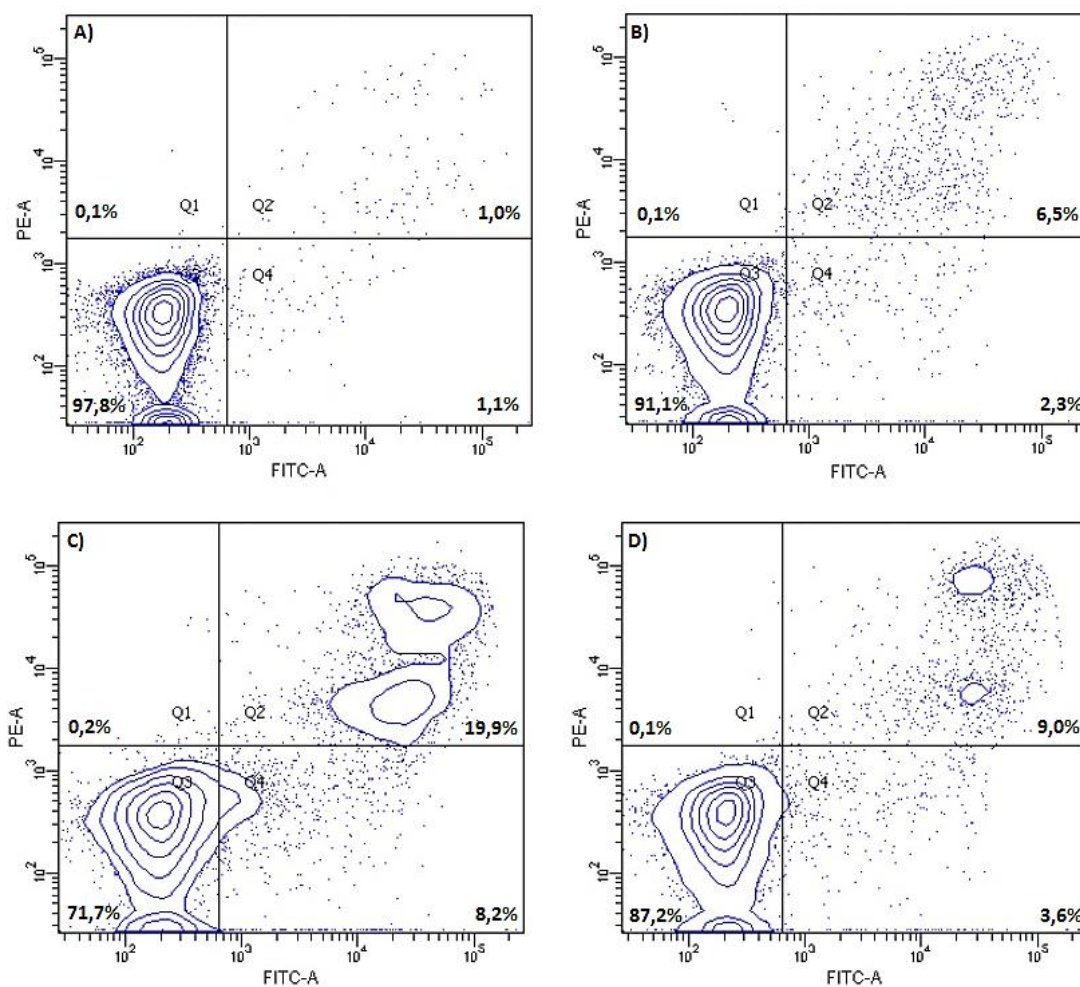
Aby potwierdzić wyniki uzyskane z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej, dokonano analizy morfologii oraz internalizacji dendrypleksów do komórek HL-60 za pomocą mikroskopu konfokalnego. Po 3 i 24 godzinnej inkubacji z dendrypleksami SMT1/siBcl-xl ( $C_{SMT} = 1\mu M$ ,  $C_{siRNA} = 100\text{ nM}$ ) zaobserwowano siRNA we wnętrzu komórek HL-60 (Ryc. 47B, C). Ponadto, po 24 godzinach inkubacji z kompleksami SMT1/siBcl-xl zaobserwowano pojawienie się ciałek apoptotycznych (Ryc. 47C\*). Dane uzyskane dla SMT2/Bcl-xl nie wskazują na obecność zmian apoptotycznych w komórkach HL-60, możemy jednak zaobserwować internalizację siRNA (Ryc. 47D, E).



Ryc. 47. Morfologia komórek HL-60 po 3 i 24 godzinach inkubacji z dendrypleksami SMT/siBcl-xl znakowanym fluoresceiną (zielona fluorescencja), w stosunku molowym 10:1 ( $C_{SMT} = 1\mu M$ ,  $C_{siRNA} = 100\text{ nM}$ ). Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Komórki wybarwiono DAPI (niebieska fluorescencja) oraz falloidyna Texas Red-X (czerwona fluorescencja). Skala = 10  $\mu M$ . A – kontrola; B – SMT1/siBcl-xl 3h; C – SMT1/siBcl-xl 24h; D – SMT2/siBcl-xl 3h; E – SMT2/siBcl-xl 24h.  $\uparrow$  – znakowane fluoresceiną dendrypleksy zlokalizowane wewnątrz komórki, \* – ciałka apoptotyczne.

### 8.3.8. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą podwójnego barwienia aneksyna V/jodek propidyny

Ocena cytotoksyczności za pomocą testu Alamar Blue sugerowała, że niektóre spośród wykorzystanych dendrypleksów, po 24 godzinach inkubacji, powodują spadek żywotności komórek HL-60. Analiza z wykorzystaniem cytometru przepływowego podwójnie barwionych komórek (aneksyną V/jodkiem propidyny) potwierdziła wyniki testu AB tylko dla kompleksów, w których skład wchodziły dendrymery hybrydowe generacji pierwszej (SMT1). Kompleksy z dendrymerami karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowymi drugiej generacji (SMT2) nie powodowały istotnego statystycznie spadku żywotności komórek poza SMT2/Cocktail. Dendrypleksy utworzone z mieszaniny aktywnego siRNA powodowały spadek frakcji żywych komórek do około 48%, przy jednoczesnym wzroście frakcji apoptotycznej do 40%. Istotny statystycznie spadek frakcji komórek żywych odnotowano również dla wszystkich dendrypleksów w przypadku dendrymeru SMT1. Jednakże, największy spadek uzyskano w przypadku SMT1/siBcl-xl (do 67%) oraz SMT1/Cocktail (62%). Jednocześnie, w przypadku tych kompleksów, zauważono istotny statystycznie wzrost frakcji komórek apoptotycznych (SMT1/siBcl-xl – 33%; SMT1/Cocktail – 37%) (Tabela 8).



Ryc. 34. Przykładowe wykresy kropkowe komórek linii HL-60 po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 oraz dendrypleksami SMT/siBcl-xl w stosunku molowym 10:1 ( $C_{\text{SMT}} = 1 \mu\text{M}$ ,  $C_{\text{siRNA}} = 100 \text{ nM}$ ). Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem metody z aneksyną V i jodkiem propidyny (PI) za pomocą cytometru przepływowego. A – kontrola, B – komórki po inkubacji z SMT1, C – komórki po inkubacji z SMT1/Bcl-xl, D – komórki po inkubacji z SMT2/siBcl-xl.

Tabela 8. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych w komórkach linii HL-60 po 24 godz. inkubacji z dendrymerami SMT1 oraz SMT2, a także z dendrypleksami SMT/siRNA w stosunku molowym 10:1 ( $C_{SMT} = 1 \mu M$ ,  $C_{siRNA} = 100 \text{ nM}$ ). Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem metody z aneksyną V i jodkiem propidyny (PI) za pomocą cytometru przepływowego. Otrzymane wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.  $n = 3$ ; \*  $p < 0,05$ ;  $\uparrow/\downarrow$  – istotny statystycznie wzrost/spadek w porównaniu do kontroli.

Komórki	Kontrola	SMT1	SMT2
Żywe	95,4 $\pm$ 4,0	88,4 $\pm$ 1,9	88,6 $\pm$ 3,7
Nekrotyczne	0,1 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,3
Apoptotyczne	4,6 $\pm$ 4,3	11,5 $\pm$ 2,0 $\uparrow^*$	10,1 $\pm$ 4,9 $\uparrow^*$

Komórki	SMT1/Bcl-xl	SMT1/Bcl-2	SMT1/Mcl-1	SMT1/Cocktail
Żywe	67,7 $\pm$ 5,1 $\downarrow^*$	79,7 $\pm$ 9,3 $\downarrow^*$	81,4 $\pm$ 2,2 $\downarrow^*$	62,3 $\pm$ 5,2 $\downarrow^*$
Nekrotyczne	0,3 $\pm$ 0,0	0,16 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
Apoptotyczne	32,6 $\pm$ 4,3 $\uparrow^*$	20,1 $\pm$ 7,3 $\uparrow^*$	18,2 $\pm$ 2,0 $\uparrow^*$	37,6 $\pm$ 2,5 $\uparrow^*$

Komórki	SMT2/Bcl-xl	SMT2/Bcl-2	SMT2/Mcl-1	SMT2/Cocktail
Żywe	88,0 $\pm$ 1,9 $\downarrow^*$	87,0 $\pm$ 6,8	91,0 $\pm$ 6,2	48,3 $\pm$ 2,3 $\downarrow^*$
Nekrotyczne	1,7 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2	12,0 $\pm$ 1,0 $\uparrow^*$
Apoptotyczne	10,0 $\pm$ 2,9 $\uparrow^*$	11,3 $\pm$ 8,1 $\uparrow^*$	7,2 $\pm$ 7,1	39,6 $\pm$ 2,8 $\uparrow^*$

## 9. Dyskusja

### 9.1. Oddziaływania dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z wybranymi białkami enzymatycznymi

Zastosowanie medyczne nanocząstek ściśle zależy od ich właściwości oraz od ich potencjalnej toksyczności. Określenie rozmiaru, kształtu, rodzaju grup powierzchniowych, ładunku oraz innych parametrów fizycznych i chemicznych jest równie ważne jak zrozumienie oddziaływań, jakie zachodzą między nanosystemami, a głównymi układami molekularnymi i biochemicznymi organizmu. Należy podkreślić, że zastosowanie nanocząstek w medycynie związane jest także z ich oddziaływaniem z płynami biologicznymi, a więc również z występującymi w ich składzie białkami. Warto zwrócić uwagę na fakt, że surowica w swoim składzie zawiera co najmniej 2392 (Adkins i wsp., 2002; Shen i wsp., 2005), a płyn mózgowo rdzeniowy 2630 różnych białek (Schutzer i wsp., 2010). Stąd wydaje się, że określenie oddziaływań nanocząstek, w tym konkretnym przypadku dendrymerów, z różnymi typami białek, powinno być pierwszym etapem oceny ich właściwości biologicznych.

Tego typu oddziaływania kationowych, anionowych oraz neutralnych dendrymerów PAMAM na świńską pepsynę zostały opisane przez Ciołkowskiego i wsp., (2013). Wasiak i wsp., (2015) wykazali wpływ kationowych dendrymerów zawierających fosfor na acetylocholinoesterazę. Natomiast Milowska i wsp., (2011, 2012, 2013, 2015) sklasyfikowali różne typy dendrymerów kationowych na podstawie ich oddziaływania z  $\alpha$ -synukleina.

W pierwszej części niniejszej pracy przedstawiono wyniki związane z oddziaływaniem dwóch generacji dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych (SMT) z wybranymi białkami enzymatycznymi, tj. fosfatazą alkaliczną, dehydrogenazą L-mleczanową oraz aminotransferazą asparaginianową.

Białka te zostały wybrane ze względu na fakt, iż są one katalizatorami dla szeregu reakcji metabolicznych oraz uczestniczą w wielu procesach metabolicznych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Fosfataza alkaliczna (AP) należy do grupy hydrolaz i odpowiada za defosforylację szeregu cząsteczek, w środowisku zasadowym. Enzym ten powszechnie występuje u wielu żyjących gatunków, w tym u człowieka.

Fosfataza alkaliczna u dorosłych ludzi częściowo pochodzi z wątroby (frakcja termostabilna), częściowo z kości i układu naczyniowego (frakcja termolabilna). Poziomy APL w surowicy są stosowane, jako markery diagnostyczne przy chorobach takich jak np.: osteomalacja, białaczka, chłoniak, czy choroba Wilsona (Coleman, 1992; Sharma i wsp., 2014, Szwed i wsp., 2016).

Dehydrogenaza L-mleczanowa (LDH) to tetrameryczny enzym złożony z dwóch podjednostek M i H, kodowanych przez geny LDHA i LDHB. Połączenie dwóch podjednostek daje pięć izoform, które są specyficznie rozmieszczone w tkankach (Mirebeau-Prunier i wsp., 2013; Szwed i wsp., 2016). Dehydrogenaza L-mleczanowa katalizuje odwracalną przemianę pirogronianu w mleczan, z utlenieniem NADH do NAD<sup>+</sup>. Wzrost poziomu LDH występuje w chorobach związanych z martwicą tkanek, jak również w fazie ostrej wirusowego zapalenia wątroby. LDH jest enzymem związanym z błoną biologiczną, a jego uwalnianie do środowiska zewnątrzkomórkowego następuje, gdy komórki związane ze stanem zapalnym są uszkodzone. Ze względu na tę właściwość, LDH stosuje się jako wskaźnik stanu zapalnego w infekcjach takich jak: bakteryjne zapalenie opon mózgowych, ropniak, czy zapalenie stawów. Wysoka aktywność LDH może wskazywać na wzrost rozmiaru guza oraz na złe dalsze rokowania (Shahriari i wsp., 2013; Szwed i wsp., 2016; Ede i wsp., 2017).

Aminotransferaza asparaginianowa (AST) jest enzymem należącym do klasy transferaz. Enzym ten katalizuje odwracalną reakcję przenoszenia grupy aminowej z asparaginianu na ketoglutaran. AST występuje w dwóch formach: cytozolowej i mitochondrialnej. AST jest homodimerem występującym głównie w wątrobie i mięśniu sercowym, nie jest natomiast wydzielana bezpośrednio do krwioobiegu. Tak więc, wzrost jej poziomu w osoczu jest wynikiem uszkodzenia miocytów serca lub komórek wątroby (Szwed i wsp. 2016).

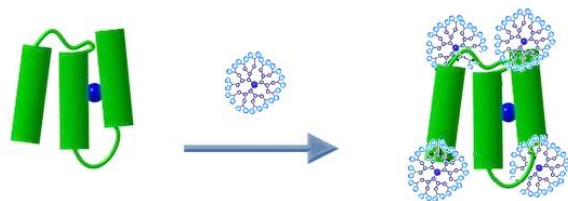
Każdy z trzech enzymów wybranych do analizy charakteryzuje się inną pozycją centrum aktywnego, inną elastycznością struktury oraz różną funkcją w organizmie. Stąd ich oddziaływania z dendrymerami mogą się różnić (Ryc. 49).

Po pierwsze, „korona dendrymerowa” nie ma wpływu na białka o strukturze sztywnej, posiadające centrum aktywne głęboko wewnątrz cząsteczki. Odnośnie struktury drugorzędowej enzymów, wszystkie oddziaływania zachodzą na powierzchni białka i nie mają wpływu na aktywność enzymu.

Po drugie, „korona dendrymerowa” wpływa na strukturę elastycznych białek bez zmiany ich aktywności enzymatycznej, pod warunkiem, że miejsce aktywne jest zlokalizowane głęboko wewnątrz cząsteczki.

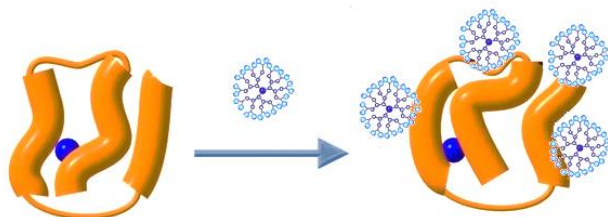
Po trzecie, „korona dendrymerowa” zmienia zarówno strukturę, jak i aktywność enzymatyczną elastycznych białek, posiadających centrum aktywne zlokalizowane na powierzchni (Shcharbin i wsp., 2015).

**1) Struktura sztywna, centrum aktywne zlokalizowane głęboko wewnątrz cząsteczki**



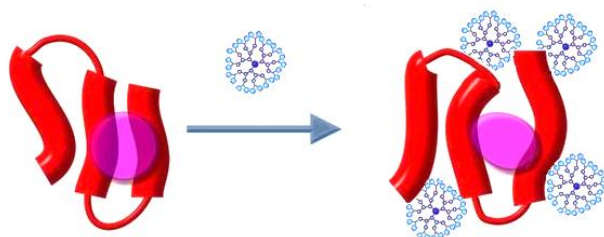
**Brak zmian w:**  
 - strukturze,  
 - konformacji,  
 - aktywności enzymu.

**2) Struktura elastyczna, centrum aktywne zlokalizowane głęboko wewnątrz cząsteczki lub daleko od "miejsca wiązania" dendrymerów**



**Zmiany w:**  
 - strukturze,  
 - konformacji.  
 Nie odpowiadają zmianom w aktywności enzymu.

**3) Struktura elastyczna, centrum aktywne na powierzchni**



**Zmiany w:**  
 - strukturze,  
 - konformacji,  
 - aktywności enzymu.

Ryc. 49. Schematyczne przedstawienie oddziaływań dendrymer-białko w zależności od elastyczności struktury białka oraz miejsca położenia jego centrum aktywnego (Shcharbin i wsp., 2015).



Spośród wybranych białek AST i AP są dimerami, podczas gdy LDH jest enzymem tetramerycznym. AP pochodząca z *E. coli* jest dimerycznym, nieglikozylowanym enzymem hydrolazowym odpowiedzialnym za usuwanie grup fosforanowych z wielu rodzajów cząsteczek, w tym nukleotydów, białek i alkaloidów (Coleman, 1992). AP charakteryzuje się stabilną, sztywną strukturą oraz centrum aktywnym zlokalizowanym głęboko (11Å) wewnątrz cząsteczki. W porównaniu do AP występującej u *E. coli*, ludzkie fosfatazy są bardziej aktywne, jednakże zdecydowanie mniej stabilne (Coleman 1992; Millán 2006; Shcharbin i wsp., 2015).

W odróżnieniu do AP i AST, LDH jest enzymem tetramerycznym złożonym z różnych kombinacji dwóch podjednostek – H i M (Hayashi i wsp., 1990). Enzym ten charakteryzuje się zlokalizowanym głęboko wewnątrz cząsteczki centrum aktywnym (10Å), jednakże w przeciwieństwie do AP posiada strukturę elastyczną. Kolejną charakterystyczną cechą LDH jest obecność w jego strukturze pętli ruchomej (reszty aminokwasowe 95-105) (Pineda i wsp., 2007; Qiu i wsp., 2007; Shcharbin i wsp., 2015).

Podobnie do LDH, aminotransferaza asparaginianowa (AST) posiada stosunkowo elastyczną strukturę, jednakże centrum aktywne białka zlokalizowane jest powierzchniowo, a jego konformacja w obecności substratu jest zamknięta (Kirsch i wsp., 1984; Shcharbin i wsp., 2015).

Wyniki otrzymane dla dendrymerów hybrydowych SMT zdają się potwierdzać te różnice w strukturach wybranych białek enzymatycznych. Jednakże, wyniki otrzymane w tych samych warunkach dla dwóch dendrymerów karbokrzemowych (CBD-CS posiadających gałęzie zbudowane z wiązań węgiel-krzem; CDB-OS posiadających gałęzie zbudowane z wiązań tlen-krzem), przedstawione w pracy Szwed i wsp., (2016), są niejednoznaczne.

Analiza zmian potencjału zeta w funkcji stosunku molowego dendrymer/białko pozwoliła określić ile cząsteczek dendrymeru może związać się z wybranym białkiem enzymatycznym. Na podstawie tej analizy wyliczono, że liczba dendrymerów wchodzących w oddziaływanie z cząsteczką białka była zależna od natury białek, a także od rodzaju i generacji dendrymeru (Tabela 3).

Badając zmiany natężenia fluorescencji, w tym przypadku tryptofanu, można wnioskować o oddziaływaniu dendrymer-białko. Wyniki otrzymane z pomiarów spektrofluorymetrycznych wskazują, że dendrymery SMT obu generacji silnie gaszą fluorescencję tryptofanu w białkach AP, AST oraz LDH.

Jednakże, wpływ dendrymerów był różny w zależności od rodzaju białka. Dendrymery SMT obu generacji gasiły fluorescencję fosfatazy alkalicznej w stosunku molowym 25:1. Spadek fluorescencji tryptofanu do przyjętego poziomu poniżej 20% wartości początkowej w przypadku AST zachodziło w stosunku molowym: SMT1:AST – 10:1, SMT2:AST – 5:1, a dla LDH: SMT:LDH – 10:1. Ten nieznacznie słabszy efekt w przypadku fosfatazy alkalicznej może wynikać ze sztywności jej struktury. W przeciwieństwie do dendrymerów SMT, dendrymery karbokrzemowe powodowały gaszenie fluorescencji poniżej 70% jedynie dla LDH w stosunku molowym 50:1 (Szwed i wsp., 2016).

Pomiary fluorescencji wskazują, że dendrymery mogą wpływać na reszty tryptofanu (Trp) znajdujące się w miejscach dostępnych dla dendrymerów, czyli tych blisko powierzchni białka lub też reszt Trp znajdujących w miejscach sąsiadujących z miejscem oddziaływania dendrymerów. Ponadto zależność  $F/F_0$  w funkcji stężenia wygaszacza jest linią prostą tylko wtedy, gdy w jednorodnym układzie fluoroforów zachodzi wyłącznie gaszenie dynamiczne. Jednakże w przypadku białek mamy do czynienia z obecnością kilku reszt tryptofanowych, a więc więcej niż jednego fluoroforu. Stąd w przypadku badanych białek w obecności dendrymerów SMT wykresy zależności  $F/F_0$  od stosunku molowego SMT/Białko nie jest linią prostą, a gaszenie zachodzi prawdopodobnie zarówno na drodze gaszenia dynamicznego jak i statycznego (Lakowicz, 2006).

Wyniki otrzymane metodą spektrofluorymetryczną zostały potwierdzone przez pomiary CD. Badanie zmian struktury drugorzędowej białek enzymatycznych metodą dichroizmu kołowego wykazało, że dendrymery hybrydowe obu generacji istotnie wpływają na strukturę wszystkich trzech białek. Jednakże, wpływ dendrymerów SMT na strukturę drugorzędową AP był mniejszy w porównaniu z AST i LDH. Ponadto, zaobserwowano większe zmiany struktury drugorzędowej pod wpływem dendrymerów generacji pierwszej niż drugiej (Ryc. 23, 24, 25).

Wyniki otrzymane przez Shcharbina i wsp., (2015) dotyczące dendrymerów PAMAM generacji trzeciej i czwartej oraz przez Ionova i wsp., (2016) dla kationowych dendrymerów fosforowych (CPD) generacji trzeciej i czwartej, nieznacznie różnią się od wyników otrzymanych dla dendrymerów hybrydowych.

Wpływ dendrymerów SMT na fluorescencję reszt Trp białek AST i LDH był większy niż dendrymerów PAMAM, jednak zbliżony do kationowych dendrymerów fosforowych (CPD). Natomiast dendrymery karbokrzemowe gasiły fluorescencję w mniejszym stopniu niż dendrymery PAMAM oraz dendrymery fosforowe (Shcharbin i wsp., 2015; Szwed i wsp., 2016; Ionov i wsp., 2016).

Dzięki wynikom powyższych eksperymentów, można uszeregować dendrymery w kolejności w zależności od ich wpływu na strukturę AP. Białko to ma najniższą reaktywność ze względu na sztywność struktury. Liczba cząsteczek dendrymerów, która była potrzebna do wywołania istotnych statystycznie zmian w strukturze AP, rosnąco, przedstawia się następująco: CBD-OS/CBD-CS, PAMAM G3/PAMAM G4, SMT2, SMT1, CPD G4/CPD G3.

Zarówno pomiar potencjału zeta, jak i obrazowanie TEM potwierdziło tworzenie się kompleksów dendrymerów SMT z białkami. Różnice w morfologii kompleksów pomiędzy dendrymerami SMT (Ryc. 26) oraz dendrymerami karbokrzemowymi (TEM – białka + dendrymery karbokrzemowe, Ryc. 9, Szwed i wsp., 2016) widoczne są na zdjęciach z transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Elektronogramy kompleksów złożonych z dendrymerów SMT1 z białkami wykazują podobieństwo do kompleksów utworzonych z wykorzystaniem dendrymerów CPD G4 (Ionov i wsp., 2016). Natomiast kompleksy z CBD-CS swoją morfologią są zbliżone do kompleksów z PAMAM G4 (Shcharbin i wsp., 2015; Szwed i wsp., 2016).

Należy podkreślić, że nie tylko właściwości oraz struktura białek będą miały znaczenie w kontekście tworzenia kompleksów z dendrymerami. Na charakter kompleksów wpływać będzie też struktura i ładunek dendrymerów.

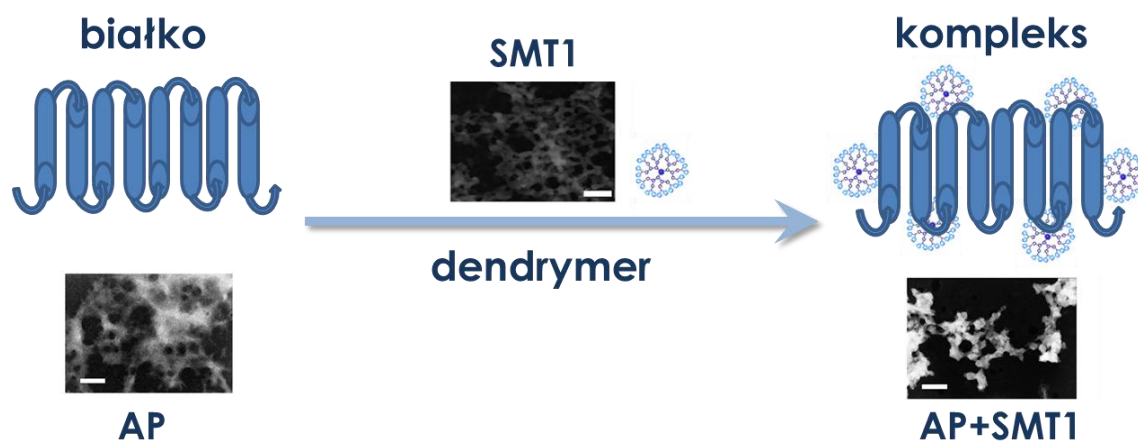
W przypadku dendrymerów hybrydowych SMT1 oraz SMT2, sztywna wewnętrzna struktura posiada dodatni ładunek, pochodzący od czwartorzędowych grup wiologenowych (+12). Natomiast elastyczność cząsteczki dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych jest związana z grupami powierzchniowymi i rośnie wraz z generacją dendrymeru (ładunek powierzchniowy +12 dla SMT1 i +24 dla SMT2). W przeciwieństwie do dendrymerów hybrydowych, dendrymery karbokrzemowe posiadają tylko ładunek na swojej powierzchni (+16), a cała ich struktura jest elastyczna (Szwed i wsp., 2016).

Ponieważ oddziaływania pomiędzy białkami i dendrymerami są głównie elektrostatyczne, im większy ładunek dodatni na powierzchni dendrymeru, tym wyższa powinna być efektywność tworzenia kompleksu z posiadającymi negatywny ładunek białkami. Jednakże, okazało się, że nie ma bezpośredniego związku pomiędzy oddziaływaniami dendrymeru z białkiem, a jego ładunkiem powierzchniowym. Nie można jednak zaprzeczyć, że ładunek jest czynnikiem ważnym. Jednakże, elastyczność struktury nanocząstki jest również istotna (Tomalia i wsp., 2012; Nowacka i wsp., 2016).

Bardziej elastyczne nanosystemy mogą umożliwić lepszą regulację oddziaływań z białkami. Może być zatem potrzebna mniejsza liczba cząsteczek dendrymeru do wiązania pojedynczej cząsteczki niż wynika to z pomiarów potencjału zeta. Analiza wyników otrzymanych z wykorzystaniem różnych technik wskazuje na istnienie silnych oddziaływań pomiędzy wybranymi białkami enzymatycznymi, a dendrymerami hybrydowymi. Może to wynikać z obecności dużej liczby ładunków dodatnich, w tym tych obecnych wewnątrz cząsteczki dendrymeru. Jednakże, wpływ hybrydowych dendrymerów na struktury białek AP, AST i LDH jest porównywalny lub nawet nieznacznie niższy dla dendrymeru generacji drugiej - SMT2. W przypadku wyższych generacji dendrymerów, rdzeń oraz gałęzie stają się coraz bardziej osłonięte przed otoczeniem, poprzez zwiększenie gęstości powierzchniowej. W związku z tym, zmniejszać się będzie dostępność wewnętrznych ładunków dodatnich. Taka sytuacja może mieć miejsce w przypadku oddziaływań z dendrymerem SMT2.

Podsumowując, dodatnio naładowane dendrymery hybrydowe mogą oddziaływać z ujemnie naładowanymi białkami, tworząc kompleksy (Ryc. 50). Przestrzenna struktura dendrymeru jest równie ważna, jak struktura białka w procesie tworzenia kompleksów.

Wyniki otrzymane w tej części pracy są istotne w kontekście analizy właściwości dendrymerów SMT oraz ich ewentualnego zastosowania w medycynie.



Ryc. 50. Schematyczne podsumowanie tworzenia kompleksów pomiędzy białkami enzymatycznymi, a dendrymerami SMT.

## 9.2. Wpływ dendrymerów hybrydowych na mysie komórki nerwowe linii N2a i mHippoE-18

W poprzednim etapie pracy szczególnie podkreślano, że zastosowanie nanocząstek w medycynie związane jest także z ich oddziaływaniami z płynami biologicznymi, a więc również z występującymi w ich składzie białkami. Nanostruktury, w tym dendrymery, pojawiające się w płynach biologicznych wywołują złożone reakcje biologiczne i natychmiast są pokrywane białkami, tworząc tak zwaną „koronę białkową” (Cedervall i wsp., 2007). Dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe, będące przedmiotem tej pracy, zostały już poddane ocenie w kontekście ich oddziaływań z białkami enzymatycznymi, a także pod względem ich cytotoksyczności w stosunku do linii komórek chomika chińskiego B14 (Moreno i wsp., 2015; Szwed i wsp., 2016; Shcharbin i wsp., 2017b).

W celu określenia wpływu dwóch generacji dendrymerów hybrydowych SMT na komórki nerwowe, na podstawie analizy wybranych parametrów odpowiedzi komórkowej, wybrano dwie mysie linie komórek: komórki nerwiaka płodowego (neuroblastoma) N2a oraz embrionalne komórki hipokampalne mHippoE-18. Linia komórkowa N2a stanowiła model do badania potencjalnych efektów toksycznych akumulacji nanocząstek tlenku miedzi w mózgu, jak i do badania neurotoksyczności, czy choroby Alzheimer (Provost, 2010; Salto i wsp., 2015). Ponadto, była ona również wykorzystywana jako model w badaniach dotyczących ochronnego działania dendrymerów w infekcjach prionowych oraz toksyczności związanej z powstawaniem  $\beta$ -amyloidu. Mysią linię nienowotworową immortalizowaną stanowiły embrionalne komórki hipokampalne mHippoE-18. Linia ta stanowi odpowiedni model do opracowywania środków terapeutycznych, ukierunkowanych na choroby i zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego. Co ważne, badania z wykorzystaniem linii komórkowej mHippoE-18 wydają się szczególnie atrakcyjne z punktu widzenia możliwości zastosowania dendrymerów jako leków przeciw-amyloidowych, ponieważ uszkodzenie hipokampu jest związane zarówno z chorobą Alzheimer, jak i chorobą Parkinsona (Lazniewska i wsp., 2013a; Lazniewska i wsp., 2013b).

Celem tego etapu pracy było sprawdzenie, czy dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe (SMT) generacji pierwszej i drugiej mogą być potencjalnymi nośnikami leków lub lekami *per se*, w zaburzeniach związanych z OUN.

Stopień cytotoksyczności dendrymerów hybrydowych wobec mysich linii komórek nerwowych (N2a oraz mHippoE-18) został określony na podstawie analizy wybranych parametrów odpowiedzi komórkowej, w tym: aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych (test MTT), generowania reaktywnych form tlenu (sonda H<sub>2</sub>DCFDA), zmian w potencjale błony mitochondrialnej (sonda JC-1), zmian morfologicznych (barwienie DAPI i falloidyna Texas Red-X) oraz frakcji komórek apoptotycznych i martwych (podwójne barwienie Ann-V/PI i OA/BE).

Komórki hodowano w obecności płodowej surowicy bydlęcej (FBS). Zarros i wsp., (2015) zasugerowali, że eksperymenty na linii komórkowej mHippoE-18 hodowanej bez FBS są lepszym sposobem oceny neurotoksyczności. Rzeczywiście, FBS wpływa na biodostępność dendrymeru, a także stymuluje proliferację komórek. Dlatego też, zdecydowano się zmniejszyć ilość FBS z początkowych 10% do 5%. W związku z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych, z których tylko jedna powinna reprezentować nieproliferacyjną populację neuronów (mHippoE-18), nie zdecydowano się na całkowite wyłączenie płodowej surowicy bydlęcej z medium hodowlanego, a jedynie na zmniejszenie jej ilości o połowę. Navya i Daima (2016) wykazali również, że nowosyntetyzowane oraz projektowane nanocząstki, zgodnie z ich dynamicznymi właściwościami fizykochemicznymi i powierzchniowymi, mogą wchodzić w szereg oddziaływań z jednostkami biologicznymi. Tak więc, wydaje się, że procesy zachodzące *in vivo* są tak złożone i wielowymiarowe, że nie ma potrzeby upraszczania ich w badaniach *in vitro*, poprzez całkowite wyłączenie FBS z medium hodowlanego. Ponadto, Janaszewska i wsp., (2015) w swojej pracy wykazali, że całkowite wyłączenie FBS z medium hodowlanego przed inkubacją komórek mHippoE-18 z modyfikowanymi dendrymerami PAMAM, nie powodowało istotnych statystycznie różnic, w porównaniu do wyników otrzymanych z użyciem FBS.

Pierwszym etapem analizy był pomiar cytotoksyczności dendrymerów SMT1 i SMT2 w stosunku do wybranych mysich linii komórkowych. W pracy Moreno i wsp., (2015) zostały już opublikowane wyniki z cytotoksyczności dendrymerów SMT w stosunku do fibroblastów chomika chińskiego

(linia komórek B14). Komórki linii B14 wykazywały większą wrażliwość na dendrymery SMT2, a więc pierwsza generacja dendrymerów SMT1 była mniej toksyczna dla komórek B14. Wartość CC50 dla B14 po 24 godzinach inkubacji z dendrymerami SMT1  $> 10 \mu\text{M}$ , podczas gdy dla SMT2  $\approx 1 \mu\text{M}$  (Moreno i wsp., 2015). W przypadku mysich komórek nerwowych, dendrymer SMT2 powodował istotny statystycznie, zależny od stężenia, spadek ich żywotności zarówno w stosunku do linii N2a (CC50  $\approx 3,0 \mu\text{M}$ ), jak i mHippoE-18 (CC50  $\approx 3,5 \mu\text{M}$ ). Natomiast dendrymer SMT1 w najwyższym użytym stężeniu ( $10 \mu\text{M}$ ), po 24 godzinnej inkubacji, był tylko nieznacznie toksyczny dla obu linii. Interesujący wydaje się fakt, że wydłużenie czasu inkubacji dla dendrymeru SMT1 do 48 godzin, spowodowało zależny od stężenia wzrost toksyczności tych dendrymerów tylko w stosunku do linii nowotworowej N2a. Różnica pomiędzy toksycznością po 24 a 48 godzinach inkubacji z SMT1 w stężeniach  $5 \mu\text{M}$  i  $10 \mu\text{M}$ , dla komórek N2a była statystycznie istotna, a CC50  $\approx 14,3 \mu\text{M}$ . Natomiast nie zaobserwowano takiego efektu dla linii komórkowej mHippoE-18.

Według danych literaturowych, istnieje silna korelacja pomiędzy toksycznością, a wewnątrzkomórkową produkcją RFT Naha i wsp., 2010; (Mukherjee i Byrne 2013; Khalid i wsp., 2016). Taką zależność stwierdzono w przypadku dendrymerów PAMAM oraz kationowych dendrymerów fosforowych (CPD), które to powodowały wzrost wewnątrzkomórkowych RFT, którego konsekwencją był istotny spadek żywotności komórek N2a (Lazniewska i wsp., 2013b).

W przeciwieństwie do dendrymerów CPD, dendrymery wiologenowo-fosforowe (VPD) nie powodowały silnej odpowiedzi komórkowej i tylko w niewielkim stopniu indukowały proces apoptozy. Co ciekawe, inkubacja komórek mHippoE-18 z VPD doprowadziła do niewielkiego spadku poziomu RFT w porównaniu z komórkami nietraktowanymi, co korelowało z nieznacznie zwiększoną aktywnością katalazy. Wynik ten wskazuje, że VPD mogą pośrednio obniżyć poziom RFT w komórkach (Lazniewska i wsp., 2013c).

Natomiast dendrymery karbokrzemowe nie powodują istotnych statystycznie zmian w wewnątrzkomórkowym poziomie RFT w komórkach mHippoE-18 (Milowska i wsp., 2015).

Dane literaturowe wskazują, że w przypadku dendrymerów PAMAM, wzrost RFT jest dwufazowy. Pierwsza faza wzrostu jest przypisywana aktywnemu wychytowi dendrymerów PAMAM przez klatrynozależną



endocytozę (Kitchens i wsp., 2008; Khalid i wsp., 2016). Druga faza związana jest z uszkodzeniem mitochondriów, w których to lokalizują się dendrymery PAMAM (Naha i wsp., 2010; Khalid i wsp., 2016).

Wyniki otrzymane z wykorzystaniem dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych wskazują, że dendrymery SMT1 i SMT2, w zakresie stężeń 0,1 – 10  $\mu\text{M}$  (SMT1) oraz 0,1 – 1  $\mu\text{M}$  (SMT2), po 24 godzinnej inkubacji, nie powodują istotnych statystycznie zmian w poziomie reaktywnych form tlenu, zarówno w komórkach N2a, jak i mHippoE-18. Jedynie dendrymer SMT2, w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ , w przypadku komórek mHippoE-18 powodował niewielki, istotny statystycznie spadek w poziomie RFT do około 80% w porównaniu do kontroli nietraktowanej. Wizualizacja komórek N2a i mHippoE-18 z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego potwierdziła wyniki uzyskane za pomocą czytnika mikropłytek (Ryc. 29).

Po otrzymaniu wyników z użyciem sondy H<sub>2</sub>DCFDA dotyczących zmian w poziomie reaktywnych form tlenu w komórkach pod wpływem dendrymerów SMT, nie spodziewano się istotnych zmian w błonowym potencjale mitochondrialnych. Uzyskane wyniki potwierdziły nasze przypuszczenia w przypadku dendrymeru SMT2 dla linii N2a oraz mHippoE-18, a także dla dendrymeru SMT1 w stosunku do linii mHippoE-18. Jednakże, po 24 godzinnej inkubacji z SMT1 wystąpiło zależne od stężenia zwiększenie potencjału błonowego mitochondriów w komórkach neuroblastomy N2a. Jak już wspomniano, dendrymery karbokrzemowe nie wpływają na mitochondria (Milowska i wsp., 2015). Jednakże, dendrymery VPD zaburzały  $\Psi_m$  w komórkach mHippoE-18, podczas gdy aktywność mitochondrialna pozostała niezmienną lub nieznacznie spadła w przypadku komórek N2a (Lazniewska i wsp., 2013c).

Zmiany – zwykle spadek potencjału błonowego mitochondrium  $\Psi_m$ , czyli depolaryzacja – wydają się być związane z uszkodzeniem mitochondriów, które prowadzi do śmierci komórki. Wspomniana wcześniej depolaryzacja błony mitochondrialnej, jako przyczyna śmierci komórki na drodze apoptozy, pojawia się w literaturze częściej, jednakże, nie można tutaj pominąć efektu hiperpolaryzacji błony mitochondrialnej, który też wiąże się z zaburzeniami mitochondriów oraz śmiercią komórki (Sánchez-Alcázar i wsp., 2000; Giovannini i wsp., 2002;).

Analiza wyników dotyczących wpływu dendrymerów SMT na wybrane parametry odpowiedzi komórkowej dwóch mysich linii komórkowych wykazała, że dendrymery SMT1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  nie wpływają na komórki mHippoE-18, przy jednoczesnym generowaniu zmian w komórkach N2a. Dendrymer SMT2 wykazywał znaczną toksycyżność w stosunku do obu linii komórkowych, przy jednoczesnym braku wpływu na ilość RFT, generowanych w komórkach oraz  $\Psi\text{m}$  po 24 godz. inkubacji. Dlatego też, zdecydowano się na ocenę poziomu reaktywnych form tlenu, błonowego potencjału mitochondrialnego oraz żywołności komórek mHippoE-18 (Tabela 4) i N2a (Tabela 5) pod wpływem dendrymeru SMT1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  w czasie 0,5 – 48 godzin. Komórki N2a po 30 min inkubacji z dendrymerem SMT1, wykazywały znaczący wzrost RFT (do około 120%) i  $\Delta\Psi\text{m}$  (do około 170%). W punkcie końcowym, czyli po 48 godzinach inkubacji, zaobserwowano znaczny spadek obu parametrów do ~ 80% wartości kontrolnej. Wyniki te odpowiadają wynikom otrzymanym z pomiarów cytotożsycyżności, a więc utracie żywołności komórek N2a aż do 58% po 48 godz. inkubacji. W przypadku komórek mHippoE-18 nie zaobserwowano znaczących zmian w czasie dla wybranych parametrów.

Na podstawie powyższych informacji można wysunąć wniosek, iż dendrymer generacji pierwszej (SMT1) posiada potencjał, aby być dalej analizowanym pod kątem jego wykorzystania jako leku, czy też nośnika dla leku.

Analiza morfologii komórek linii mHippoE-18 po 24 godzinnej inkubacji z dendrymerami SMT1 w zakresie stężeń od 0,1  $\mu\text{M}$  do 10  $\mu\text{M}$ , nie wykazała zmian. W przeciwieństwie do tego, po inkubacji komórek N2a z SMT1 w stężeniach 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ , komórki uległy zwiększeniu. Ponadto, zaobserwowano dezorganizację cytoszkieletu, pojawienie się dodatkowych wypustek cytoplazmatycznych oraz niewielką kondensację chromatyny. Inkubacja komórek linii N2a oraz mHippoE-18 z dendrymerami SMT2 w stężeniu do 1  $\mu\text{M}$  nie powodowała zmian w morfologii ani w przypadku komórek mHippoE-18, ani w przypadku komórek N2a. Natomiast w przypadku dendrymeru SMT2 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ , w obu liniach zauważono wzrost wielkości komórek, dezorganizację cytoszkieletu, pojawienie się dodatkowych wypustek cytoplazmatycznych oraz niewielką kondensację chromatyny.

Podobnie wyniki wyglądały w przypadku analizy ultrastruktury komórek N2a przy użyciu TEM. Ultrastruktura komórek inkubowanych z dendrymerami SMT1 (5  $\mu$ M) została nieznacznie zmieniona. W komórkach pojawiły się struktury wielopęcherzykowe, a matrix mitochondrialna była rozrzedzona. Ponadto, inkubacja komórek linii N2a z dendrymerami generacji pierwszej spowodowała utworzenie lizosomów wtórnych z widocznym granularnym elektronowogęstym materiałem, czyli w tym przypadku dendrymerem generacji pierwszej (SMT1). Natomiast ultrastruktura komórek inkubowanych z SMT2 została znacząco zmieniona. W jądrach komórkowych zaobserwowano marginalizację i kondensację chromatyny oraz oddzielenie otoczki jądrowej od chromatyny. Dodatkowo, w komórkach pojawiły się liczne struktury wielopęcherzykowe i lamelarne oraz liczne wtórne lizosomy, a mitochondria były spuchnięte i posiadały zdeorganizowane grzebienie mitochondrialne. Podobny efekt został wcześniej zaobserwowany po inkubacji komórek MCF-7 z kamptotecyną CPT6 (ang. [(camptothecin-20(s)-O-(2-pyrazul-1) acetic ester)] (Chu i wsp., 2014) i komórek HepG2 PAMAM/apoptyną (Bae i wsp., 2013). Zmiany kondensacji chromatyny i jej fragmentacja mogą być wczesnym objawem apoptozy (Toné i wsp., 2007; Dasgupta i wsp., 2017) lub bezpośredniego oddziaływania kationowych dendrymerów hybrydowych z ujemnie naładowanym DNA (Parimi i wsp., 2010; Lazniewska i wsp., 2013b). Lazniewska i wsp., (2013a,b,c) wykazali, że komórki N2a oraz komórki mHippoE-18 eksponowane na działanie dendrymerów wiologenowo-fosforowych (VPD) utrzymują prawidłową morfologię, podczas gdy ekspozycja na kationowe dendrymery fosforowe (CPD) zaburzała morfologię obu linii komórkowych.

Wyniki powyżej opisanych metod nie wskazują na rodzaj śmierci komórkowej, którą powodują dendrymery hybrydowe SMT w przypadku komórek mHippoE-18 oraz N2a. Dlatego też, zdecydowano się na określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych z wykorzystaniem dwóch metod opartych na podwójnym barwieniu. Należy jednak zaznaczyć, iż metoda oparta na identyfikacji komórek apoptotycznych na podstawie stopnia kondensacji lub fragmentacji chromatyny może zostać oceniona jako subiektywna. Dlatego też, wyniki otrzymane z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego na podstawie próbek wybarwionych AO/EB zostały potwierdzone analizą próbek wybarwionych Ann-V i PI z wykorzystaniem cytometru przepływowego.

Analiza komórek wybarwionych AO/EB oraz analiza próbek wybarwionych aneksyną-V/PI potwierdziła wyższą toksyczność dendrymeru generacji drugiej – SMT2. Otrzymane wyniki pokazują, że SMT2 prawdopodobnie aktywuje szlak apoptotyczny. Poprzednio opisane zmiany w funkcji mitochondriów, żywotności komórek, a także zmiany w morfologii po inkubacji komórek N2a z dendrymerem SMT1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  są zgodne z wynikami otrzymanymi metodą podwójnego barwienia. Otrzymane wyniki potwierdzają nieco wyższą toksyczność dendrymeru SMT1 w stosunku do komórek N2a niż mHippoE-18, a wielkość frakcji apoptotycznej pozwala wysunąć hipotezę, że mechanizm działania dendrymerów hybrydowych SMT polega na indukcji apoptozy. Hipoteza ta powinna jednak zostać potwierdzona.

W przeciwieństwie do VPD, dendrymery hybrydowe posiadają ładunek dodatni zarówno na powierzchni cząstki, jak i w jej wnętrzu (Lazniewska i wsp., 2013a). W przypadku dendrymerów hybrydowych SMT1 oraz SMT2, sztywna wewnętrzna struktura posiada dodatni ładunek pochodzący od czwartorzędowych grup wiologenowych (+12) oraz ładunek powierzchniowy +12 dla SMT1 i +24 dla SMT2. Natomiast ich elastyczność jest związana z grupami powierzchniowymi i rośnie wraz z generacją dendrymeru (Moreno i wsp., 2015; Szwed i wsp., 2016). W związku z tym, mogą one oddziaływać z błonami plazmatycznymi, co wyjaśnia obecność licznych struktur wielopęcherzykowych i lamelarnych oraz licznych wtórnych lizosomów, a także zmian w ultrastrukturze mitochondriów w komórkach poddanych działaniu dendrymerów SMT (Ryc. 36, 37).

Otrzymane wyniki wskazują, że obie generacje dendrymerów SMT są zdolne do internalizacji komórek. Według danych literaturowych, dendrymery mogą wchodzić do komórki za pośrednictwem klatrynozależnej endocytozy i/lub makropinocytozy (Kitchens i wsp., 2008; Albertazzi i wsp., 2010, 2012; Ionov i wsp., 2012; Bae i wsp., 2013). Solarska-Ściuk i wsp., (2014) wykazali obecność nanocząstek diamentowych w pęcherzykach endocytarnych w liniach komórkowych Huvec-ST i A549. Wyniki otrzymane w trakcie wykonywania tej pracy pokazują, że dendrymer SMT1 jest prawdopodobnie wychwytywany w procesie endocytozy w postaci pojedynczych nanocząstek. Natomiast cząsteczki dendrymeru SMT2, które mogą ze sobą silnie oddziaływać ze względu na obecność większej liczby ładunków dodatnich, mogą wchodzić do komórek w postaci dużych agregatów prawdopodobnie na drodze makropinocytozy.

Jednakże, aby szczegółowo określić mechanizm internalizacji dendrymerów do komórki, należy przeprowadzić dodatkowe eksperymenty.

Ponadto, obecność ładunku kationowego na powierzchni dendrymerów, wpływa na ich zdolność oddziaływania z anionowymi błonami biologicznymi, oraz tworzenia w nich „nanootworów”, co może prowadzić do śmierci komórki (Lazniewska i wsp., 2013a). Ultrastruktura komórek N2a inkubowanych w obecności dendrymeru SMT2 została znacząco zmieniona, co wskazuje na utratę integralności błony, a to w konsekwencji może przyczynić się do zmniejszenia żywotności komórek.

Większa toksyczność dendrymeru SMT2 jest prawdopodobnie związana z obecnością większego dodatniego ładunku na powierzchni jego cząsteczki (Moreno i wsp., 2015). Dlatego też, to nie dendrymer generacji drugiej, a SMT1 wydaje się mieć potencjał jako nanonośnik lub lek w zaburzeniach związanych z OUN. Jednakże, aby dendrymer SMT1 został zaakceptowany, jako związek o niskiej toksyczności dla komórek nienowotworowych, należy przeprowadzić dodatkowe badania. Należy również zbadać jego potencjał, jako leku w terapii nowotworów układu nerwowego.

### 9.3. Dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe jako nanonośniki siRNA

W ostatnim czasie duże zainteresowanie wzbudza możliwość wykorzystania mechanizmu interferencji RNA jako potencjalnego narzędzia w terapii genowej (Dulak, 2009). Doniesienia literaturowe pozwalają sądzić, iż terapia genowa może być obiecującym rozwiązaniem w terapii nowotworów, ze względu na połączenie wysokiej skuteczności oraz minimalizację skutków ubocznych. W celu selektywnego wyciszania genów mały interferujący RNA (siRNA) musi być dostarczony do komórki w nienaruszonej formie. Brak bezpiecznego i skutecznego nośnika dostarczającego geny utrudnia lub nawet uniemożliwia stosowanie terapii genowej, w tym przypadku opartej na interferencji RNA, w leczeniu nowotworów (Zhou i wsp., 2017). Stąd uwaga naukowców skupia się głównie na toksyczności, skuteczności i selektywności układu dostarczania siRNA (Dzmitruk i wsp., 2015). Udowodniono, że wektory wirusowe są wysoce cytotoksyczne, immunogenne, a także rakotwórcze. Dlatego też, naukowcy dokładają wszelkich starań, aby zbadać potencjalne zastosowanie niewirusowych wektorów genowych, takich jak polimery kationowe, czy cząsteczki oparte na lipidach (Ionov i wsp., 2015; Dzmitruk i wsp., 2015; Zhou i wsp., 2017).

Spośród tych niewirusowych wektorów, nośniki oparte na dendrymerach cieszą się dużym zainteresowaniem, jako potencjalne systemy dostarczania kwasu nukleinowego. Kilka charakterystycznych właściwości dendrymerów sprawia, że mają one przewagę nad innymi polimerami kationowymi.

Po pierwsze, duża gęstość ładunku kationowego zapewnia wiele miejsc wiązania dla cząsteczek kwasu nukleinowego. Chen i wsp., (2000) postulowali, że duża gęstość ładunków kationowych w dendrymerach odgrywa ważną rolę we wspomaganie tworzenia kompleksów z cząsteczkami DNA. W przypadku dendrymerów poliamidoaminowych wyższych generacji, duża wydajność transferu genów związana będzie z trwałością kompleksów, jakie tworzą one z DNA. Właściwość ta związana jest z obecnością na ich powierzchni dużego dodatniego ładunku, ich sferycznym kształtem, a także posiadaniem średnicy zbliżonej do średnicy histonów (Klajnert i Przygodzki, 2003).

Po drugie, ochrona kwasu nukleinowego przed nukleazą jest jedną z głównych kwestii związanych z efektywnym dostarczaniem kwasu nukleinowego. Kilka zespołów niezależnie wykazało, że kompleksowanie

cząsteczek kwasu nukleinowego z dendrymerami chroni jego cząsteczki przed degradacją enzymatyczną (Bielinska i wsp., 1996; Bielinska i wsp., 1997; Tang i Szoka 1997).

Po trzecie, obecność amin w strukturach dendrymerów ułatwia endosomalne uwolnienie cząsteczek kwasu nukleinowego poprzez efekt tzw. „gąbki protonowej” (Behr, 1997; Sonawane i wsp., 2003). Należy tu zwrócić uwagę na fakt, iż powierzchnia błony komórkowej, a więc również endosomu posiada ładunek ujemny, który wynika z obecności w ich strukturze lipidów, glikolipidów, czy białek. Stąd, obecność dużej ilości ładunków dodatnich ułatwiać będzie oddziaływanie dendrypleksów z tymi strukturami. Ponadto, uważa się, że obecność drugo- i trzeciorzędowych nieuprotynowanych amin w strukturach dendrymeru ma wpływ na zdolność uwalniania kwasu nukleinowego z kompleksu. Dzieje się tak, gdy aminy ulegają uprotynowaniu, co powoduje osmotyczne zwiększenie objętości cząsteczek. Efekt ten zakłóca membranę endosomu, ułatwiając uwalnianie cząsteczek kwasu nukleinowego. Dodatkowo, zdolność dendrymerów do buforowania kwaśnego środowiska endosomu (pH 5 – 6) prawdopodobnie wpływa pozytywnie na ochronę kwasów nukleinowych przed degradacją (Behr, 1997; Sonawane i wsp., 2003; Klajnert i Przygodzki, 2003; Mendes i wsp., 2017).

Po czwarte, struktura dendrymerów może podlegać modyfikacjom grupami funkcyjnymi, co kolejno daje nam możliwość dostarczania kwasu nukleinowego do docelowej lokalizacji.

Te wszystkie, wymienione powyżej cechy wpływają na fakt, że dendrymery są lepsze od tradycyjnych polimerów liniowych, pod względem właściwości biologicznych i chemicznych oraz możliwości ich stosowania, jako nośników dla kwasów nukleinowych w terapii genowej nowotworów (Mendes i wsp., 2017).

W przypadku procesu transfekcji dendrymerów sugerowano wyższą wydajność tego procesu dla dendrymerów częściowo zdegradowanych. Wynika to z faktu, że możliwość dopasowania cząsteczki dendrymeru do DNA, RNA oraz białek powierzchniowych komórki jest utrudniona w przypadku dendrymerów wyższych generacji ze względu na dużą gęstość grup powierzchniowych. Zdegradowane dendrymery, w których 17 – 33% gałęzi jest „przyciętych”, wykazują większą elastyczność w warstwach powierzchniowych i dzięki temu łatwiej asocjują z DNA, czy białkami zaangażowanymi w proces endocytozy (Shah i wsp., 2000).

W tym kontekście ciekawym rozwiązaniem wydają się być dendrymery hybrydowe SMT1 oraz SMT2, posiadające poza ładunkiem powierzchniowym również ładunek wewnętrzny. Sztywna wewnętrzna struktura tych dendrymerów posiada dodatni ładunek pochodzący od czwartorzędowych grup wiologenowych. Natomiast ich elastyczność związana jest z grupami powierzchniowymi i rośnie wraz z generacją dendrymeru. Wydaje się więc, że dendrymery SMT powinny łatwiej asocjować z kwasami nukleinowymi, czy też białkami zaangażowanymi w proces endocytozy.

Terapia genowa w leczeniu nowotworów ma tak duże znaczenie ze względu na fakt, iż to właśnie w przypadku nowotworów, nieprawidłowe wzorce ekspresji genów związane ze zwiększoną proliferacją, przetrwaniem oraz inwazją komórek, prowadzą do ich przerostu i powstawania mas nowotworowych. W normalnych warunkach wszelkie informacje o uszkodzeniu komórkowego DNA prowadzą do zatrzymania cyklu komórkowego i jeśli zakres uszkodzenia przekracza możliwości naprawy, do programowanej śmierci komórki, takiej jak apoptoza. W związku z tym bardzo ważna jest równowaga pomiędzy sygnałami pro- i anty-apoptotycznymi, która zapobiega rozwojowi nowotworów. Tutaj ważną rolę odgrywa rodzina Bcl-2 obejmująca zarówno geny odpowiedzialne za śmierć komórek, takie jak bax, bcl-xS, bad, bak i bik, jak i te, które pełnią funkcję ochronną, takie jak bcl-2, bcl-xL i mcl-1, a antyapoptotyczni członkowie tej rodziny często ulegają nadekspresji w ludzkich nowotworach (w tym w białaczkach i chłoniakach) i mogą pośredniczyć w oporności na chemioterapię i promieniowanie. To właśnie spośród tej rodziny zdecydowano się wybrać sekwencje docelowe dla antyapoptotycznego siRNA, tj. siBcl-2, siBcl-xl oraz siMcl-1, których zadaniem było selektywne wyciszenie genów, a w konsekwencji indukcja apoptozy w komórkach ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej (HL-60) (Merry i Korsmeyer, 1997; Akar i wsp., 2008; Takahashi i wsp., 2013; Dzmitruk i wsp., 2015).

Badania na kompleksach zawierających antyapoptotyczne siRNA z rodziny Bcl-2 zostały już przeprowadzone z wykorzystaniem dendrymerów PAMAM generacji trzeciej i czwartej, kationowych dendrymerów fosforowych generacji trzeciej i czwartej, dendrymerów karbokrzemowych generacji drugiej – CBD-OS i CBD-CS oraz dendrymerów zawierających ruten. Wszystkie wymienione powyżej grupy dendrymerów są w stanie tworzyć stabilne kompleksy z siRNA (Ionov i wsp., 2015; Dzmitruk i wsp., 2015; Michlewska i wsp., 2018).



Jak wskazuje Dzmitruk i wsp., (2015), wybrane antyapoptotyczne siRNA (szczególnie w formie „cocktail”) skompleksowane z kationowymi dendrymerami fosforowymi oraz dendrymerami PAMAM są internalizowane do komórek i są zdolne do indukcji w tych komórkach apoptozy.

Dendrymery SMT podobnie jak PAMAM i fosforowe są zdolne do tworzenia kompleksów z wybranymi siRNA, a także do ich internalizacji do komórek. Przy czym, wyższy poziom wchłaniania wykazują dendrypleksy, w których skład wchodzi dendrymer generacji pierwszej SMT1. Dendrymery PAMAM tworzyły kompleksy z siRNA w stosunku molowym 2:1, kationowe dendrymery fosforowe w stosunku 3,5:1, dendrymery karbokrzemowe natomiast w stosunku 8:1. W przypadku hybrydowych dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych stosunek molowy, w którym były one zdolne tworzyć kompleksy z siRNA, zależał od ich generacji.

Analiza potencjału zeta w funkcji stosunku molowego dendrymer/siRNA, pozwoliła określić liczbę cząstek dendrymeru, która może związać się z siRNA. W przypadku SMT1, liczba cząsteczek dendrymeru przypadających na jedną cząsteczkę siRNA wynosiła 5,5, natomiast dla dendrymeru SMT2 – 4,4.

Dane uzyskane metodą dichroizmu kołowego wskazują, że do utworzenia kompleksu potrzebnych jest sześć cząsteczek SMT1 oraz trzy cząsteczki SMT2. Wyniki zostały dodatkowo potwierdzone z wykorzystaniem elektroforezy żelowej. Analiza tworzenia kompleksów SMT/siRNA wykazała, że dendrymer SMT1 zdolny jest tworzyć kompleksy w stosunku 5:1, podczas gdy SMT2 w stosunku 3:1. Dodatkowo, wizualizacja elektroforegramów po inkubacji z RNazą A wykazała, że nie dochodzi do degradacji siRNA znajdującego się w kompleksie z dendrymerem SMT.

Zdjęcia wykonane z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wskazują, że kompleksy utworzone z wykorzystaniem dendrymerów SMT, posiadają różny kształt oraz wielkość w zależności od generacji dendrymerów.

Tak więc, analiza tworzenia kompleksów SMT/siRNA wykazała nie tylko, że dendrymery SMT są w stanie tworzyć stabilne kompleksy z wybranymi siRNA, ale także wykazują efekt ochronny w stosunku do siRNA, przed degradacją przez RNazę.

Ponieważ wykazano, że dendrymery są wysoce wydajnymi nośnikami kwasów nukleinowych i krótkich oligodeoksynukleotydów, wiele technik przeniesiono do badania dendrypleksów. Nanocząsteczki te mogą przyłączać jak i enkapsulować siRNA, a tym samym chronić jego cząsteczki przed degradacją i promować wychwyt komórkowy poprzez endocytozę. Preferowane są nanocząsteczki o wielkości zbliżonej do 100 nm. Dzieje się tak, ponieważ, podczas endocytozy klatrynozależnej wytwarzane są pęcherzyki o średnicy około 100 nm. Tego typu endocytoza jest odpowiedzialna za wychwyt wielu makrocząsteczek ze środowiska pozakomórkowego. Po internalizacji, kompleks nośnik/siRNA zostaje uwolniony z endosomów do cytoplazmy, gdzie dochodzi do uwolnienia siRNA z kompleksu. Wolny siRNA zostaje włączony do mechanizmu interferencji RNA, co w konsekwencji prowadzi do wyciszenia genu docelowego (Albertazzi i wsp., 2010; Shcharbin i wsp., 2010).

Dzięki wnioskowi wyciągniętemu z analizy tworzenia kompleksów pomiędzy SMT i siRNA oraz wykazaniu, że dendrymery hybrydowe tworzą stabilne kompleksy z siRNA, można było przejść do kolejnego i zarazem ostatniego etapu pracy.

W celu określenia, czy dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe mogą być potencjalnymi nośnikami dla antyapoptotycznego siRNA, jako model wybrano linię komórek ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej – HL-60.

Linia komórkowa HL-60 została pozyskana od 36-letniej kobiety. Określenie „promielocytowa” wynika z faktu, iż fenotypowo komórki te przypominają stadium promielocytów i mioblastów, a więc posiadają 10 – 20% ziarnistości dojrzałych granulocytów, oraz wykazują aktywność fagocytarną.

Dane literaturowe wskazują na nadekspresję Bcl-2 w komórkach macierzystych białaczki, a także na przedłużenie życia u myszy z ostrą białaczką szpikową w przypadku inhibicji Bcl-2. Dodatkowo, komórki HL-60 wykorzystywane były jako model do oceny zdolności dendrymerów do transportu genów, w tym siRNA (Lagadinou i wsp., 2013; Creixell i Peppas, 2012; Dzitruk i wsp., 2015). Aby sprawdzić, czy badany układ dendrymer/antyapoptotyczne siRNA nie jest toksyczny dla komórek prawidłowych, wykorzystano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC).

Jak wspomnieli Pai i wsp., (2006), interferencja RNA (RNAi) jest silnym posttranskrypcyjnym procesem wyciszania genów, który jest bardzo obiecujący w dziedzinie terapii nowotworów. Interferencja RNA jest mechanizmem

regulującym ekspresję kluczowych genów determinujących los komórek, za pomocą dwuniciowego RNA (dsRNA). siRNA, a mianowicie krótkie interferujące RNA, czyli dsRNA o długości 21 – 23 par zasad, jest zdolny do wyciszania genów przez promowanie cięcia mRNA posiadających komplementarne sekwencje (Mello i Conte, 2004; Novina i Sharp, 2004; Pai i wsp., 2006; Masiero i wsp., 2007; Chitwood i Timmermans, 2010).

Wyniki otrzymane przez Dzmitruk i wsp. (2015), wskazują na wysoką toksyczność jedynie w przypadku mieszaniny antyapoptotycznego siRNA (tzw. „cocktail”) w stężeniu 100 nM, po 72 godzinnej inkubacji. W przypadku dendrypleksów z dendrymerami hybrydowymi, w stosunku molowym 10:1 ( $C_{SMT} = 1 \mu M$ ,  $C_{siRNA} = 100 \text{ nM}$ ) po 24 godz., nie zaobserwowano ich cytotoksyczności w stosunku do prawidłowych komórek PBMC. Jednakże, w przypadku komórek nowotworowych linii HL-60, zauważono istotny statystycznie spadek żywotności, nie tylko dla SMT1/Cocktail, ale także dendrypleksu SMT1/Bcl-xl.

Wiadomo, że antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 odgrywają ważną rolę w apoptotycznej śmierci komórkowej ludzkich nowotworów. Takahashi i wsp., (2013), przeprowadzili badania w celu wytyczenia mechanizmu działania antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 na żywotność komórek raka trzustki (PaCa). Wykazali oni, że jednoczesne wyciszenie genów Bcl-xl i Mcl-1 powoduje indukcję apoptozy w komórkach PaCa. Efekt ten związany był z translokacją Bax z cytosolu do błony mitochondrialnej, uwalnianiem cytochromu c oraz aktywacją kaspazy (Takahashi i wsp., 2013).

Należy zwrócić uwagę, że cytotoksyczność wywołana przez dendrypleksy zawierające dendrymery SMT była mierzona po czasie 24 godzin. Zdecydowano się na wybór takiej długości inkubacji po ocenie stopnia internalizacji dendrypleksów w komórkach HL-60. Co ciekawe, dendrypleksy SMT1/siRNA wykazywały wyższy poziom internalizacji po 3 godzinach (35%) niż po 24 godzinach (5%). W przypadku kompleksów SMT2/siRNA internalizacja po 3 godzinach (17%) była nieznacznie niższa niż po 24 godzinach (25%). Taki spadek w poziomie zinternalizowanych kompleksów z SMT1 w czasie może wynikać z faktu, iż znakowane fluorescencyjne siRNA zostaje w tym czasie uwolnione z dendrypleksów i włączone do mechanizmu interferencji RNA, a więc powoduje apoptozę w komórkach. Wyniki te potwierdzono analizą morfologii komórek oraz wizualizacją wyznakowanych dendrypleksów w komórkach HL-60.

Po 3 i 24 godzinnej inkubacji z dendrypleksami SMT1/siBcl-xl zaobserwowano siRNA we wnętrzu komórek. Ponadto, po 24 godzinnej inkubacji z tymi kompleksami zaobserwowano pojawienie się ciałek apoptotycznych (Ryc. 47C). W przeciwieństwie do wyników otrzymanych dla SMT1, po inkubacji z dendrypleksami zawierającymi SMT2 nie zauważono zmian apoptotycznych w komórkach.

Spadek żywotności komórek HL-60 jedynie do około 60% w przypadku inkubacji z toksycznymi dendrypleksami z SMT, w porównaniu do 5% spadku żywotności tych komórek po inkubacji z dendrypleksami z CPD G4, może wynikać zarówno z czasu inkubacji (24 do 72 godzin), jak i z faktu, że taki poziom toksyczności uzyskano przy stężeniu siRNA 250 nM (Dzmitruk i wsp., 2015). Jednakże, jeżeli porównamy toksyczność kompleksów dendrymer/Cocktail w stężeniu 100 nM (dla siRNA) po 24 godzinnej inkubacji dla dendrypleksów z SMT1 oraz innych dendrypleksów po 72 godzinnej, to jest ona istotnie wyższa ( $C_{\text{siRNA}} = 100 \text{ nM}$ , 72 godziny inkubacji, żywotność komórek HL-60 w procentach w porównaniu do kontroli przyjętej jako 100%: PAMAM G3 – 95%; PAMAM G4 – 90%; CPD G3 – 100%; CPD G4 – 85%; CBD CS – 75%; CBD OS – 80%).

Głównym mechanizmem działania siRNA (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1) jest indukcja w komórkach apoptozy (Kuwana i Newmeyer 2003; Saad i wsp., 2008; Reed 2011; Kogure i wsp., 2013; Dzmitruk i wsp., 2015). Natomiast dendrymery w swojej naturze różnią się mechanizmem działania. Według danych literaturowych dendrymery karbokrzemowe indukują apoptozę, dendrymery PAMAM – apoptozę oraz autofagię, natomiast dendrymery fosforowe – nekrozę (Bermejo i wsp., 2007; Mukherjee i Byrne 2013; Lazniewska i wsp., 2013b; Wang i wsp., 2014; Wrobel i wsp., 2014).

Z wyników otrzymanych w tej pracy wynika, że dendrymery SMT, podobnie jak dendrymery karbokrzemowe, indukują głównie apoptozę. Może wynikać to z faktu, iż w swojej strukturze dendrymery SMT zawierają grupy karbokrzemowe.

Wyniki otrzymane przez Dzmitruk i wsp. (2015) sugerują, że indukowanie kilku mechanizmów śmierci komórki jednocześnie jest bardziej skuteczne w leczeniu nowotworów. Najślabszy efekt był widoczny w przypadku dendrypleksów siRNA z dendrymerami karbokrzemowymi, które wywoływały jedynie apoptozę w komórkach. Dendrypleksy PAMAM/siRNA indukowały

zarówno apoptozę jak i autofagię, a ich efekt był umiarkowany. Najsilniejszy efekt zauważony został w przypadku CPD/siRNA, gdzie śmierć komórki była efektem zarówno nekrozy jak i apoptozy (Dzmitruk i wsp., 2015).

Dendrymery hybrydowe, które są przedmiotem tej pracy, skompleksowane z siRNA, wpływały głównie na wzrost frakcji komórek apoptotycznych. Jedynie dla dendrypleksów złożonych z SMT2 widoczny był również niewielki wzrost frakcji nekrotycznej.

Otrzymane wyniki wskazują, że dendrymery SMT posiadają potencjał jako nanonośniki dla antyapoptotycznego siRNA. Jednakże, ze względu na lepsze właściwości, szybszą internalizację do komórek oraz indukcję śmierci głównie na drodze apoptozy to dendrymer generacji pierwszej (SMT1) wydaje się lepszym kandydatem do dalszych badań w kierunku idealnego nośnika dla genów w celowanej terapii genowej.

## 10. Wnioski

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na ustosunkowanie się do postawionych w pracy hipotez badawczych:

1. Dendrymery hybrydowe SMT dwóch generacji oddziałują z wybranymi białkami enzymatycznymi (AST, LDH, AP).
2. Dendrymery hybrydowe generacji drugiej (SMT2) wykazują cytotoksyczność wobec mysich linii komórek nerwowych mHippoE-18 i N2a. Dendrymery hybrydowe generacji pierwszej (SMT1) wykazują cytotoksyczność jedynie wobec mysiej linii komórek nowotworowych N2a.
3. Dendrymery hybrydowe SMT generacji pierwszej (SMT1) z dużym prawdopodobieństwem mogą być nośnikami dla siRNA.

Wyniki badań przedstawione w pracy stanowią podstawę do sformułowania końcowego wniosku, iż dendrymery hybrydowe karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe generacji pierwszej (SMT1) posiadają korzystniejsze właściwości biologiczne, i w związku z tym prawdopodobieństwo zastosowania ich w medycynie jest większe niż w przypadku dendrymerów generacji drugiej (SMT2).

## 11. Streszczenie

Właściwości biologiczne nanocząstek decydują o możliwości ich zastosowania w medycynie. Dlatego też, ocena właściwości biologicznych nanocząstek powinna stanowić pierwszy bardzo ważny etap ich weryfikacji.

Przedstawione badania są próbą określenia właściwości biologicznych nowej klasy dendrymerów hybrydowych karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych dwóch generacji (SMT1 i SMT2), które powstały jako hybryda trzech dobrze poznanych klas dendrymerów: karbokrzemowych, fosforowych oraz wiologenowo-fosforowych.

Szczegółowe badania, wykonane w warunkach *in vitro*, miały na celu:

1. określenie oddziaływania dwóch generacji dendrymerów hybrydowych SMT z wybranymi białkami enzymatycznymi, tj. fosfatazą alkaliczną, dehydrogenazą L-mleczanową oraz aminotransferazą asparaginianową;
2. ocena wpływu dwóch generacji dendrymerów hybrydowych SMT na mysie linii komórek nerwowych na podstawie analizy wybranych parametrów odpowiedzi komórkowej;
3. wykazanie czy hybrydowe dendrymery SMT mogą być potencjalnymi nośnikami dla antyapoptotycznego siRNA.

W pierwszym etapie badań analizowano tworzenie kompleksów pomiędzy wybranymi białkami (AP, AST i LDH), a dendrymerami SMT z wykorzystaniem pomiarów potencjału zeta oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM. Ponadto, określono wpływ dendrymerów SMT na strukturę drugorzędową białek, metodą dichroizmu kołowego oraz ich konformację, wykonując pomiar gaszenia fluorescencji reszt tryptofanu.

Etap drugi przeprowadzono na dwóch liniach mysich komórek nerwowych: mHippoE-18 i N2a. Analizowano wpływ dendrymerów SMT1 oraz SMT2 na wybrane parametry odpowiedzi komórkowej. Cytotoksyczność dendrymerów SMT wobec komórek oceniono z wykorzystaniem testu MTT.

Ponadto, przeprowadzono analizę zmian poziomu reaktywnych form tlenu, błonowego potencjału mitochondrialnego, zmian morfologicznych oraz ultrastrukturalnych, a także wielkości frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych.

W etapie trzecim pracy, analizie poddano tworzenie kompleksów pomiędzy wybranym antyapoptotycznym siRNA (Bcl-2, Mcl-1 oraz Bcl-xl), a dendrymerami SMT. W tym celu wykonano pomiar potencjału zeta, analizę widm dichroizmu kołowego, elektroforezę żelową oraz wykorzystano transmisyjną mikroskopię elektronową TEM. Następnie określono wpływ aktywnych dendrypleksów (kompleksów siRNA z dendrymerami) na ludzką linię komórek ostrej białaczki promielocytowej HL-60. Analizy cytotoksyczności dokonano przy użyciu testu Alamar Blue. Oceniono również stopień internalizacji dendrypleksów, morfologię komórek po inkubacji z dendrypleksami oraz wielkość frakcji komórek nekrotycznych i apoptotycznych.

Wykazano, że:

1. dendrymery hybrydowe SMT dwóch generacji tworzą kompleksy z wybranymi białkami enzymatycznymi (AST, LDH, AP), a także wpływają na ich strukturę drugorzędową oraz konformację;
2. dendrymery hybrydowe generacji drugiej (**SMT2**) wykazują cytotoksyczność wobec mysich linii komórek nerwowych mHippoE-18 i N2a indukując w nich apoptozę. Dendrymery hybrydowe generacji pierwszej (**SMT1**) wykazują cytotoksyczność jedynie wobec mysiej linii komórek nowotworowych N2a powodując w nich początkowy wzrost poziomu reaktywnych form tlenu i błonowego potencjału mitochondrialnego, a po 48 godz. drastyczny spadek tych parametrów czego konsekwencją jest spadek żywotności oraz wzrost frakcji komórek apoptotycznych;
3. dendrymery hybrydowe SMT są w stanie tworzyć z siRNA stabilne kompleksy, zdolne do wnikania do komórek HL-60 i indukowania w nich apoptozy. Jednakże, to dendrymery generacji pierwszej (**SMT1**) wydają się być bardziej efektywne jeśli chodzi o dostarczanie siRNA do komórek HL-60.



Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć wniosek, iż dendrymery hybrydowe **karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe** generacji pierwszej (**SMT1**) posiadają korzystniejsze właściwości biologiczne, a potencjał zastosowania ich w medycynie jest większy niż w przypadku dendrymerów generacji drugiej (**SMT2**).

Uzyskane wyniki stanowią solidną bazę informacji oraz podstawę do dalszej, szczegółowej analizy toksyczności dendrymeru hybrydowego SMT generacji pierwszej (**SMT1**) wobec komórek nowotworowych oraz jego potencjału jako nośnika dla materiału genetycznego.

## 12. Summary

The biological properties of nanoparticles determine the possibility of their use in medicine. Therefore, the assessment of the biological properties of nanoparticles should be the very first important stage in their evaluation.

The aim of the research was to determine the biological properties of a new class of two generations of hybrid dendrimers (SMT1 and SMT2) which were made as hybrids of three well-known classes of dendrimers: carbosilane, viologen-phosphorus and phosphorus.

Detailed *in vitro* studies, aimed at:

1. Determination of the interaction of two generations of hybrid SMT dendrimers with selected proteins, i.e. alkaline phosphatase, L-lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase.
2. Determination of the influence of two generations of hybrid SMT dendrimers against murine neural cell lines based on the analysis of chosen parameters of the cell response.
3. Determining whether hybrid SMT dendrimers have potential as carriers for anti-apoptotic siRNA.

Analysis of the complexes between selected proteins (AP, AST and LDH) and SMT dendrimers was performed with the use of zeta potential measurements and transmission electron microscopy TEM. The effect of SMT dendrimers on the secondary structure of proteins was measured by circular dichroism. Conformation of selected proteins in the presence of SMT dendrimers was determined by measuring the quenching of fluorescence of tryptophan residues.

Determination of the influence of two generations of hybrid SMT dendrimers against cells based on the analysis of chosen parameters of the cell response was performed on two lines of murine neural cell lines: mHippoE-18 and N2a. Cytotoxicity of SMT dendrimers was assessed using the MTT assay. Analysis of changes in the level of reactive oxygen species, transmembrane mitochondrial potential, morphological and ultrastructural changes as well as the analysis of fractions of apoptotic and necrotic cells were also performed.

The first step in determining whether hybrid SMT dendrimers have potential as carriers for anti-apoptotic siRNA, was the analysis of dendriplex (dendrimers:siRNA complex) formation. The complexation between selected anti-apoptotic siRNA (Bcl-2, Mcl-1 and Bcl-xl) and SMT dendrimers was evaluated using zeta potential measurement, the analysis of circular dichroism spectra, gel electrophoresis and transmission electron microscopy TEM. Afterwards, the effect of active dendriplexes on human promyelocytic leukemia cells HL-60 was determined. Cytotoxicity evaluation was performed using the Alamar Blue test. The degree of internalization, as well as cell morphology after incubation with dendriplexes and the analysis of fractions of apoptotic and necrotic cells were also performed.

It has been proved that:

1. Two generation of hybrid SMT dendrimers form complexes with selected proteins (AST, LDH, AP). They also affect their secondary structure and conformation.
2. Second generation of hybrid dendrimers (**SMT2**) exhibit cytotoxicity against murine neural cell lines: mHippoE-18 and N2a by inducing apoptosis. The first generation of hybrid dendrimers (**SMT1**) exhibit cytotoxicity only against the murine tumor cell line N2a, by causing after 30 min an increase in the level of reactive oxygen species and transmembrane mitochondrial potential, and after 48 hours a drastic decrease in these parameters, decrease in viability and an increase in the fraction of apoptotic cells.
3. Hybrid SMT dendrimers are able to form stable complexes with siRNAs which are able to internalize and induce apoptosis in HL-60 cells. However, the first generation dendrimer (**SMT1**) seems to be more efficient in delivering siRNA into the cells HL-60.

The conclusion, that the first generation of carbosilane-viologen-phosphorus dendrimers (**SMT1**) has more favourable biological properties, and the potential of its application in medicine is higher than in the case of the second generation dendrimers (**SMT2**) has been made based on the studies.

The obtained results provide a solid foundation for further, more specific analysis of the first generation of hybrid SMT dendrimer (**SMT1**), their toxicity against cancer cells and potential as a carrier for genetic material.

### 13. Literatura

Adkins, J.N., Varnum, S.M., Auberry, K.J., Moore, R.J., Angell, N.H., Smith, R.D., Springer, D.L., i Pounds, J.G. (2002). Toward a Human Blood Serum Proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 947–955.

Akar, U., Chaves-Reyez, A., Barria, M., Tari, A., Sanguino, A., Kondo, Y., Kondo, S., Arun, B., Lopez-Berestein, G., i Ozpolat, B. (2008). Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy* 4, 669–679.

Albertazzi, L., Serresi, M., Albanese, A., i Beltram, F. (2010). Dendrimer internalization and intracellular trafficking in living cells. *Mol. Pharm.* 7, 680–688.

Albertazzi, L., Fernandez-Villamarin, M., Riguera, R., i Fernandez-Megia, E. (2012). Peripheral functionalization of dendrimers regulates internalization and intracellular trafficking in living cells. *Bioconjug. Chem.* 23, 1059–1068.

Albertazzi, L., Gherardini, L., Brondi, M., Sulis Sato, S., Bifone, A., Pizzorusso, T., Ratto, G.M., i Bardi, G. (2013). In vivo distribution and toxicity of PAMAM dendrimers in the central nervous system depend on their surface chemistry. *Mol. Pharm.* 10, 249–260.

Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., i Farokhzad, O.C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* 5, 505–515.

Ansar Ahmed, S., Gogal, R.M., i Walsh, J.E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* 170, 211–224.

Arnáiz, E., Vacas-Córdoba, E., Galán, M., Pion, M., Gómez, R., Muñoz-Fernández, M.Á., i De La Mata, F.J. (2014). Synthesis of anionic carbosilane dendrimers via „click chemistry” and their antiviral properties against HIV. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 52, 1099–1112.

Bae, Y., Rhim, H.-S., Lee, S., Ko, K.S., Han, J., i Choi, J.S. (2013). Apoptin gene delivery by the functionalized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer derivatives induces cell death of U87-MG glioblastoma cells. *J. Pharm. Sci.* 17, 1–234.

Behr, J. (1997). The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia (Aarau).* 51, 34–36.

Bermejo, J.F., Ortega, P., Chonco, L., Eritja, R., Samaniego, R., Müllner, M., De Jesus, E., De La Mata, F.J., Flores, J.C., Gomez, R., i in. (2007). Water-soluble carbosilane dendrimers: Synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chem. - A Eur. J.* 13, 483–495.

Bielinska, A., Kukowska-Latallo, J.F., Johnson, J., Tomalia, D.A., i Baker, J.R., J. (1996). Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Radiat. Environ. Biophys.* 34, 21–27.

Bielinska, A.U., Kukowska-Latallo, J.F., i Baker, J.R. (1997). The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: Mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1353, 180–190.

Bielinska, A.U., Chen, C., Johnson, J., i Baker, J.R. (1999). DNA Complexing with Polyamidoamine Dendrimers : Implications for Transfection. *Am. Chem. Soc.* 843–850.

Bohm, G., Muhr, R., i Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 5, 191–195.

Bourne, N., Stanberry, L.R., Kern, E.R., Holan, G., i Matthews, B. (2000). Dendrimers, a New Class of Candidate Topical Microbicides with Activity against Herpes Simplex Virus Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2471–2474.

Brazeau, G.A., Attia, S., Poxon, S., i Hughes, J.A. (1998). In vitro myotoxicity of selected cationic macromolecules used in non- viral gene delivery. *Pharm. Res.* 15, 680–684.

Brzezińska, K., i Ziaja, M. (2012). Struktura I Funkcje Bariery Krew -Mózg the Structure and Role of Blood -Brain Barrier. *Postępy Biol. Komórki* 39, 84–99.

Buhleier, E., Wehner, W., i Vogtle, F. (1978). „Cascade“- and „Nonskid-Chain-like“ Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis (Stuttg).* 1978, 155–158.

Caminade, A.-M., i Majoral, J.-P. (2013). Positively charged phosphorus dendrimers. An overview of their properties. *New J. Chem.* 37, 3358.

Caminade, A.-M., Vercellone, A., Eutamene, H., Turrin, C.O., Theodorou, V., Majoral, J.P., Caminade, A.M., Prandi, J., Nigou, J., Puzo, G., i in. (2017). Phosphorus dendrimers for nanomedicine. *Chem. Commun.* 53, 9830–9838.

Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., i Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle – protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *PNAS* 104, 2050–2055.

Chen, J., i Banaszak Holl, M.M. (2017). Dendrimer and dendrimer-conjugate protein complexes and protein coronas. *Can. J. Chem.* 95, 1–18.

Chen, W., Turro, N.J., i Tomalia, D.A. (2000). Using ethidium bromide to probe the interactions between DNA and dendrimers. *Langmuir* 16, 15–19.

Chitwood, D.H., i Timmermans, M.C.P. (2010). Small RNAs are on the move. *Nature* 467, 415–419.

Chu, C., Xu, J., Cheng, D., Li, X., Tong, S., Yan, J., i Li, Q. (2014). Anti-proliferative and apoptosis-inducing effects of camptothecin-20(s)-o- (2-pyrazolyl-1)acetic ester in human breast tumor MCF-7 cells. *Molecules* 19, 4941–4955.

Ciepluch, K., Katir, N., El Kadib, A., Felczak, A., Zawadzka, K., Weber, M., Klajnert, B., Lisowska, K., Caminade, A.M., Bousmina, M., i in. (2012). Biological properties of new viologen-phosphorus dendrimers. *Mol. Pharm.* 9, 448–457.

Ciolkowski, M., Rozanek, M., Bryszewska, M., i Klajnert, B. (2013). The influence of PAMAM dendrimers surface groups on their interaction with porcine pepsin. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1834, 1982–1987.

Coleman, J.E. (1992). Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys* 441–483.

Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., i Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 40–45.

Creixell, M., i Peppas, N.A. (2012). Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance. *Nano Today* 7, 367–379.

Dasgupta, A., Nomura, M., Shuck, R., i Yustein, J. (2017). Cancer's achilles' heel: Apoptosis and necroptosis to the rescue. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–20.

Dass, C.R. (2002). Vehicles for oligonucleotide delivery to tumours. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 3–27.

Duke, R.C., Cohen, J.J., in eds, Cologian, S.E., i Kruisbeak, A.M. (1992). Morphological and biochemical assays of apoptosis. In *Current protocols in immunology*, s. 3.13.1-3.17.16.

Dulak, J. (2009). Czy powinniśmy się obawiać terapii genowej? *Diametros* 19, 40–47.

Dzmitruk, V., Szulc, A., Shcharbin, D., Janaszewska, A., Shcharbina, N., Lazniewska, J., Novopashina, D., Buyanova, M., Ionov, M., Klajnert-Maculewicz, B., i in. (2015). Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action. *Int. J. Pharm.* 485, 288–294.

Ede, L.C., O'Brien, J., Chonmaitree, T., Han, Y., i Patel, J.A. (2017). Lactate dehydrogenase as a marker of nasopharyngeal inflammatory injury during viral upper respiratory infection: implications for acute otitis media. *Pediatr Res* 73, 29–39.

Esfand, R., i Tomalia, D.A. (2001). Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: From biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today* 6, 427–436.

Florek, J., Caillard, R., i Kleitz, F. (2017). Evaluation of Mesoporous Silica Nanoparticles for Oral Drug Delivery – Current status and perspective of MSNs drug carriers. *Nanoscale* 9, 15252–15277.

Frey, H., i Schlenk, C. (2000). Silicon-Based Dendrimers. In *Dendrimers II: Architecture, Nanostructure and Supramolecular Chemistry*, ss. 69–129.

Froehlich, E., Mandeville, J.S., Jennings, C.J., Sedaghat-Herati, R., i Tajmir-Riahi, H.A. (2009). Dendrimers bind human serum albumin. *J. Phys. Chem. B* 113, 6986–6993.

Gao, H. (2016). Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta Pharm. Sin. B* 6, 268–286.

Gendelman, H.E., Anantharam, V., Bronich, T., Ghaisas, S., Jin, H., Kanthasamy, A.G., Liu, X., McMillan, J.E., Mosley, R.L., Narasimhan, B., i in. (2015). Nanoneuromedicines for degenerative, inflammatory, and infectious nervous system diseases. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11, 751–767.

Giehm, L., Christensen, C., Boas, U., Heegaard, P.M.H., i Otzen, D.E. (2008). Dendrimers destabilize proteins in a generation-dependent manner involving electrostatic interactions. *Biopolymers* 89, 522–529.

Giovannini, C., Matarrese, P., Scazzocchio, B., Sanchez, M., Masella, R., i Malorni, W. (2002). Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. *FEBS Lett.* 523, 200–206.

Giri, J., Diallo, M.S., Simpson, A.J., Liu, Y., Goddard, W.A., Kumar, R., i Woods, G.C. (2011). Interactions of poly(amidoamine) dendrimers with human serum albumin: Binding constants and mechanisms. *ACS Nano* 5, 3456–3468.

Goegan, P., Johnson, G., i Vincent, R. (1995). Effects of serum protein and colloid on the alamarBlue assay in cell cultures. *Toxicol. Vitro.* 9, 257–266.

Gross, A. (2016). BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857, 1243–1246.

Gupta, V., i Nayak, S.K. (2015). Dendrimers: A review on synthetic approaches. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5, 117–122.

Hadjichristidis, N., Guyot, A., i Fetters, L.J. (1978). Star-Branched Polymers. 1. The Synthesis of Star Polyisoprenes using Octa- and Dodecachlorosilanes as Linking Agents. *Macromolecules* 11, 668–672.

Harrington, K.J. (2016). The biology of cancer. *Medicine (Baltimore)*. 44, 1–5.

Hayashi, H., Wada, H., Yoshimura, T., Esaki, N., i Soda, K. (1990). Recent Topics in Pyridoxal 5'-Phosphate Enzyme Studies. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 87–110.

Ionov, M., Wróbel, D., Gardikis, K., Hatziantoniou, S., Demetzos, C., Majoral, J.P., Klajnert, B., i Bryszewska, M. (2012). Effect of phosphorus dendrimers on DMPC lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* 165, 408–413.

Ionov, M., Lazniewska, J., Dzmitruk, V., Halets, I., Loznikova, S., Novopashina, D., Apartsin, E., Krasheninina, O., Venyaminova, A., Milowska, K., i in. (2015). Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction. *Int. J. Pharm.* 485, 261–269.

Ionov, M., Ihnatsyeu-Kachan, A., Michlewska, S., Shcharbina, N., Shcharbin, D., Majoral, J.P., i Bryszewska, M. (2016). Effect of dendrimers on selected enzymes - Evaluation of nano carriers. *Int. J. Pharm.* 499, 247–254.

Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U., i Jain, N.K. (2010). Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int. J. Pharm.* 394, 122–142.

Janaszewska, A., Studzian, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Christensen, J.B., i Klajnert-Maculewicz, B. (2015). PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone-In vitro assessment of neurotoxicity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11, 409–411.

Kameyama, S., Horie, M., Kikuchi, T., Omura, T., Tadokoro, A., Takeuchi, T., Nakase, I., Sugiura, Y., i Futaki, S. (2007). Acid wash in determining cellular uptake of Fab/cell-permeating peptide conjugates. *Biopolymers* 88, 98–107.

Kannan, R.M., Nance, E., Kannan, S., i Tomalia, D.A. (2014). Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: From design principles to clinical applications. *J. Intern. Med.* 276, 579–617.

Kanwar, J.R., Sun, X., Punj, V., Sriramoju, B., Mohan, R.R., Zhou, S.F., Chauhan, A., i Kanwar, R.K. (2012). Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: Untamed dragon with fire power to heal. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 8, 399–414.

Karande, P., Trasatti, J.P., i Chandra, D. (2015). *Novel Approaches for the Delivery of Biologics to the Central Nervous System* (Elsevier Inc.).

Karjoo, Z., Chen, X., i Hatefi, A. (2016). Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99, 113–128.

Katsnelson, A., De Strooper, B., i Zoghbi, H.Y. (2016). Neurodegeneration: From cellular concepts to clinical applications. *Sci. Transl. Med.* 8, 1–6.

Khalid, H., Mukherjee, S.P., O'Neill, L., i Byrne, H.J. (2016). Structural dependence of in vitro cytotoxicity, oxidative stress and uptake mechanisms of poly(propylene imine) dendritic nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 36, 464–473.



Kirsch, J.F., Eichele, G., Ford, G.C., Vincent, M.G., Jansonius, J.N., Gehring, H., i Christen, P. (1984). Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. *J. Mol. Biol.* 174, 497–525.

Kitchens, K.M., Kolhatkar, R.B., Swaan, P.W., i Ghandehari, H. (2008). Endocytosis inhibitors prevent poly(amidoamine) dendrimer internalization and permeability across caco-2 cells. *Mol. Pharm.* 5, 364–369.

Klajnert, B., i Bryszewska, M. (2002). Fluorescence studies on PAMAM dendrimers interactions with bovine serum albumin. *Bioelectrochemistry* 55, 33–35.

Klajnert, B., i Przygodzki, T. (2003). Therapeutic applications of dendrimers/ Dendrymery w zastosowaniach terapeutycznych. *Postepy Biochem.* 49, 290–297.

Klajnert, B., Cladera, J., i Bryszewska, M. (2006a). Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 21–28.

Klajnert B., Cortijo-Arellano, M., Bryszewska, M., i Cladera, J. (2006b). Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 577–582.

Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Cladera, J., Majoral, J.P., Caminade, A.M., i Bryszewska, M. (2007). Influence of phosphorus dendrimers on the aggregation of the prion peptide PrP 185-208. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 20–25.

Kogure, T., Kinghorn, A.D., Yan, I., Bolon, B., Lucas, D.M., Grever, M.R., i Patel, T. (2013). Therapeutic Potential of the Translation Inhibitor Silvestrol in Hepatocellular Cancer. *PLoS One* 8, 1–14.

Kukowska-Latallo, J.F., Candido, K.A., Cao, Z., Nigavekar, S.S., Majoros, I.J., Thomas, T.P., Balogh, L.P., Khan, M.K., i Baker, J.R. (2005). Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res.* 65, 5317–5324.

Kuwana, T., i Newmeyer, D.D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 691–699.

Lagadinou, E.D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R.M., Neering, S.J., Minhajuddin, M., Ashton, J.M., Pei, S., Grose, V., O'Dwyer, K.M., i in. (2013). BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 329–341.

Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.

Lazniewska, J., Milowska, K., Katir, N., El Kadib, A., Bryszewska, M., Majoral, J.P., i Gabryelak, T. (2013a). Viologen-phosphorus dendrimers exhibit minor toxicity against a murine neuroblastoma cell line. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 18, 459–478.

- Lazniewska, J., Miłowska, K., Zablocka, M., Mignani, S., Caminade, A.M., Majoral, J.P., Bryszewska, M., i Gabryelak, T. (2013b). Mechanism of cationic phosphorus dendrimer toxicity against murine neural cell lines. *Mol. Pharm.* 10, 3484–3496.
- Lazniewska, J., Janaszewska, A., Miłowska, K., Caminade, A.M., Mignani, S., Katir, N., Kadib, A. El, Bryszewska, M., Majoral, J.P., Gabryelak, T., i in. (2013c). Promising low-toxicity of viologen-phosphorus dendrimers against embryonic mouse hippocampal cells. *Molecules* 18, 12222–12240.
- Lebel, C.P., Ischiropoulos, H., i Bondys, S.C. (1992). Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol* 5, 227–231.
- Lederberg, J. (1963). Molecular Biology, Eugenics and Euphenics. *Nature* 198, 428–429.
- Lee, C.C., MacKay, J.A., Fréchet, J.M.J., i Szoka, F.C. (2005). Designing dendrimers for biological applications. *Nat. Biotechnol.* 23, 1517–1526.
- Lee, J.H., Cha, K.E., Kim, M.S., Hong, H.W., Chung, D.J., Ryu, G., i Myung, H. (2009). Nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-induced apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Lett.* 190, 202–207.
- Li, M., Luo, Z., Xia, Z., Shen, X., i Cai, K. (2017). Time-sequenced drug delivery approaches towards effective chemotherapeutic treatment of glioma. *Mater. Horizons* 4, 977–996.
- Liu, X., Rocchi, P., i Peng, L. (2012). Dendrimers as non-viral vectors for siRNA delivery. *New J. Chem.* 36, 256–263.
- Lynch, I., i Dawson, K.A. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 3, 40–47.
- Ma, M., Cheng, Y., Xu, Z., Xu, P., Qu, H., Fang, Y., Xu, T., i Wen, L. (2007). Evaluation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as drug carriers of anti-bacterial drugs using sulfamethoxazole (SMZ) as a model drug. *Eur. J. Med. Chem.* 42, 93–98.
- Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W., Meijer, E.W., Paulus, W., i Duncan, R. (2000). Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of <sup>125</sup>I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release* 65, 133–148.
- Masiero, M., Nardo, G., Indraccolo, S., i Favaro, E. (2007). RNA interference: Implications for cancer treatment. *Mol. Aspects Med.* 28, 143–166.
- Mello, C.C., i Conte, D. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431, 338–342.

Mendes, L.P., Pan, J., i Torchilin, V.P. (2017). Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. *Molecules* 22, 1–21.

Merry, D.E., i Korsmeyer, S.J. (1997). Bcl-2 Gene in the Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 245–267.

Michlewska, S., Ionov, M., Maroto-Díaz, M., Szwed, A., Ihnatsyeyu-Kachan, A., Loznikova, S., Shcharbin, D., Maly, M., Ramirez, R.G., de la Mata, F.J., i in. (2018). Ruthenium dendrimers as carriers for anticancer siRNA. *J. Inorg. Biochem.* 181.

Mignani, S., Bryszewska, M., Zablocka, M., Klajnert-Maculewicz, B., Cladera, J., Shcharbin, D., i Majoral, J.P. (2017). Can dendrimer based nanoparticles fight neurodegenerative diseases? Current situation versus other established approaches. *Prog. Polym. Sci.* 64, 23–51.

Millán, J.L. (2006). Alkaline Phosphatases. *Dyn. Bone Cartil. Metab.* 153–164.

Milowska, K., Malachowska, M., i Gabryelak, T. (2011). PAMAM G4 dendrimers affect the aggregation of  $\alpha$ -synuclein. *Int. J. Biol. Macromol.* 48, 742–746.

Milowska, K., Gabryelak, T., Bryszewska, M., Caminade, A.M., i Majoral, J.P. (2012). Phosphorus-containing dendrimers against  $\alpha$ -synuclein fibril formation. *Int. J. Biol. Macromol.* 50, 1138–1143.

Milowska, K., Grochowina, J., Katir, N., El Kadib, A., Majoral, J.P., Bryszewska, M., i Gabryelak, T. (2013). Viologen-phosphorus dendrimers inhibit  $\alpha$ -synuclein fibrillation. *Mol. Pharm.* 10, 1131–1137.

Milowska, K., Szwed, A., Zablocka, M., Caminade, A.M., Majoral, J.P., Mignani, S., Gabryelak, T., i Bryszewska, M. (2014). In vitro PAMAM, phosphorus and viologen-phosphorus dendrimers prevent rotenone-induced cell damage. *Int. J. Pharm.* 474, 42–49.

Milowska, K., Szwed, A., Mutrynowska, M., Gomez-Ramirez, R., De La Mata, F.J., Gabryelak, T., i Bryszewska, M. (2015). Carbosilane dendrimers inhibit  $\alpha$ -synuclein fibrillation and prevent cells from rotenone-induced damage. *Int. J. Pharm.* 484, 268–275.

Mintzer, M.A., i Simanek, E.E. (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* 109, 259–302.

Mirebeau-Prunier, D., Le Pennec, S., Jacques, C., Fontaine, J.F., Gueguen, N., Boutet-Bouzamondo, N., Donnart, A., Malthiery, Y., i Savagner, F. (2013). Estrogen-Related Receptor Alpha Modulates Lactate Dehydrogenase Activity in Thyroid Tumors. *PLoS One* 8, 58683–58694.

Moreno, S., Szwed, A., El Brahmī, N., Milowska, K., Kurowska, J., Fuentes-Paniagua, E., Pedziwiatr-Werbicka, E., Gabryelak, T., Katir, N., Javier de la Mata, F., i in. (2015). Synthesis, characterization and biological properties of new hybrid carbosilane–viologen–phosphorus dendrimers. *RSC Adv.* 5, 25942–25958.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

Mukherjee, S.P., i Byrne, H.J. (2013). Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: Experimental observation and numerical simulation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9, 202–211.

Muzafarov, A., Gorbatshevich, O., Rebrov, E., Ignateva, G., Chenskaya, T., Myakushev, V., Bulkin, A., i Papkov, V. (1993). Organosilicon dendrimers: volume-growing polyallylcarbosilane. *Vysokomol. Soedin. Ser.A Ser.B Ser.C - Kratk. Soobshcheniya* 35, 1867–1872.

Naha, P.C., Davoren, M., Lyng, F.M., i Byrne, H.J. (2010). Reactive oxygen species (ROS) induced cytokine production and cytotoxicity of PAMAM dendrimers in J774A.1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 91–99.

Navya, P.N., i Daima, H.K. (2016). Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Converg.* 3, 1.

Neerman, M.F., Zhang, W., Parrish, A.R., i Simanek, E.E. (2004). In vitro and in vivo evaluation of a melamine dendrimer as a vehicle for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 281, 129–132.

Newkome, G.R., Yao, Z., Baker, G.R., i Gupta, V.K. (1985). Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. *A [27]-arborol. J. Org. Chem.* 50, 2003–2004.

Novina, C.D., i Sharp, P.A. (2004). The RNAi revolution. *Nature* 430, 161–164.

Nowacka, O., Milowska, K., Belica-Pacha, S., Palecz, B., Šipošová, K., Gazova, Z., i Bryszewska, M. (2016). Generation-dependent effect of PAMAM dendrimers on human insulin fibrillation and thermal stability. *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 54–60.

Osellame, L.D., Blacker, T.S., i Duchon, M.R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 711–723.

Pagé, D., Zanini, D., i Roy, R. (1996). Macromolecular recognition: Effect of multivalency in the inhibition of binding of yeast mannan to concanavalin A and pea lectins by mannosylated dendrimers. *Bioorganic Med. Chem.* 4, 1949–1961.

Pai, S.I., Lin, Y.Y., Macaes, B., Meneshian, A., Hung, C.F., i Wu, T.C. (2006). Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther.* 13, 464–477.

Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., i Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16, 4738–4745.

Parimi, S., Barnes, T.J., Callen, D.F., i Prestidge, C.A. (2010). Mechanistic insight into cell growth, internalization, and cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Biomacromolecules* 11, 382–389.

Perez Ruiz de Garibay, A. (2016). Endocytosis in gene therapy with non-viral vectors. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 166, 227–235.

Pineda, J.R.E.T., Callender, R., i Schwartz, S.D. (2007). Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase. *Biophys. J.* 93, 1474–1483.

Popiel, H.A., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., Oishi, S., Fujii, N., Takeuchi, T., Toda, T., Wada, K., i Nagai, Y. (2011). The Aggregation Inhibitor Peptide QBP1 as a Therapeutic Molecule for the Polyglutamine Neurodegenerative Diseases. *J. Amino Acids* 2011, 1–10.

Provost, P. (2010). Interpretation and applicability of microrna data to the context of Alzheimer's and age-related diseases. *Aging (Albany, NY)*. 2, 166–169.

Qiu, L., Gulotta, M., i Callender, R. (2007). Lactate dehydrogenase undergoes a substantial structural change to bind its substrate. *Biophys. J.* 93, 1677–1686.

Reed, J.C. (2011). Cancer: Priming cancer cells for death. *Science*(80)334, 1075–1076.

Rengan, K., i Engel, R. (1990). Phosphonium cascade molecules. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1084–1085.

Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate stain at high pH in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208.

Rosenberg, S., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R., Moen, R., Karson, E., Lotze, M., Yang, J., Topalian, S., i in. (1990). Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* 30, 570–580.

Saad, M., Garbuzenko, O.B., i Minko, T. (2008). Co-delivery of siRNA and an anticancer drug for treatment of multidrug-resistant cancer. *Nanomedicine* 3, 761–776.

Sakamoto, J.I., Koyama, T., Miyamoto, D., Yingsakmongkon, S., Hidari, K.I.P.J., Jampangern, W., Suzuki, T., Suzuki, Y., Esumi, Y., Nakamura, T., i in. (2009). Systematic syntheses of influenza neuraminidase inhibitors: A series of carbosilane dendrimers uniformly functionalized with thioglycoside-type sialic acid moieties. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 5451–5464.

Salto, R., Vílchez, J.D., Girón, M.D., Cabrera, E., Campos, N., Manzano, M., Rueda, R., i López-Pedrosa, J.M. (2015).  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) promotes neurite outgrowth in Neuro2a cells. *PLoS One* 10, 1–13.

Sánchez-Alcázar, J., Ault, J., Khodjakov, A., i Schneider, E. (2000). Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. *Cell Death Differ.* 7, 1090–1100.

Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., i Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J. Control. Release* 235, 34–47.

Schutzer, S.E., Liu, T., Natelson, B.H., Angel, T.E., Schepmoes, A.A., Purvine, S.O., Hixson, K.K., Lipton, M.S., Ii, D.G.C., Coyle, P.K., i in. (2010). Establishing the Proteome of Normal Human Cerebrospinal Fluid. *PLoS One* 5, 1–7.

Sekowski, S., Miłowska, K., i Gabryelak, T. (2008). Dendrimers in biomedical sciences and nanotechnology. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 62, 725–733.

Shah, D.S., Sakthivel, T., Toth, I., Florence, A.T., i Wilderspin, A.F. (2000). DNA transfection and transfected cell viability using amphipathic asymmetric dendrimers. *Int. J. Pharm.* 208, 41–48.

Shahriari, A., Dawson, N.J., Bell, R.A.V., i Storey, K.B. (2013). Stable suppression of lactate dehydrogenase activity during anoxia in the foot muscle of *Littorina littorea* and the potential role of acetylation as a novel posttranslational regulatory mechanism. *Enzyme Res.* 2013.

Shakya, A., Dougherty, C.A., Xue, Y., Al-Hashimi, H.M., i Banaszak Holl, M.M. (2016). Rapid exchange between free and bound states in RNA-dendrimer polyplexes: Implications on the mechanism of delivery and release. *Biomacromolecules* 17, 154–164.

Sharma, U., Pal, D., i Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: An overview. *Indian J. Clin. Biochem.* 29, 269–278.

Shcharbin, D., Klajnert, B., Mazhul, V., i Bryszewska, M. (2005). Dendrimer interactions with hydrophobic fluorescent probes and human serum albumin. *J. Fluoresc.* 15, 21–28.

Shcharbin, D., Pedziwiatr, E., Blasiak, J., i Bryszewska, M. (2010). How to study dendriplexes II: Transfection and cytotoxicity. *J. Control. Release* 141, 110–127.

Shcharbin, D., Janaszewska, A., Klajnert-Maculewicz, B., Ziemia, B., Dzmitruk, V., Halets, I., Loznikova, S., Shcharbina, N., Milowska, K., Ionov, M., i in. (2014). How to study dendrimers and dendriplexes III. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity in vivo. *J. Control. Release* 181, 40–52.

Shcharbin, D., Ionov, M., Abashkin, V., Loznikova, S., Dzmitruk, V., Shcharbina, N., Matusevich, L., Milowska, K., Gałeczki, K., Wysocki, S., i in. (2015). Nanoparticle corona for proteins: Mechanisms of interaction between dendrimers and proteins. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 134, 377–383.

Shcharbin, D., Shcharbina, N., Dzmitruk, V., Pedziwiatr-Werbicka, E., Ionov, M., Mignani, S., de la Mata, F.J., Gómez, R., Muñoz-Fernández, M.A., Majoral, J.P., i in. (2017a). Dendrimer-protein interactions versus dendrimer-based nanomedicine. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 152, 414–422.

Shcharbin, D., Pedziwiatr-Werbicka, E., Vcherashniaya, A., Janaszewska, A., Marcinkowska, M., Goska, P., Klajnert-Maculewicz, B., Ionov, M., Abashkin, V., Ihnatsyeu-Kachan, A., i in. (2017b). Binding of poly(amidoamine), carbosilane, phosphorus and hybrid dendrimers to thrombin—Constants and mechanisms. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 155, 11–16.

Shen, Y., Kim, J., Strittmatter, E.F., Jacobs, J.M., Ii, D.G.C., Fang, R., Tolié, N., Moore, R.J., i Smith, R.D. (2005). Characterization of the human blood plasma proteome. *Proteomics* 5, 4034–4045.

Solarska-Ściuk, K., Gajewska, A., Glińska, S., Studzian, M., Michlewska, S., Balcerzak, Ł., Skolimowski, J., Kolago, B., i Bartosz, G. (2014). Intracellular transport of nanodiamond particles in human endothelial and epithelial cells. *Chem. Biol. Interact.* 219, 90–100.

Sonawane, N.D., Szoka, F.C., i Verkman, A.S. (2003). Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 44826–44831.

Sze, A., Erickson, D., Ren, L., i Li, D. (2003). Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *J. Colloid Interface Sci.* 261, 402–410.

Szewczyk, M., Drzewinska, J., Dzmitruk, V., Shcharbin, D., Klajnert, B., Appelhans, D., i Bryszewska, M. (2012). Stability of dendriplexes formed by anti-HIV genetic material and poly(propylene imine) dendrimers in the presence of glucosaminoglycans. *J. Phys. Chem. B* 116, 14525–14532.

Szwed, A., i Miłowska, K. (2012). The role of proteins in neurodegenerative disease. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 66, 187–195.

Szwed, A., Miłowska, K., Ionov, M., Shcharbin, D., Moreno, S., Gomez-Ramirez, R., de la Mata, F.J., Majoral, J.P., Bryszewska, M., i Gabryelak, T. (2016). Interaction between dendrimers and regulatory proteins. Comparison of effects of carbosilane and carbosilane–viologen–phosphorus dendrimers. *RSC Adv.* 6, 97546–97554.

Szymański, P., Markowicz, M., i Mikiciuk-Olasik, E. (2012). Zastosowanie nanotechnologii w medycynie i farmacji. *LAB Lab. Apar. Badania* 17, 51–56.

Takahashi, H., Chen, M.C., Pham, H., Matsuo, Y., Ishiguro, H., Reber, H.A., Takeyama, H., Hines, O.J., i Eibl, G. (2013). Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis through Bax activation in pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 2980–2987.

Tang, M.X., i Szoka, F.C. (1997). The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* 4, 823–832.

Thapa, B., i Narain, R. (2016). Mechanism, current challenges and new approaches for non viral gene delivery. In *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*, (Elsevier Ltd.), ss. 1–27.

Tomalia, D.A. (1996). Starburst Dendrimers - Nanoscopic Supermolecules according to Dendritic Rules and Principles. *Macromol.Symp* 101, 243–255.

Tomalia, D.A. (2009). In quest of a systematic framework for unifying and defining nanoscience. *J. Nanoparticle Res.* 11, 1251–1310.

Tomalia, D.A. (2012). Dendritic effects: Dependency of dendritic nano-periodic property patterns on critical nanoscale design parameters (CNDPs). *New J. Chem.* 36, 264–281.

Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., i Smith, P. (1985). A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* 17, 117–132.

Tomalia, D.A., Christensen, J.B., i Boas, U. (2012). Dendrimers, Dendrons, and Dendritic Polymers Discovery, Applications, and the Future.

Toné, S., Sugimoto, K., Tanda, K., Suda, T., Uehira, K., Kanouchi, H., Samejima, K., Minatogawa, Y., i Earnshaw, W.C. (2007). Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Exp. Cell Res.* 313, 3635–3644.

Van Der Made, A.W., i Van Leeuwen, P.W.N.M. (1992). Silane dendrimers. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1400–1401.

Van Der Made, A.W., Van Leeuwen, P.W.N.M., De Wilde, J.C., i Brandes, R.A.C. (1993). Dendrimeric silanes. *Adv. Mater.* 5, 466–468.

Voinnet, O., i Baulcombe, D. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389, 553.

Wang, S., Li, Y., Fan, J., Wang, Z., Zeng, X., Sun, Y., Song, P., i Ju, D. (2014). The role of autophagy in the neurotoxicity of cationic PAMAM dendrimers. *Biomaterials* 35, 7588–7597.

Wasiak, T., Ionov, M., Nieznanski, K., Nieznanska, H., Klementieva, O., Granell, M., Cladera, J., Majoral, J., Caminade, P.A., i Klajnert, B. (2011). Phosphorus Dendrimers Affect Alzheimer ' s ( AB 1 – 28 ) Peptide and MAP-Tau Protein Aggregation. *Mol. Pharm.* 9, 458–469.

Wasiak, T., Marcinkowska, M., Pieszynski, I., Zablocka, M., Caminade, A.M., Majoral, J.P., i Klajnert-Maculewicz, B. (2015). Cationic phosphorus dendrimers and therapy for Alzheimer's disease. *New J. Chem.* 39, 4852–4859.

Wilbur, D.S., Pathare, P.M., Hamlin, D.K., Buhler, K.R., i Vessella, R.L. (1998). Biotin reagents for antibody pretargeting. 3. Synthesis, radioiodination, and evaluation of biotinylated starburst dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 9, 813–825.



Wohlfart, S., Gelperina, S., i Kreuter, J. (2012). Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release* 161, 264–273.

Wrobel, D., Kolanowska, K., Gajek, A., Gomez-Ramirez, R., De La Mata, J., Pedziwiatr-Werbicka, E., Klajnert, B., Waczulikova, I., i Bryszewska, M. (2014). Interaction of cationic carbosilane dendrimers and their complexes with siRNA with erythrocytes and red blood cell ghosts. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 882–889.

Yang, J.T., Wu, C.S.C., i Martinez, H.M. (1986). Calculation of Protein Conformation from Circular Dichroism. *Methods Enzymol.* 130, 208–269.

Zarros, A., Johnson, S.A., Mackenzie-Gray Scott, C.A., i Baillie, G.S. (2015). Cytodynamics and endpoint selection for a reliable in vitro assessment of nanoneurotoxicity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11, 407–408.

Zhou, L.L., i Roovers, J. (1993). Synthesis of Novel Carbosilane Dendritic Macromolecules. *Macromolecules* 26, 963–968.

Zhou, L.-L., Hadjichristidis, N., Toporowski, P.M., i Roovers, J. (1992). Synthesis and Properties of Regular Star Polybutadienes with 32 Arms. *Rubber Chem. Technol.* 65, 303–314.

Zhou, Z., Liu, X., Zhu, D., Wang, Y., Zhang, Z., Zhou, X., Qiu, N., Chen, X., i Shen, Y. (2017). Nonviral cancer gene therapy: Delivery cascade and vector nanoproperty integration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 115, 115–154.

---

**Dorobek naukowy***Wykaz publikacji:*

1. Michlewska S., Ionov M., Maroto-Díaz M., **Szwed A.**, Ihnatsyeu-Kachan A., Abashkin V., Dzmitruk V., Rogalska A., Denel M., Gapinska M., Shcharbin D., Gomez Ramirez R., de la Mata F., Bryszewska M., Ruthenium dendrimers against acute promyelocytic leukemia: in vitro studies on HL-60 cells., *Future Med Chem.* 11(14):1741-1756. doi: 10.4155/fmc-2018-0274. 9 Jul 2019.  
IF = 3,617; pkt MNiSW = 40
2. Pasternak-Mnich K., Ziemia B., **Szwed A.**, Kopacz K., Synder M., Bryszewska M., Kujawa J., Effect of Photobiomodulation Therapy on the Increase of Viability and Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells., *Lasers Surg Med.*, 51(9):824-833. doi: 10.1002/lsm.23107. 4 Jun 2019.  
IF = 3,262; pkt MNiSW = 40
3. Michlewska S., Ionov M., Maroto-Díaz M., **Szwed A.**, Ihnatsyeu-Kachan A., Loznikova S., Shcharbin D., Maly M., Ramirez R., de la Mata F., Bryszewska M., Ruthenium dendrimers as carriers for anticancer siRNA., *J Inorg Biochem.*, 181:18-27. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.01.001., 12 Jan 2018  
IF = 3,063; pkt MNiSW = 35
4. **Szwed A.**, Milowska K., Ionov M., Shcharbin D., Moreno S., Gomez-Ramirez R., de la Mata F. J., Majoral J. P., Bryszewska M., Gabryelak T., Interaction between dendrimers and regulatory proteins. Comparison of effects of carbosilane and carbosilane–viologen–phosphorus dendrimers, *RSC Adv.*, 6, 97546-97554, doi: 10.1039/C6RA16558C, 07 Oct 2016  
IF = 3,289; pkt MNiSW = 35
5. Milowska K., **Szwed A.**, Mutrynowska M., Gomez-Ramirez R., de la Mata FJ., Gabryelak T., Bryszewska M., Carbosilane dendrimers inhibit  $\alpha$ -synuclein fibrillation and prevent cells from rotenone-induced damage., *Int J Pharm.*, 48 (1-2):268-75. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.066., 30 Apr 2015  
IF = 3,994; pkt MNiSW = 35
6. Moreno S., **Szwed A.**, El Brahmī N., Milowska K., Kurowska J., Fuentes-Paniagua E., Pedziwiatr-Werbicka E., Gabryelak T., Katir N., de la Mata J., Muñoz-Fernández MA., Gomez-Ramirez R., Caminade AM., Majoral JP., Bryszewska M., Synthesis, Characterization and Biological Properties of New Hybrid Carbosilane-Viologen-Phosphorus Dendrimers, *RSC Adv.*, 2015,5, 25942-25958, doi: 10.1039/C5RA00960J, 05 Mar 2015  
IF = 3,289; pkt MNiSW = 35

7. Miłowska K., **Szwed A.**, Zablocka M., Caminade AM., Majoral JP., Mignani S., Gabryelak T., Bryszewska M., In vitro PAMAM, phosphorus and viologen-phosphorus dendrimers prevent rotenone-induced cell damage. Int J Pharm., 474(1-2):42-9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.08.010. 20 Oct 2014  
IF = 3,994; pkt MNiSW = 35
8. **Szwed A.**, Miłowska K., The role of proteins in neurodegenerative disease. Postepy Hig Med Dosw (Online), 66:187-95. Review. Polish. , 16 Apr 2012  
IF = 0,795; pkt MNiSW = 15

**Sumaryczny IF = 25,303**

**Sumaryczne pkt MNiSW = 270**

*Doniesienia konferencyjne w formie wystąpień ustnych:*

1. **Szwed A.**, Miłowska K., Gabryelak T., Carbosilane-viologene-phosphorus dendrimers as non-viral nanocarriers for siRNA delivery. V International Conference of Biophysics Students, 20-22 czerwiec 2016r, Kraków, pp. 25
2. **Szwed A.**, Miłowska K., Bryszewska M., Gabryelak T., Wpływ dendrymerów karbokrzemowo-viologenowo-fosforowych na strukturę drugorzędową wybranych białek regulatorowych, IV Studencka Konferencja Biologii Molekularnej, 26-28 marzec 2015 r., Łódź, pp. 18
3. **Szwed A.**, Rola dendrymerów w procesie agregacji białek, Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki, 1 grudzień 2013, Poznań
4. **Szwed A.**, Miłowska K., Gabryelak T., Wróg u bram, czyli rotenon w służbie ludzkości. IX Konferencja Bory Tucholskie – Ochrona Biosfery, 29 - 30 wrzesień 2014, pp. 28

*Doniesienia konferencyjne w formie plakatów:*

1. **Szwed A.**, Miłowska K. „Rola dendrymerów PAMAM i fosforowych w uszkodzeniach embrionalnych komórek hipokampa myszy mHippoE-18 wywołanych działaniem rotenonu.” II Ogólnopolski Zjazd Młodych Biotechnologów, 16-17 marzec 2013 r., Katowice, pp. 35
2. **Szwed A.**, Miłowska K. „Ocena toksyczności rotenonu w stosunku do embrionalnych komórek hipokampa myszy (mHippoE-18).” II Studencka Konferencja Biologii Molekularnej, 4-6 kwiecień 2013, Łódź, pp. 68
3. **Szwed A.**, Miłowska K., „Comparison of the protective role of PAMAM and phosphorus dendrimers in rotenone-induced toxicity on embryonic mouse hippocampal cell line mHippoE-18.” International Conference of Biophysics Students, 24-26 May 2013, Kraków, pp.68
4. **Szwed A.**, Kurowska J., Miłowska K., Bryszewska M., Gabryelak T., Biologiczne właściwości dendrymerów wiologenowo-karbokrzemowo-fosforowych(SMT), III Studencka Konferencja Biologii Molekularnej, 20-22 marzec 2014 r., Łódź, pp. 100
5. **Szwed A.**, Kurowska J., Miłowska K., Majoral J.P., Gomez-Ramirez R., De La Mata J.F., Gabryelak T. Comparison of the biological properties of two generations of viologen-phosphorus-carbosilane (SMT) dendrimers based on the interaction with HAS, the influence on B14 cell line and erythrocytes. The XI Congress of Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists, 17 – 20 czerwiec 2014r., Mińsk, pp. 368-371
6. **Szwed A.**, Kurowska J., Miłowska K., Majoral J.P., Gomez-Ramirez R., De La Mata J.F., Bryszewska M., Gabryelak T. Toxicity evaluation of two generations of viologen-carbosilane-phosphorus, Kongres BIO 2014, 9-12 wrzesień 2014r., Warszawa, pp. 298-299
7. **Szwed A.**, Miłowska K., Bryszewska M., Gomez-Ramirez R., de la Mata J., Gabryelak T., Carbosilane-viologen-phosphorus interaction with proteins based on alkaline phosphatase, 22nd Young Research Fellows Meeting, 04-06 luty 2015 r., Paris, PO-121
8. **Szwed A.**, Miłowska K., Gabryelak T., Ocena właściwości biologicznych dendrymerów hybrydowych na podstawie ich interakcji z białkami, I Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, 20-22 kwiecień 2015 r., Łódź, pp. 168

9. Wasiak T., Kądzioła K., **Szwed A.**, Miłowska K., Gabryelak T., Komorowski P., Makowski K., Walkowiak B., Interaction between lactate dehydrogenase (LDH) and dendrimers, Biacore Meeting Berlin 2015, 23-24 wrzesień 2015, Berlin, Niemcy
10. **Szwed A.**, Miłowska K., Gabryelak T., Dendrymery karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe jako nośniki siRNA, II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, 12-14 maj 2016 r., Łódź, pp.137
11. **Szwed A.**, Miłowska K., Ionov M., Bryszewska M., Gabryelak T., Carbosilane-wiologen-phosphorus dendrimers as potential nanocarriers of antiapoptotic siRNAs in cancer therapy, Integral Clinical and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer, 13-15 czerwiec 2016, Kijów, Ukraina, pp. 12
12. **Szwed A.**, Miłowska K., Gomez-Ramirez R., F. J. De La Mata, M. Bryszewska, T. Gabryelak., Hybrid dendrimers and anti-apoptotic siRNAs – complex formation, XVI Conference of the Polish Biophysical Society, 28 czerwiec – 1 lipiec 2016, Ryn, pp.58

*Stáže naukowe:*

1. **06.12.2017 – 20.12.2017** – staż naukowy w ramach programu wymiany osobowej pracowników naukowych między Polską, a Republiką Słowacką na lata 2016 – 2017, Katedra Fizyki Jądrowej, Uniwersytet Komeńskiego, Bratysława, Słowacja,
2. **08.11.2016 – 15.12.2016** – staż naukowy w ramach projektu IRSES „NANOGENE”, Instytut Biologii Chemicznej i Medycyny Podstawowej, Rosyjska Akademia Nauk, Nowosybirsk, Rosja,
3. **28.02.2016 – 30.03.2016** – staż naukowy w ramach projektu IRSES „NANOGENE”, Instytut Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruska Narodowa Akademia Nauk, Mińsk, Białoruś,
4. **01.06.2015 – 15.07.2015** – staż naukowy w ramach projektu IRSES „NANOGENE”, Instytut Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruska Narodowa Akademia Nauk, Mińsk, Białoruś.