

Streszczenie w języku polskim

Dendrymery to grupa polimerów, która od lat stanowi przedmiot badań w kontekście zastosowania tych nanocząsteczek w leczeniu i diagnostyce. Ze względu na swoją strukturę, polimery te mogą pełnić rolę nośników mniejszych cząsteczek, takich jak leki czy czynniki wykorzystywane w obrazowaniu medycznym. Badania nad potencjalnym zastosowaniem dendrymerów dotyczą w szczególności leków przeciwnowotworowych, co jest związane z ograniczeniami konwencjonalnych terapii, takimi jak niska selektywność, słaba rozpuszczalność leków, skutki uboczne. Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że zastosowanie nośników, np. dendrymerów, może pozwolić na pokonanie tych ograniczeń i zwiększyć efektywność leczenia. W ostatnich latach spektrum badań dotyczących dendrymerów poszerzyło się o badania w obszarze terapii fotodynamicznej (ang. Photodynamic Therapy – PDT). Terapia fotodynamiczna nowotworów rozwinęła się w ostatnich kilku dekadach jako alternatywa dla chemioterapii i radioterapii. Metoda ta opiera się na zastosowaniu fotouczulaczy, które dopiero po naświetleniu światłem widzialnym o odpowiedniej długości fali wywołują efekt toksyczny.

Jednakże, stosowanie fotouczulaczy napotyka podobne ograniczenia jak konwencjonalna chemioterapia. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie, czy wybrane dendrymery utworzą kompleksy z fotouczulaczami oraz czy wywołany przez kompleksy efekt fototoksyczny będzie silniejszy niż dla wolnych fotouczulaczy. Do badań wybrane zostały dwa dendrymery fosforowe: kationowy dendrymer fosforowy trzeciej generacji posiadający na powierzchni 48 grup amoniowych, oraz anionowy dendrymer fosforowy drugiej generacji posiadający 24 karboksylowe grupy powierzchniowe. Jako fotouczulacze zostały wybrane róż bengalski oraz błękit metylenowy.

Prowadzone badania składały się z dwóch głównych etapów badawczych. Pierwszy etap obejmował charakterystykę potencjalnych oddziaływań pomiędzy dendrymerami fosforowymi i fotouczulaczami. Drugi etap stanowiły badania *in vitro* mające na celu porównanie aktywności fotodynamicznej kompleksów fotouczulacz-dendrymer oraz wolnych fotouczulaczy. Oddziaływania pomiędzy dendrymerami i fotouczulaczami zostały zbadane za pomocą metod spektroskopowych. Wykorzystując metodę spektrofotometryczną, zbadano

oddziaływania pomiędzy błękitem metylenowym i dendrymerem anionowym. Ze względu na właściwości fluorescencyjne cząsteczki róż bengalskiego, oddziaływania pomiędzy tym fotouczulaczem i dendrymerem kationowym zostały zbadane za pomocą technik spektrofluorymetrycznych.

Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że tworzą się dwa kompleksy: kompleks błękit metylenowy-dendrymer anionowy oraz kompleks róż bengalski-dendrymer kationowy. Na podstawie analizy obserwowanych zmian spektroskopowych fotouczulaczy, możliwe było graficzne wyznaczenie stechiometrii kompleksów. W przypadku kompleksu błękit metylenowy:dendrymer anionowy stechiometria ta wynosiła ok. 9:1. Dla kompleksu róż bengalski:dendrymer kationowy wyznaczona stechiometria wynosiła ok. 7:1. Zbadano także stabilność kompleksów oraz wpływ siły jonowej na proces ich tworzenia. Obydwa kompleksy wykazały stabilność w czasie. W przypadku tworzenia kompleksu błękitu metylenowego nie stwierdzono wpływu siły jonowej, co sugerowało, że kompleks ten może być tworzony nie tylko przez oddziaływania elektrostatyczne. Oddziaływania pomiędzy badanymi związkami badano także za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. Fourier Transform Infrared spectroscopy – FTIR). Otrzymane wyniki pozwoliły potwierdzić, że kompleksy fotouczulacz-dendrymer mają charakter elektrostatyczny, a w przypadku błękitu metylenowego możliwe były jeszcze oddziaływania π - π z pierścieniami aromatycznymi we wnętrzu dendrymeru anionowego. Ponadto, wykryto także słabe oddziaływania pomiędzy błękitem metylenowym i dendrymerem kationowym. Do dalszych badań wybrano dwa kompleksy: błękit metylenowy-dendrymer anionowy oraz róż bengalski-dendrymer kationowy. Stechiometria kompleksów fotouczulacz:dendrymer wybrana do dalszych eksperymentów wynosiła 5:1.

Oddziaływania cząsteczek fotouczulacza z nośnikiem mogą znacznie wpływać na wywoływany efekt fotodynamiczny. Efekt ten określono w środowisku wodnym, na podstawie oznaczenia poziomu tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$) generowanego przez fotouczulacze i kompleksy z wykorzystaniem fluorescencyjnego znacznika Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG). Zaobserwowano liniową zależność fluorescencji SOSG od czasu naświetlania próbek zawierających fotouczulacze, co świadczyło o wzroście ilości tlenu singletowego. Naświetlanie próbek prowadzono za pomocą lampy Q.Light Pro Unit wyposażonej w zestaw filtrów do terapii fotodynamicznej.

Kompleks błękit metylenowy-dendrymer anionowy wykazał niższą zdolność generowania tlenu singletowego niż wolny błękit metylenowy. W przypadku kompleksu róż bengalski-dendrymer kationowy zaobserwowano, że kompleks generował więcej $^1\text{O}_2$, a także, że proces ten zachodził szybciej niż w przypadku wolnego fotouczulacza. Dodatkowo, stwierdzono zdolność dendrymeru kationowego do generowania $^1\text{O}_2$ po naświetleniu. Na tej podstawie wywnioskowano, że w przypadku kompleksu róż bengalski-dendrymer kationowy zachodzi efekt synergistyczny.

Następnie, rozpoczęto etap badań *in vitro*. Celem tego etapu badań było określenie efektywności wnikania kompleksów do komórek oraz porównanie cytotoksyczności kompleksów i wolnych fotouczulaczy. Jako model badawczy zostały wybrane trzy mysie linie komórkowe raka postawnokomórkowego skóry (ASZ, BSZ oraz CSZ). Linie te zostały wyprowadzone z myszy, u których inaktywowano gen PTCH1 i wyindukowano raka podstawnokomórkowego skóry, wykorzystując m. in. promieniowanie UV oraz promieniowanie jonizujące. Myszy te posiadały również różną ekspresję markerów charakterystycznych dla guzów BCC. Rak podstawnokomórkowy skóry charakteryzuje się wolnym tempem wzrostu, jest zmianą miejscową i bardzo rzadko tworzy przerzuty. Z tego względu stanowi on odpowiedni model badawczy w aspekcie potencjalnego zastosowania PDT z wykorzystaniem dendrymerów jako nośników fotouczulaczy. W celu zbadania szybkości wnikania różu bengalskiego i jego kompleksu z dendrymerem wykorzystano technikę cytometrii przepływowej. Wnikanie błękitu metylenowego i kompleksu błękit metylenowy-dendrymer anionowy oceniono wykorzystując metodę spektrofotometryczną. Kompleksy efektywniej wnikają do komórek w porównaniu z wolnymi fotouczulaczami. Na podstawie tych eksperymentów wyznaczono także optymalny czas inkubacji komórek z badanymi związkami, wynoszący 5 godzin.

Ze względu na specyfikę terapii fotodynamicznej, kluczową cechą dobrego fotouczulacza jest brak toksycznego efektu bez zastosowania naświetlenia, czyli niska tzw. „toksyczność ciemna”. Dlatego też następnym krokiem było zbadanie cytotoksyczności w ciemności badanych fotouczulaczy, dendrymerów oraz kompleksów. Badania zostały przeprowadzone za pomocą testu mikro płytkowego MTT. W przypadku błękitu metylenowego zaobserwowano niewielki efekt cytotoksyczny wywołany przez błękit metylenowy, kompleks i dendrymer

w najwyższych stosowanych stężeniach. W przypadku różu bengalskiego, kompleksu i dendrymeru kationowego, nie zaobserwowano efektu cytotoksycznego dla wszystkich trzech linii komórkowych. Następnie wykonano testy cytotoksyczności badanych związków po naświetleniu. Stwierdzono, że oba kompleksy wykazały wyższy poziom cytotoksyczności niż wolne fotouczulacze. Najwyższe różnice zaobserwowano dla błękitu metylenowego w stężeniu 5 μM , natomiast dla różu bengalskiego w stężeniu 0,5 μM . Co ważne, obydwa kompleksy były toksyczne wobec wszystkich trzech linii raka podstawnkomórkowego skóry. Ostatnia część badań obejmowała oznaczenie frakcji komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych, oraz poziomu reaktywnych form tlenu (RFT). Pomiar cytometryczny podwójnie barwionych komórek wykazały, że kompleksy fotouczulacz-dendrymer wywoływały apoptozę w większym stopniu niż nekrozę w komórkach po naświetleniu. Spektrofluorymetryczne oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu wykazało znacznie wyższy poziom RFT w komórkach naświetlanych po traktowaniu ich kompleksami.

Na podstawie badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej można wyciągnąć następujące wnioski:

- Dendrymery fosforowe tworzą na drodze oddziaływań elektrostatycznych stabilne kompleksy z badanymi fotouczulaczami, tzn. kompleks błękit metylenowy-dendrymer anionowy oraz kompleks róż bengalski-dendrymer kationowy.
- Obydwa kompleksy fotouczulacz-dendrymer są zdolne do generowania tlenu singletowego w środowisku wodnym. W kompleksie róż bengalski-dendrymer kationowy zachodzi synergistyczny efekt generowania $^1\text{O}_2$ wynikający z potwierdzonej zdolności dendrymeru kationowego do generowania $^1\text{O}_2$.
- Zastosowanie dendrymerów jako nośników dla badanych fotouczulaczy zwiększa efektywność transportu cząsteczek fotouczulaczy do komórek, czego efektem jest wyższa fototoksyczność kompleksów względem trzech linii komórkowych raka podstawnkomórkowego skóry (ASZ, BSZ oraz CSZ). Dendrymery fosforowe są zatem obiecującymi nośnikami w aspekcie potencjalnego wykorzystania w PDT.

- Kompleksowanie fotouczulacza z dendrymerem dało lepszy efekt w przypadku rózu bengalskiego, co świadczy o wyższym potencjale aplikacyjnym tego układu.

Rezultaty badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwoliły potwierdzić skuteczność dendrymerów fosforowych w roli nośników fotouczulaczy na poziomie badań *in vitro*. Otrzymane wyniki mogą przyczynić się w przyszłości do wykorzystania dendrymerów w terapii fotodynamicznej. Niewątpliwie konieczne są jednak dalsze badania w celu poznania dokładnego mechanizmu działania badanych kompleksów dendrymerów z fotouczulaczami.

Monika
Dobnałska

Streszczenie w języku angielskim

Dendrimers are a class of polymers that for years has been the subject of research in the area of treatment and diagnosis. Due to their unique structure, these polymers may play a role as carriers of small molecules, such as drugs or imaging agents. The studies on a potential use of dendrimers as carriers involve particularly anticancer drugs. It is mainly because of the limitations of conventional therapies, such as low selectivity, poor drug solubility and side effects. Numerous literature reports indicate that the use of drug carriers, e.g. dendrimers, may help overcome these limitations and enhance treatment efficacy. In the recent years, the spectrum of research on dendrimers has expanded in the area of photodynamic therapy (PDT). In the last couple of decades, photodynamic therapy of cancer has emerged as an alternative for chemotherapy and radiotherapy. This method is based on the use of photosensitizers that cause a toxic effect only upon the irradiation with visible light of an appropriate wavelength.

However, the use of photosensitizers meets similar limitations as conventional chemotherapy. Therefore, the aim of present dissertation was to check if chosen dendrimers form complexes with photosensitizers, and whether the complexes show an improved phototoxic effect compared to free photosensitizers. Two dendrimers were chosen for this study: a cationic phosphorus dendrimer of the third generation possessing 48 ammonium groups, and anionic phosphorus dendrimer of the second generation, possessing 24 carboxyl surface groups. In addition, rose bengal and methylene blue were chosen as photosensitizers.

The study consisted of two main research stages. The first stage was to characterize potential interactions between phosphorus dendrimers and photosensitizers. The second stage involved *in vitro* studies aimed at a comparison of photodynamic activity of photosensitizer-dendrimer complexes and free photosensitizers. The interactions between dendrimers and photosensitizers were studied with the use of spectroscopic methods. Using spectrophotometric method, the interaction between methylene blue and anionic dendrimer was studied. Due to fluorescent properties of rose bengal,

a spectrofluorimetric method was used to study the interaction between this photosensitizer and the cationic dendrimer.

Obtained results showed that two complexes were formed: methylene blue-anionic dendrimer, and rose bengal-cationic dendrimer. Based on the analysis of the observed changes, it was possible to determine graphically the stoichiometry of the formed complexes. In the case of methylene blue:anionic dendrimer complex the stoichiometry was approximately 9:1. The stoichiometry of rose bengal:cationic dendrimer complex was approximately 7:1. The stability of the complexes and the impact of ionic strength on the process of complexation were also studied. Both complexes were stable over the time. In the case of the methylene blue-anionic dendrimer complex, the impact of ionic strength was not observed and therefore it was suggested that not only electrostatic forces were responsible for the interaction. The interactions between the compounds were also studied using Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR). The results confirmed that the photosensitizer-dendrimer complexes interactions were mainly electrostatic. In the case of methylene blue, also π - π interactions with aromatic groups inside the anionic dendrimer were possible. Moreover, weak interactions between methylene blue and cationic dendrimer were observed. Two complexes were chosen for further studies: methylene blue-anionic dendrimer and rose bengal-cationic dendrimer. The stoichiometry of both complexes chosen for further experiments was 5:1 (photosensitizer:dendrimer).

The interactions of a photosensitizer with a carrier can have a significant impact on the photodynamic effect. This effect was studied in an aqueous medium, by determining the level of singlet oxygen (1O_2) generated by the photosensitizers and complexes, using fluorescent sensor Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG). A linear dependency between the fluorescence of SOSG and the irradiation time of photosensitizers was observed, which indicated an increase in singlet oxygen production. For the irradiations a Q.Light Pro Unit lamp equipped with a set of filters used in a photodynamic therapy was applied. The methylene blue-anionic dendrimer complex showed lower ability in generating singlet oxygen than free methylene blue. In the case of rose bengal-cationic dendrimer complex, the complex was able to generate more 1O_2 , and the rate of the process was much higher than in the case of a free photosensitizer. Additionally, it was shown that cationic dendrimer alone generated 1O_2 , upon

irradiation. Therefore, it was concluded that a synergistic effect occurred in the rose bengal-cationic dendrimer complex.

In *in vitro* studies, three murine basal cell carcinoma cell lines (ASZ, BSZ and CSZ) were chosen as a research model. The cell lines were derived from heterozygous *Ptch*^{+/-} mice possessing BCC tumors induced by ultraviolet or ionizing radiation. These mice also possessed different molecular markers of BCC tumors. Basal cell carcinoma is characterized by slow growth, it is a local lesion and metastasis is very rare. Therefore, it is a suitable model in the aspect of a potential use of PDT. The aim of this study was to determine the cellular uptake and to compare cytotoxicity of the complexes and free photosensitizers. In order to determine the cellular uptake of rose bengal and its complex, flow cytometry technique was used. The uptake of methylene blue and methylene blue-anionic dendrimer complex was studied using a spectrophotometric method. In both cases, the complexes showed higher cellular uptake than free photosensitizers. Based on these experiments, an appropriate time of 5 hours was established for the incubation of the compounds with cells.

In a photodynamic therapy, it is important to use a photosensitizer that is not toxic without the irradiation (is characterized by so called low “dark toxicity”). Therefore, the next step was to check cytotoxicity of the photosensitizers, dendrimers and complexes in the dark. The tests were carried out using the microplate MTT assay. In the case of methylene blue, the photosensitizer, the complex and the dendrimer in the highest concentrations used, caused a slight cytotoxic effect. However, there was no cytotoxic effect in the case of rose bengal, its complex and cationic dendrimer, in all three cell lines. Next, cytotoxicity tests were performed upon the irradiation of the cells incubated with the tested compounds. It was found that in both cases the complexes showed a higher cytotoxic effect than free photosensitizers. The most pronounced differences were observed for methylene blue in concentration at 5 μ M and for rose bengal in concentration at 0.5 μ M. Importantly, both complexes were toxic against all three basal cell carcinoma cell lines. Finally, live, apoptotic and necrotic cell fractions, and reactive oxygen species (ROS) generation was determined. Flow cytometric measurements of double stained cells showed that the photosensitizer-dendrimer complexes induced higher rate of apoptotic over necrotic cells upon irradiation. The spectrofluorimetric assay of the reactive

oxygen species showed significantly higher ROS level in cells irradiated and treated with the complexes.

Based on the performed studies in the present dissertation, several conclusions can be drawn:

- Phosphorus dendrimers are able to interact with the tested photosensitizers mainly through electrostatic interactions, forming two stable complexes: methylene blue-anionic dendrimer complex and rose bengal-cationic dendrimer complex.
- Both photosensitizer-dendrimer complexes are able to generate singlet oxygen in an aqueous medium. In the case of rose bengal-cationic dendrimer complex a synergistic effect occurs, as a result of a confirmed ability of the cationic dendrimer to generate $^1\text{O}_2$.
- The use of dendrimers as carriers for tested photosensitizers increases the efficacy of the transport of photosensitizer molecules to the cells. Higher cellular uptake results in enhanced phototoxicity of the complexes against three basal cell carcinoma cell lines (ASZ, BSZ and CSZ). Thus, phosphorus dendrimers are particularly attractive for potential use in PDT.
- The rose bengal-cationic dendrimer complex shows strong cytotoxic effect in much lower concentration than the complex of methylene blue, what highlights its application potential.

The results of the research included in the present dissertation confirmed effectiveness of phosphorus dendrimers as carriers for photosensitizers in *in vitro* studies. Although the obtained results show high potential to apply dendrimers in a photodynamic therapy, undoubtedly more research is needed in order to know the detailed mechanism of action of the photosensitizer-dendrimer complexes.

Momika
Debnalshor