

1. Streszczenie w języku polskim

Jednym z najgroźniejszych rodzajów nowotworów jest białaczka. Mimo, że transplantacja wciąż pozostaje skutecznym rodzajem terapii leczenia raka krwi, to niesie ona za sobą ogromne ryzyko zgonu. Zatem znalezienie alternatywnego i bezpiecznego sposobu walki z tym typem nowotworu w dalszym ciągu jest istotnym problemem do rozwiązania. Uwaga naukowców skupia się więc na możliwościach zastosowania kationowych dendrymerów, mogących stanowić nośniki dla kwasów nukleinowych oraz leków. Dodatkową korzyścią zastosowania dendrymerów jest możliwość modyfikacji grup powierzchniowych tych nanocząstek poprzez przyłączanie do nich metali o właściwościach przeciwnowotworowych, takich jak ruten.

W obecnej pracy przeprowadzono charakterystykę biofizyczną dendrymerów karbokrzemowych zawierających ruten, przeanalizowano ich aktywność przeciwnowotworową, a także oceniono możliwość wykorzystania dendrymerów jako nośników przeciwnowotworowego siRNA do komórek nowotworowych.

Charakterystyka właściwości biofizycznych i cytotoksycznych dendrymerów z rutenem (CRD) pozwoliła na wyselekcjonowanie nanocząstek 1 i 2 generacji z grupami pirydynowymi i imino-pirydynowymi do dalszych etapów badań.

Wykazano, że dendrymery CRD tworzą kompleksy z siRNA, w których kwasy nie ulegają degradacji przez nukleazy. Co więcej, testowane nanocząstki mają potencjał do przenoszenia siRNA do komórek nowotworowych. Zdolność internalizacji kompleksów tworzonych przez dendrymery z siRNA znakowanym fluoresceiną do komórek HL-60 oceniano za pomocą cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej. Ze względu na wysoką toksyczność dendrymerów w stosunku do komórek nowotworowych, nie zaobserwowano aktywności przeciwnowotworowej kompleksu siRNA z dendrymerem wprowadzonego do komórek białaczki HL-60.

Jednakże przeprowadzone badania pozwoliły na wyselekcjonowanie dwóch dendrymerów z imino-pirydynowymi grupami terminalnymi, które wykazywały silną toksyczność w stosunku do komórek nowotworowych HL-60, bez wpływu na komórki prawidłowe.

Dlatego w kolejnych etapach badań skupiono się na wyjaśnieniu mechanizmu działania wybranych związków w stosunku do komórek HL-60.

Przeprowadzono analizy pozwalające określić poziom RFT oraz zmiany potencjału mitochondrialnego. Dodatkowo wykonano test kometowy mający na celu określenie ilości

uszkodzeń DNA. Przeprowadzono również szczegółową analizę ultrastruktury komórek HL-60 poddanych działaniu wybranych dendrymerów. Dodatkowo, w celu identyfikacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych, wykonano test z bromkiem etydyny i oranżem akrydyny, z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Dodatkowo przeanalizowano aktywność kaspaz 3 i 7.

Z analizy przeprowadzonych badań wynika, że aktywność dendrymeru generacji 1 jest większa niż generacji 2. Jednakże nie potwierdzono jednoznacznie mechanizmu śmierci komórkowej powodowanej przez testowane związki.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że badane dendrymery nie wykazują aktywności w stosunku do komórek prawidłowych, w zależności od kondycji komórek nowotworowych, dostępności glukozy, a w szczególności ATP, kierują je na drogę programowanej śmierci jaką może być zarówno apoptoza, jak i nekroptoza.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań można wnioskować, że karbokrzemowe metallo-dendrymery zawierające ruten mogą być kierowane do dalszych etapów badań *in vivo*, w celu sprawdzenia możliwości ich wykorzystania do przenoszenia kwasów nukleinowych w terapii białaczki mieloblastycznej.



2. Streszczenie w języku angielskim

One of the most dangerous types of cancer is leukaemia. Although transplantation still remains an effective therapy for the treatment of blood cancer, it is extremely risky and can cause death. Therefore, finding an alternative and safe way to fight this type of cancer still is a significant problem to solve. Thus, the attention of scientists is focused on the possibilities of using cationic dendrimers as carriers of nucleic acids and drugs. An additional benefit of using dendrimers is the possibility to modify their surface groups by attaching to them metals with anti-cancer properties, such as ruthenium.

In the present work, the biophysical features of carbosilane ruthenium dendrimers were characterised, their anti-tumour activity was analysed, and the possibility of using dendrimers as carriers of anti-cancer siRNA to cancer cells was evaluated.

Biophysical and cytotoxic characteristics of dendrimers with ruthenium (CRD) allowed to select the 1st and 2nd generation of these nanoparticles with pyridine and imino-pyridine groups for further research.

It was shown that CRD dendrimers formed complexes with siRNAs and protected them from degradation by nucleases. Moreover, the tested nanoparticles have the potential to

transfer siRNA to tumour cells. The ability of the complexes formed by dendrimers with fluorescein-labelled siRNA to internalize HL-60 cells was assessed by flow cytometry and confocal microscopy. Due to the high toxicity of dendrimers towards cancer cells, the anti-tumour activity of a siRNA-dendrimer complex introduced into HL-60 leukemia cells was not observed.

However, the performed research allowed to select two dendrimers with imino-pyridine terminal groups that were strongly toxic for tumour (HL-60) cells without affecting normal cells (PBMC).

Therefore, subsequent steps of research focused on explaining the mechanism of action of the selected compounds in relation to HL-60 cells. The level of ROS and changes of mitochondrial potential were analysed. Additionally, to determine the amount of DNA damage, the comet assay was carried out. A detailed analysis of ultrastructure of HL-60 cells treated with the selected dendrimers was performed. To identify apoptotic and necrotic cells, ethidium bromide and acridine orange tests by confocal microscopy were performed. Moreover, activities of caspases 3 and 7 were evaluated.

The analysis of presented studies shows that the activity of the 1st generation of dendrimer is greater than that of the 2nd generation. On the basis of the obtained results, it can be concluded that the tested dendrimers do not affect normal cells, but they can cause programmed death of HL-60 such as apoptosis and necroptosis, however this effect depends on the condition of cancer cells, availability of glucose, and especially of ATP.

To sum up the results of the conducted research, it can be concluded that carbosilane ruthenium dendrimers can be suggested for further *in vivo* studies to analyse the possibilities of using them for the transfer of nucleic acids in the treatment of myeloblastic leukaemia.

Michlewska