

Streszczenie w języku polskim

Ocena toksyczności dendrymerów wiologenowo-fosforowych oraz fosforowych wobec mysich komórek nerwowych linii N2a i mHippoE-18

Jedną z bardzo ważnych grup dendrymerów, które zsyntetyzowane zostały po raz pierwszy w przez Rengana i Engela w 1990 roku, są dendrymery zawierające fosfor. Ogromny wkład w rozwój strategii syntezy dendrymerów fosforowych o nowych właściwościach poczynił zespół badawczy profesora Majoral'a (Tuluza, Francja). Ważnym krokiem było zsyntetyzowanie dendrymerów fosforowych polikationowych, polianionowych oraz neutralnych, rozpuszczalnych w wodzie. Wykazano szereg potencjalnych zastosowań dendrymerów fosforowych jako przenośników leków lub kwasów nukleinowych. Ponadto, związki te same w sobie cechują się aktywnością biologiczną, między innymi przeciwwirusową. Niezwykle istotne było odkrycie, że kationowe dendrymery fosforowe, CPDs (ang. *cationic phosphorus dendrimers*) posiadają zdolność hamowania fibrylacji i agregacji białek zaangażowanych w rozwój infekcji prionowych oraz chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimer'a i Parkinson'a.

Zespół profesora Majoral'a jako pierwszy zsyntetyzował również dendrymery zawierające w swojej strukturze jednocześnie atomy fosforu oraz jednostki wiologenowe - dendrymery wiologenowo-fosforowe, VPDs (ang. *viologen-phosphorus dendrimers*). Badania nad biologicznymi właściwościami tych związków pokazały, że część z nich wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową. Co istotne, podobnie jak CPDs, również VPDs mogą przyczyniać się do inhibicji procesów neurodegeneracyjnych.

Zarówno dendrymery fosforowe, jak i wiologenowo-fosforowe wydają się zatem być obiecującymi nanocząsteczkami w aspekcie ich potencjalnych terapeutycznych zastosowań. Jednak aplikacyjność nowych związków jest w dużym stopniu zdeterminowana przez ich toksyczność. Do tej pory wpływ CPDs i VPDs na żywotność komórek oceniany był jedynie na podstawie prostych, standardowych testów cytotoksyczności. Z tego powodu, w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, zdecydowano się na zbadanie wybranych parametrów odpowiedzi komórkowej na

traktowanie dendrymerami fosforowymi oraz wiologenowo-fosforowymi. Do badań wykorzystane zostały dwa dendrymery fosforowe - generacji 2 (G2) oraz generacji 3 (G3), a także dwa dendrymery wiologenowo-fosforowe generacji zerowej (G0) - VPD1 i VPD3. Ze względu na wspomniany wyżej potencjał obu grup dendrymerów w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych oraz wykorzystanie dendrymerów w badaniach przeciwnowotworowych, wybrano dwie linie mysich komórek nerwowych - linię nowotworową, którą stanowią komórki nerwiaka płodowego (*neuroblastoma*) N2a oraz linię prawidłową, którą stanowią embrionalne komórki hipokampalne mHippoE-18.

Celem prowadzonych badań było określenie stopnia cytotoksyczności VPDs i CPDs wobec mysich linii komórek nerwowych na podstawie analizy wybranych parametrów odpowiedzi komórkowej. Ponadto, badania miały na celu porównanie cytotoksyczności dwóch grup dendrymerów, wrażliwości badanych linii komórkowych na te dendrymery, a także, na podstawie uzyskanych wyników, ocenę możliwości potencjalnego wykorzystania tych związków w nanomedycynie.

Zastosowano pięć stężeń VPDs w zakresie 1 - 20 μM oraz CPDs w zakresie 0,5 - 3 μM . Komórki inkubowane były z dendrymerami przez 24 h w warunkach hodowlanych. Toksyczność dendrymerów oceniana była na podstawie analizy reakcji komórkowych takich jak aktywność komórkowych dehydrogenaz (test MTT), produkcja reaktywnych form tlenu (RFT), aktywność oksydacyjna mitochondriów, zmiany potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi\text{m}$), zmiany poziomu zredukowanego glutationu (GSH), aktywność katalazy (CAT), a także wielkości frakcji komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych. Ponadto, rodzaj śmierci komórki indukowanej dendrymerami potwierdzony został dodatkowymi testami, czyli poprzez pomiar stężenia cytochromu c (Cyt c) w cytoplazmie, aktywności kaspazy 3, analizę stopnia fragmentacji DNA, a także zmian w cyklu komórkowym.

Test cytotoksyczności wykazał, że dendrymery wiologenowo-fosforowe cechują się niską toksycznością. Żywotność komórek N2a po traktowaniu najwyższymi stężeniami VPDs (20 μM) nie spadła poniżej 70%, natomiast żywotność komórek hipokampalnych została zredukowana do 65% i 76% po zastosowaniu odpowiednio VPD1 i VPD3. CPDs okazały się związkami silnie toksycznymi. Parametr IC_{50} dla dendrymeru CPD G2

i G3 wynosi odpowiednio 1,84 μM i 1,74 μM , w przypadku linii N2a, oraz 2,33 μM i 1,31 μM dla linii mHippoE-18.

Ponieważ produkcja RFT towarzyszy procesowi śmierci komórki sprawdzono ogólny poziom RFT oraz aktywność oksydacyjną mitochondriów w komórkach po aplikacji dendrymerów obu grup. W przypadku VPDs uzyskano zaskakujący wynik, ponieważ związki te nie spowodowały wzmożonej generacji RFT w komórkach, przeciwnie, obniżyły w niewielkim stopniu ich poziom. Aktywność oksydacyjna mitochondriów nie uległa zmianie po traktowaniu komórek dendrymerami VPD w przypadku linii N2a (jedynie VPD1 przy stężeniu 10 μM obniżył nieznacznie aktywność mitochondrialną). Parametr ten był natomiast podwyższony w linii mHippoE-18. Traktowanie komórek CPDs doprowadziło do bardzo silnej produkcji RFT w obu liniach komórkowych, szczególnie przy dwóch najwyższych stężeniach (2 i 3 μM). Podobnie, aktywność oksydacyjna mitochondriów wzrastała wraz ze wzrastającym stężeniem dendrymerów. Zarówno dla linii N2a, jak i mHippoE-18 opisywane efekty były silniejsze w przypadku dendrymeru G3 niż G2.

Dysfunkcja mitochondriów w czasie śmierci komórki przejawia się również zmianami w potencjale błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi\text{m}$). Wykonane analizy wskazują, że VPDs powodują niewielką depolaryzację błony mitochondrialnej w komórkach N2a, natomiast w komórkach hipokampalnych dochodzi do niewielkiego spadku lub wzrostu $\Delta\Psi\text{m}$. Traktowanie komórek CPDs doprowadziło do niewielkiej hiperpolaryzacji błony mitochondrialnej przy niskich stężeniach, podczas gdy zastosowanie wyższych stężeń doprowadziło do silnego spadku $\Delta\Psi\text{m}$.

Ponieważ VPDs obniżały poziom RTF sprawdzono, czy efekt ten związany jest z komórkowymi systemami antyoksydacyjnymi - aktywnością katalazy (CAT) oraz poziomem glutationu (GSH). Na przykładzie linii mHippoE-18 wykazano, że zarówno VPD1, jak i VPD3 powodują niewielki wzrost aktywności CAT, który może być odpowiedzialny za redukcję poziomu RFT. Nie zaobserwowano natomiast zmian w poziomie GSH.

Pomiary cytometryczne komórek podwójnie barwionych znacznikami pozwalającymi odróżnić komórki żywe od apoptotycznych oraz martwych (odpowiednio YO-PRO-1 i jodek propidyny) wykazały, że VPDs nie indukują apoptozy ani nekrozy w linii N2a,

natomiast w linii mHippoE-18 prowadzą do niewielkiego wzrostu frakcji komórek apoptotycznych. W przeciwieństwie do VPDs, CPDs prowadzą do znaczącego wzrostu populacji komórek martwych przy stężeniach 1 - 3 μM . Dla obu linii komórkowych oraz obu grup dendrymerów wyniki te zostały potwierdzone obserwacjami wykonanymi przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

Analiza morfologii komórek przeprowadzona przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego oraz cytometru przepływowego wskazuje, że zarówno w komórkach N2a, jak i mHippoE-18 pod wpływem VPDs nie dochodzi do istotnych zmian morfologicznych. Natomiast w wyniku traktowania komórek obu linii CPDs, obserwowana jest utrata normalnej morfologii komórek, które stają się okrągłe i tracą zdolności adhezyjne. Pomiar cytometryczne również wskazują na występowanie populacji komórek znacznie mniejszych i bardziej granulanych niż komórki kontrolne.

Ponieważ proces śmierci komórki w odpowiedzi na traktowanie toksycznymi związkami często wiąże się z zaburzeniami cyklu komórkowego, sprawdzono czy badane dendrymery wpływają na rozkład faz cyklu komórkowego. W przypadku VPDs cykl komórkowy badano tylko na linii mHippoE-18, czyli na tej, w której zaobserwowano niewielką indukcję apoptozy. Uzyskane wyniki nie wykazały jednak istotnych zaburzeń w cyklu komórkowym tej linii, co oznacza, że niewielki wzrost frakcji komórek apoptotycznych nie znajduje odzwierciedlenia w profilu faz cyklu komórkowego. Silnie toksyczne CPDs spowodowały natomiast niewielkie zmiany w cyklu komórkowym N2a i mHippoE-18. Nie doszło do typowego dla apoptozy zatrzymania dużej frakcji komórek w jednej z faz cyklu, potwierdzając, że komórki umierają na drodze nekrozy.

Kolejny etap badań miał na celu dodatkowe potwierdzenie szlaku śmierci komórki indukowanego przez CPDs. W tym celu sprawdzono czy dochodzi do wypływu Cyt c z mitochondriów do cytoplazmy. Wbrew oczekiwaniom wykryto zwiększone stężenie Cyt c w cytoplazmie w porównaniu do komórek kontrolnych. Nie jest to jednak jednoznaczne z indukcją procesu apoptozy, gdyż uwalnianie Cyt c z mitochondriów może zachodzić również w czasie nekrozy. Nie zaobserwowano natomiast zwiększonej aktywności kaspazy 3, ani znaczącej fragmentacji DNA, czyli procesów typowych dla apoptozy.

Z wyników uzyskanych w ramach rozprawy doktorskiej można wyciągnąć następujące wnioski:

- dendrymery wiologenowo-fosforowe, które posiadają niewielką liczbę ładunku dodatniego we wnętrzu cząsteczki, są związkami mało toksycznymi dla komórek N2a oraz mHippoE-18, obniżają poziom RFT, są zatem szczególnie atrakcyjne z punktu widzenia potencjalnych zastosowań biomedycznych,
- kationowe dendrymery fosforowe, które posiadają dużą liczbę ładunku dodatniego na powierzchni cząsteczki, są związkami toksycznymi dla badanych mysich linii komórek nerwowych, indukują nekrozę, co stanowi ograniczenie dla ich potencjalnych zastosowań w medycynie,
- modyfikacja powierzchni CPDs związkami obniżającymi ich toksyczność wydaje się być rozsądną strategią ulepszania tych związków,
- **liczba ładunków dodatnich oraz ich lokalizacja (na powierzchni lub we wnętrzu cząsteczki) ma znaczący wpływ na toksyczność badanych dendrymerów.**

Przeprowadzone badania i uzyskane rezultaty przyczyniają się do lepszego poznania oddziaływań dendrymerów zawierających fosfor z komórkami nerwowymi. Są one pomocne w ustalaniu dalszego kierunku prac nad tymi nanocząsteczkami pod kątem ich modyfikacji i potencjalnego wykorzystania jako związków terapeutycznych lub nośników innych makromolekuł. Niewątpliwie konieczne są dalsze badania nad bezpieczeństwem dendrymerów fosforowych oraz wiologenowo-fosforowych z użyciem innych linii komórkowych oraz nad mechanizmami ich oddziaływania z układami biologicznymi.

Streszczenie w języku angielskim

Assessment of toxicity of viologen-phosphorus and phosphorus dendrimers againsts two murine neural cell lines - N2a and mHippoE-18.

Phosphorus dendrimers constitute an important group of dendrimers. They were first synthesised by Rengana and Engela in 1990. Nevertheless, a huge contribution to the development of new strategies of phosphorus dendrimers synthesis was made by professor Majoral's team (Toulouse, France). They were successful in synthesising neutral, polyanionic and polycationic phosphorus dendrimers soluble in water. An array of potential applications of these compounds was found including their use as carriers of drugs and nucleic acids. Importantly, these nanomolecules were shown to exhibit biological activity per se, for example anti-viral activity. Moreover, cationic phosphorus dendrimers (CPDs) were demonstrated to possess the ability to inhibit fibrillation and aggregation of proteins involved in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, as well as prion infections.

Majoral's team was also the first one, which synthesised dendrimers containing both phosphorus atoms and viologen groups in their structure, called viologen-phosphorus dendrimers (VPDs). Studies on biological properties of these compounds revealed that some of them possess antipathogenic activity. Moreover, similarly to CPDs, also VPDs have a potential to inhibit neurodegenerative processes. Thus, both phosphorus and viologen-phosphorus dendrimers appear to be promising nanomolecules in the aspect of their possible therapeutic applications. However, the applicability of new compounds is to a large degree determined by their toxicity. So far, the influence of VPDs and CPDs on the viability of cells has been assessed only based on simple, standard cytotoxicity tests. Therefore, the present dissertation is focused on studies of chosen aspects of the cell response to treatment with phosphorus and viologen-phosphorus dendrimers. Two low generations of CPDs were used - generation 2 (G2) and generation 3 (G3), as well as two VPDs of zero generation (G0) - VPD1 and VPD3. Due to the potential of both groups of dendrimers for treating neurodegenerative diseases, and application of dendrimers in anticancer research, two neural cell lines were selected - a cancerous

murine neuroblastoma cell line (N2a) and a normal embryonic mouse hippocampal cell line (mHippoE-18).

The goal of the studies was to determine the level of cytotoxicity of VPDs and CPDs against murine neural cell lines based on the analysis of chosen parameters of the cell response. Additional aim of the research was the comparison of two groups of dendrimers, sensitivity of tested cell lines to these dendrimers, as well as the assessment of the potential utility of the studied compounds in nanomedicine.

Five concentrations of VPDs (1 - 20 μM) and CPDs (0.5 - 3 μM) were chosen for experiments. Cells were incubated with dendrimers for 24 h in growing conditions. Toxicity of dendrimers was assessed based on the studies of cell reactions, including the activity of cellular dehydrogenases (MTT test), generation of reactive oxygen species (ROS), oxidative activity of mitochondria, alterations in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$), changes in the level of glutathione (GSH), the activity of catalase (CAT), as well as the analysis of fractions of apoptotic and necrotic cells. Besides, the type of cell death induced by dendrimers was confirmed by additional tests such as cytochrome c (Cyt c) release from mitochondria to the cytoplasm, the activity of caspase 3, the analysis of DNA fragmentation and alterations in the cell cycle.

MTT test revealed that viologen-phosphorus dendrimers are characterised by low cytotoxicity. The viability of N2a cells after treatment with the highest concentration of VPDs (20 μM) did not fall below 70%, while the viability of hippocampal cells was reduced to 65% and 76% after application of VPD1 and VPD3, respectively. On the other hand, CPDs were shown to be highly toxic. IC_{50} value for CPD G2 and G3 amounted to 1.84 μM and 1.74 μM , respectively, in the case of N2a cell line, while for mHippoE-18 cell line this parameter equalled to 2.33 μM and 1.33 μM for G2 and G3, respectively.

Since ROS formation accompanies cell death processes, the general level of ROS as well as the oxidative activity of mitochondria were studied in tested cell lines after dendrimer treatment. Surprising results were obtained for VPDs, because these nanomolecules did not increase ROS generation in cells. On the contrary, VPDs led to the small decrease in ROS level as compared to the control. VPDs application did not influence oxidative activity of mitochondria in N2a cells (only 10 μM of VPD1 slightly

decreased mitochondrial activity), although this cell response was increased in mHippoE-18 cell line. Treatment of cells with CPDs led to the strong ROS generation, especially at two highest concentrations (2 i 3 μM). Similarly, oxidative activity of mitochondria increased along with the increasing dose of dendrimers. For both cell lines described effects were more pronounced for G3 than G2.

Dysfunction of mitochondria during cell death is also manifested in alterations of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$). The results showed that VPDs caused only small depolarisation of mitochondrial membrane in N2a cells, while in hippocampal cells small fluctuations (decrease or increase) dependent on the concentration were observed. CPDs caused small hyperpolarisation of mitochondrial membrane at lower concentrations and strong depolarisation at higher concentrations.

Because VPDs lowered the general ROS level, it was checked if this effect was related to cellular antioxidative systems - the activity of catalase (CAT) and glutathione (GSH) level. Using mHippoE-18 cell line as an example it was demonstrated that both VPD1 and VPD3 caused slight increase in CAT activity, which can be, at least partly, responsible for the reduction in ROS level. No alterations in GSH level were observed.

Flow cytometric measurements of cells double-stained with dyes selective for apoptotic and dead cells (YO-PRO-1 and propidium iodide, respectively) showed that VPDs did not induce any type of cell death in N2a cell line, but led to the small increase in the fraction of apoptotic cells in mHippoE-18 cell line. In contrast to VPDs, treatment of cells with CPDs caused a significant increase in the population of dead cells at concentrations 1 - 3 μM . For both cell lines these results were confirmed by observations of double-stained cells with the use of fluorescent microscope.

Analyses of cell morphology performed with the use of phase contrast microscope and flow cytometer indicate that VPDs application to both N2a and mHippoE-18 cell lines did not lead to significant morphological changes. On the other hand, as a result of the cell treatment with CPDs, the loss of normal cell morphology was observed. Cells became round in shape and lost their adhesive capacity. Besides, flow cytometric measurements revealed the existence of two populations of cells - one similar to the control and the second one consisting of small and strongly granular cells.

Treatment of cells with toxic compounds is often associated with cell cycle perturbations, which correlate with cell death. Therefore, it was checked if dendrimers influence cell cycle phases distribution. In the case of VPDs, cell cycle was studied only on mHippoE-18 cell line, as in N2a cell line no cell death was observed. Obtained results did not show significant changes in the cell cycle profile, indicating that the small induction of apoptosis in hippocampal cells is not reflected in the cell cycle phases distribution. In contrast, toxic CPDs caused some alterations in the cell cycle of both N2a and mHippoE-18 cell lines. However, there was no pronounced arrest of the cell cycle in one of the phases, which is typical for apoptosis, confirming that cells die via the necrotic cell death.

The next set of experiments was aimed at corroborating previous results, which indicated induction of necrosis in neural cells by CPDs. To this end, studies on cytochrome c (Cyt c) release from mitochondria to the cytoplasm, the activity of caspase 3 and DNA fragmentation were performed. Unexpectedly, increased concentration of Cyt c in the cytoplasm was found as compared to the control. Nevertheless, this is not tantamount to the induction of apoptosis, since Cyt c release from mitochondria can also occur during necrosis. Besides, CPDs did not increase the activity of caspase 3, and did not lead to considerable DNA fragmentation, processes characteristic for apoptosis.

Several conclusions can be drawn based on findings included in the present dissertation:

- viologen-phosphorus dendrimers, which possess a small number of positive charges inside the molecule, are weakly toxic to N2a and mHippoE-18 cell lines, decrease ROS level, and thus are particularly attractive for potential biomedical applications,
- cationic phosphorus dendrimers, which possess a big number of positive charges on the surface of the molecule, are toxic to murine neural cell lines, they induce necrosis, which pose a limitation for their applications to living organisms,
- modification of the surface of CPDs with compounds decreasing their cytotoxicity seems to be a reasonable strategy for improving properties of these compounds,

- **the number and location (inside or on the surface of the molecule) of positive charges have a considerable influence on the cytotoxicity of tested dendrimers.**

Studies performed as a part of the present dissertation contribute to better understanding of interactions between phosphorus-containing dendrimers and neural cells. Moreover, obtained results can be helpful in establishing further direction of works on these nanomolecules in the aspect of their modifications, improvement, and potential applications as therapeutic compounds or carriers of other macromolecules. Undoubtedly, more research on the safety of viologen-phosphorus and phosphorus dendrimers with the use of other cell lines are needed as well as on mechanisms of their interactions with biological systems.