

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 antyapoptycznym 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.

