



Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytetu Łódzkiego

Elżbieta Okła

**Właściwości biologiczne nanocząstek złota modyfikowanych
polietylenoglikolem i ich zastosowanie jako potencjalnych nośników
lecniczego siRNA w badaniach *in vitro***

Biological properties of polyethylene glycol-modified gold nanoparticles
and their application as potential siRNA carriers in *in vitro* studies

Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem promotora
prof. dr hab. Maksima Ionova
w Katedrze Biofizyki Ogólnej
Instytutu Biofizyki Wydziału
Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

Łódź 2025

*Serdecznie dziękuję Promotorowi mojej rozprawy, Panu **Prof. dr hab. Maksimowi Ionowowi**, za wsparcie naukowe, cierpliwość i czas poświęcony mojemu rozwojowi badawczemu.*

*Dziękuję wszystkim **Pracownikom i Doktorantom Katedry Biofizyki Ogólnej**, których spotkałam w trakcie swojej dotychczasowej pracy. To wy motywowaliście mnie do ciągłego rozwoju, wspieraliście swoją wiedzą i doświadczeniem i dbaliście o dobrą atmosferę. Nigdzie tak jak w KBO, nie sprawdza się powiedzenie „Im więcej, tym weselej”!*

*Dziękuję **Rodzinie i Przyjaciołom**, a zwłaszcza **Rodzicom**, za to, że zawsze we mnie wierzyliście i ufaliście moim wyborom, nawet wtedy, kiedy sama w nie wątpię. Dzięki waszemu nieustannemu wsparciu i wyrozumiałości czuję, że co by się nie wydarzyło, to dam sobie radę. To ogromne szczęście mieć wokół siebie takich ludzi.*

Spis treści

Źródła finansowania.....	4
Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	5
Wykaz pozostałych publikacji.....	6
Wykaz komunikatów zjazdowych.....	7
Udział w projektach badawczych.....	8
Działalność organizacyjna i promocyjna.....	9
Staż naukowe.....	9
Wykaz skrótów.....	11
Wstęp.....	13
Cel pracy.....	16
Hipoteza badawcza.....	16
Materiały.....	17
Metody.....	18
Omówienie wyników.....	19
Wyniki nieopublikowane.....	25
Wnioski.....	41
Literatura.....	42
Streszczenie w języku polskim.....	46
Streszczenie w języku angielskim.....	47

Źródła finansowania



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I



Międzynarodowy projekt badawczy M-ERA.NET 2019-2023 "Nanoparticle transfer through endothelial barrier" UMO-2018/30/Z/NZ1/00911 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki oraz europejski program Horizon 2020.

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. Okła E., Białecki, P., Kędzierska, M., Pędziwiatr-Werbicka, E., Miłowska, K., Takvor, S., , Gómez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638

IF = 4,9 (2023), 140 p. MEiN

2. **Okła E.**, Michlewska S., Buczkowski A., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0

IF = 3,9 (2024), 140 p. MEiN

3. **Okła E.**, Hołota M., Michlewska S., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. Biomedicines 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108

IF = 3,9 (2025), 100 p. MEiN

Łączny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: 12,7

Łączna liczba punktów MNiSW: 380

Wykaz pozostałych publikacji

1. Michlewska, S., Garaiova, Z., Šubjakova, V., Hołota, M., Kubczak, M., Grodzicka, M., **Okła E.**, Naziris N., Balcerzak Ł., Ortega P., de la Mata F.J, Hianik T., Waczulikova I., Bryszewska M., Ionov M. Lipid-coated ruthenium dendrimer conjugated with doxorubicin in anticancer drug delivery: Introducing protocols. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 227(April), 0–11, 2023. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2023.113371

IF = 5,9 (2023), 100 p. MEiN

2. Zawadzki, S., Martín-Serrano, Á., **Okła, E.**, Kędzierska, M., Garcia-Gallego, S., López, P. O., de la Mata F.J., Michlewska S., Makowski T., Ionov M., Pędziwiatr-Werbicka E., Bryszewska M., Miłowska K. Synthesis and biophysical evaluation of carbosilane dendrimers as therapeutic siRNA carriers. *Scientific Reports*, 2023, 14(1), 1–19. DOI: 10.1038/s41598-024-51238-w

IF = 3,8 (2023), 140 p. MEiN

łączy IF: 9,7

łączy liczba punktów MNiSW: 240

Wykaz publikacji pokonferencyjnych z IF

3. **Okła E.**, Michlewska S., Hołota M., Zawadzki S., Bryszewska M., Ionov M. Gold nanoparticles as a delivery system of therapeutic siRNA into human brain endothelial cells: in vitro studies. Posters. *FEBS Open Bio*, 2023, 13: 61-258. DOI: 10.1002/2211-5463.13646

IF = 2,74 (2023), 70 p. MEiN

4. **Okła E.**, Michlewska S., Garaiova Z., Ortega P., de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. Liposomal locked-in dendrimers as potential doxorubicin delivery nanosystem. Posters. FEBS Open Bio 2024, 14 (Suppl. 2), 94–516. DOI: 10.1002/2211-5463.13837

IF = 2,46 (2024), 70 p. MEiN

Wykaz manuskryptów współautorskich w procesie redakcyjnym

1. Szwed-Georgiou A., Płociński P., Włodarczyk M., **Okła E.**, Tomaszewska A., Zadyłak J., Koeman J., Krupa A., Williams M., Rudnicka K. Fulvic Acid-containing Formulations as Bioactive Agents: In Vitro Insights into Cytocompatibility, Genotoxicity, Immune Response, and Gut Microbiota Influence. *Microbiome*.
2. Gök T., **Okła E.**, Halets-Bui I., Zhogla V., Bryszewska M., Shcharbin D., Ionov M., Odabaşı M. New generation of nanomaterials: Trojan-horse impressed protein-based nanoparticles for biomedical applications. *Materials Today Chemistry*.

Wykaz komunikatów zjazdowych

1. Krawczyk K., Juszczak Z., **Okła E.**, Kowalewicz-Kulbat M. Halotherapy as an alternative treatment in medicine. 3rd Wrocław Scientific Meetings, 1-2.03.2019, Wrocław, Polska, plakat P 54.
2. **Okła E.**, Pędziwiatr-Werbicka E., Sánchez-Nieves J., Miłowska K., Gómez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. Evaluation of pegylated gold nanoparticles as siRNA carriers. 6th International Conference InterNano Poland 2022, 18-19.10.2022, Katowice, Polska, plakat.

3. **Okła E.**, Michlewska S., Hołota M., Zawadzki S., Bryszewska M., Ionov M. Gold nanoparticles as a delivery system of therapeutic siRNA into human brain endothelial cells: in vitro studies. 47th FEBS Congress 2023, 8-12 lipca 2023, Tours, Francja, plakat P08.251.
4. **Okła E.**, Michlewska S., Garaiova Z., Ortega P., de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. Liposomal locked-in dendrimers as potential doxorubicin delivery nanosystem. 48th FEBS Congress 2024, 29.06-3.07.2024, Mediolan, Włochy, plakat P-26-096.
5. **Okła E.**, Michlewska S., Grygiel M., Ewe A., Aigner A., Bryszewska M., Ionov M. Tyrosine improves PEI polymer:siRNA binding and facilitates gene silencing in various types of cells. XIXth Conference of the Polish Histamine Research Society, 24-26.10.2024, Łódź, Polska, prezentacja ustna.

Udział w projektach badawczych

1. Wykonawca w projekcie międzynarodowym M-ERA.NET 2019-2023 "Nanoparticle transfer through endothelial barrier" UMO-2018/30/Z/NZ1/00911 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki oraz europejski program Horizon 2020. (2020-2024).
2. Wykonawca w bilateralnym projekcie programu wymiany naukowej między Rzeczpospolitą Polską a Republiką Słowacką „Nowe nanosystemy dostarczania leków cytostatycznych z wykorzystaniem technologii łączącej właściwości dendrymerów i liposomów”; Nr: PPN/BIL/2018/1/00150/ U/00001. (2021-2022).
3. Wykonawca w projekcie „EUROPARTNER” pt.: „Działania wzmacniające i upowszechniające międzynarodowe partnerstwo Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska na rzecz interdyscyplinarnych badań i innowacji Uniwersytetu Łódzkiego”. Nr: PPI/APM/2018/1/00007/U/00 (2022).

Działalność organizacyjna i promocyjna

1. Organizacja VII Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen odbywającej się w formie on-line w dniach 7-8.22.2022 r. (przewodnicząca sesji „Choroby XXI w.).
2. Przeprowadzenie warsztatów odbywających się w ramach ogólnopolskiego wydarzenia „Noc Biologów”. Warsztaty „Hydrozagadka” (2023 r.), „Poznaj tajemnice życia z Panem Kleksem” (2024 r.) oraz „ W dobrym klimacie – druga twarz dwutlenku węgla” (2025 r.).
3. Organizacja warsztatów dla młodzieży licealnej w ramach odbywającej się na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ akcji „Drzwi otwarte” (2023 r.).
4. Przeprowadzenie warsztatów dla dzieci w wieku przedszkolnym „Warsztaty małego chemika” (2025 r.).
5. Opieka merytoryczna i organizacyjna nad gośćmi Katedry Biofizyki Ogólnej odwiedzającymi jednostkę w ramach współprac i staży naukowych (mgr Oscar Barrios-Gumiel oraz mgr Samuel Takvor Mena z Uniwersytetu w Alcalá de Henares, Hiszpania, 2022 r.; dr Nikos Naziris z Uniwersytetu w Atenach, Grecja 2022 r.; mgr Tuba Gok z Uniwersytetu w Aksaray, Turcja, 2024 r.).

Staż naukowe

1. Staż naukowy w Katedrze Fizyki Jądrowej i Biofizyki, Wydział Matematyki i Fizyki Uniwersytet Komeńskiego w Bratysławie, Słowacja. W ramach programu wymiany bilateralnej między Rzeczpospolitą Polską a Republiką Słowacką, „Nowe nanosystemy dostarczania leków cytostatycznych z wykorzystaniem technologii łączącej właściwości dendrymerów i liposomów”, Nr.: PPN/BIL/2018/1/00150/ U/00001 (6-15.12.2021 r.).
2. Staż naukowy w Zakładzie Chemii Organicznej i Nieorganicznej, Wydział Farmacji Uniwersytetu w Alcalá de Henares, Hiszpania. Wyjazd w ramach międzynarodowego projektu M-ERA.NET 2019-2023 „Nanoparticle transfer through endothelial barrier” UMO-

2018/30/Z/NZ1/00911 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz europejski program Horizon 2020 (14.02-14.03.2022 r.).

3. Staż naukowy w Katedrze Fizyki Jądrowej i Biofizyki, Wydział Matematyki i Fizyki Uniwersytet Komeńskiego w Bratysławie, Słowacja. W ramach międzynarodowego projektu NAWA o akronimie: „EUROPARTNER”, pt.: „Działania wzmacniające i upowszechniające międzynarodowe partnerstwo Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska na rzecz interdyscyplinarnych badań i innowacji Uniwersytetu Łódzkiego”. Nr: PPI/APM/2018/1/00007/U/00 (5-18.05.2022 r.).
4. Staż naukowy w Łotewskim Centrum Badań i Studiów Biomedycznych, Ryga, Łotwa. Wyjazd w ramach Programu PROM 2023 – NAWA „Międzynarodowa wymiana stypendialna doktorantów i kadry akademickiej” (17- 30.06.2023 r.).

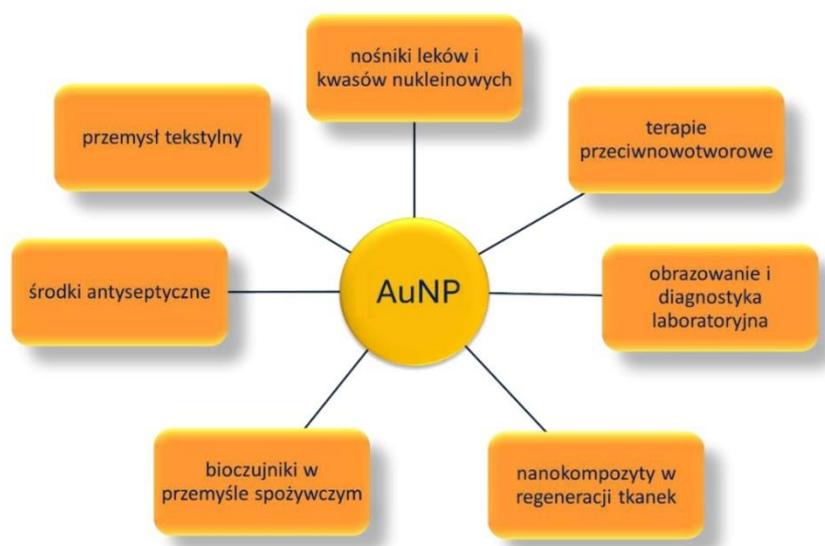
Wykaz skrótów

Ago2	<i>argonaute 2</i>	białko argonaut 2
BBB	<i>blood-brain barrier</i>	bariera krew-mózg
CD	<i>circular dichroism</i>	dichroizm kołowy
CRISPR/Cas9	<i>clustered regularly- interspaced short palindromic repeats</i>	zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne
DLS	<i>dynamic light scattering</i>	dynamiczne rozpraszanie światła
DMPC	<i>dimyristoylphosphatidylcholine</i>	di-mirystylofosfatydylocholina
DPH	<i>1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene</i>	1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien
ELS	<i>electrophoretic light scattering</i>	elektroforetyczne rozpraszanie światła
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>	izotiocyanian fluoresceiny
H2DCF-DA	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>	diacetat 2',7' dichlorodihydrofluoresceiny
HA	<i>human astrocytes</i>	astrocyty ludzkie
HBEC	<i>human brain endothelial cells</i>	ludzkie komórki śródbłonna mikronaczyń mózgowych wyizolowanych z kory mózgowej
HBVP	<i>human brain vascular pericytes</i>	ludzkie perycyty naczyń włosowatych mózgu
HSA	<i>human serum albumin</i>	albumina surowicy ludzkiej
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>	izotermiczna kalorymetria miareczkowa
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide</i>	jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny
LDE	<i>laser doppler electrophoresis</i>	laserowa elektroforeza dopplerowska
LDH	<i>lactate dehydrogenase</i>	dehydrogenaza mleczanowa

LPS	<i>lipopolysaccharide</i>	lipopolisacharyd
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>	mikro RNA
PBMC	<i>peripheral blood mononucleic cells</i>	obwodowe komórki monojądrzaste krwi
PEG	<i>polyethylene glycol</i>	glikol polietylenowy
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	kompleks wyciszający indukowany RNA
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	reaktywne formy tlenu
RTCA	<i>real-time cell analysis</i>	analiza komórek w czasie rzeczywistym
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	mały interferujący RNA
TEER	<i>transendothelial electrical resistance</i>	śródbłonkowy opór elektryczny
TEM	<i>transmission electron microscope</i>	transmisyjny mikroskop elektronowy
Tf	<i>transferrin</i>	transferyna
TMA-DPH	<i>trimethylamine-diphenylhexatriene</i>	trimetyloamino-difenyloheksatrien
Trp	<i>tryptophan</i>	tryptofan

Wstęp

Nanotechnologia to dziedzina nauki, której intensywny rozwój rozpoczął się na początku XXI wieku. Obejmuje ona szeroką grupę związków, których rozmiar nie przekracza 100 nm. Związki te znajdują zastosowanie w przemyśle, inżynierii czy w medycynie, a ich właściwości są szczegółowo badane pod względem fizycznym, chemicznym i biologicznym [1]. Do tych związków zalicza się, między innymi, liposomy, węglowe kropki kwantowe, dendrymery, czy nanocząstki metali takich jak srebro lub złoto [2].



Rycina 1. Przykłady zastosowania nanocząstek złota.

Nanocząstki złota (AuNP) ze względu na swoją wysoką stabilność i łatwą możliwość przeprowadzania ich modyfikacji to jedne z najczęściej badanych i wykorzystywanych nanocząstek [3]. Związki te mogą być wytwarzane w różnych formach, takich jak: nanopowłoki, nanopręty, nanosfery czy nanoklatki, co znacząco poszerza zakres ich potencjalnych zastosowań [4]. Nanocząstki złota charakteryzują się korzystnym stosunkiem wielkości do objętości (ang. *size to volume ratio*) oraz dodatnim ładunkiem powierzchniowym, a przy tym cechuje je wysoka

biokompatybilność [5]. Ponadto wykazywany przez nie powierzchniowy rezonans plazmonowy sprawia, że mogą zarówno absorbować, jak i rozpraszać światło w zależności od długości fali wzbudzenia [3]. Możliwość modyfikacji nanocząstek złota sprawia, że badane są różne metody poprawienia ich wydajności i stabilności oraz zminimalizowania efektów cytotoksycznych. Wymienione powyżej właściwości AuNP przekładają się na ich szerokie zastosowanie w medycynie i przemyśle, których przykłady przedstawiono na **Rycinie 1**.

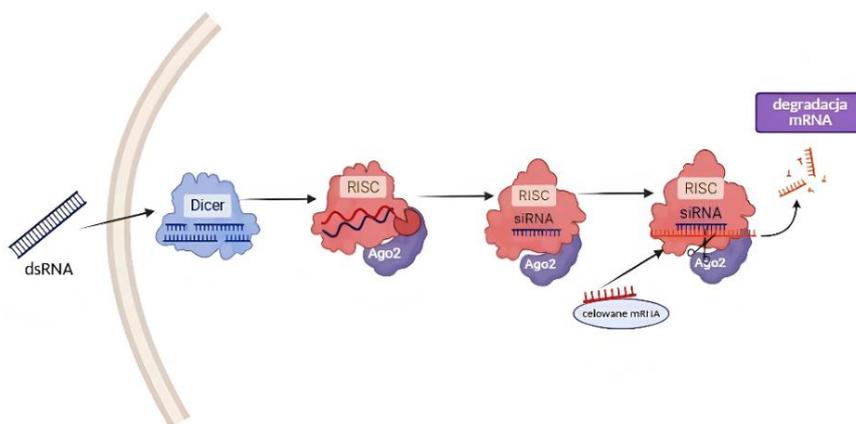
Wykorzystanie nanocząstek w medycynie wymaga ich dokładnego sprawdzenia pod kątem potencjalnej toksyczności i biokompatybilności. W tym celu przeprowadza się szereg testów zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [6].

W celu zminimalizowania cytotoksyczności nanocząstek, przy jednoczesnym zachowaniu ich zdolności wiązania i dostarczania substancji do komórek poszukuje się różnych sposobów ich funkcjonalizacji. Szeroko stosowanym rozwiązaniem jest opłaszczanie nanocząstek polimerami (np. poli-L-lizyna, PEG), aminokwasami, przeciwciałami czy kwasami nukleinowymi [7]. Coraz większą uwagę poświęca się procesom zachodzącym po podaniu nanocząstek do organizmu, w szczególności ich oddziaływaniu z białkami osocza i tworzeniu tzw. „korony białkowej” (ang. *protein corona*) która może istotnie wpływać na biodostępność, zdolność przenikania do komórek, profil bezpieczeństwa i skuteczność terapeutyczną AuNP [8]. Łatwość syntezy, stosunkowo niski koszt produkcji, stabilność, biodegradowalność i niska immunogenność mogą świadczyć o zasadności stosowania nanocząstek złota w biomedycynie [9].

Nanonośniki mają za zadanie dostarczenie pożądanej cząsteczki (np. leku, białka, kwasu nukleinowego) do konkretnej komórki, umożliwiając jej przekroczenie naturalnych barier występujących w organizmie takich jak śluz, błony komórkowe czy bariery między naczyniami krwionośnymi, a tkankami [10]. Przykładem tej ostatniej jest bariera krew-mózg (BBB, ang. *blood-brain barrier*) zbudowana z komórek endotelialnych połączonych ze sobą złączami ścisłymi oraz perycytów i astrocytów. Bariera ta ma na celu ochronę mózgu, poprzez wysoce selektywną przepuszczalność substancji niskocząsteczkowych [11]. Ponadto, zachodzący w BBB transport jonów (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}), a także substancji odżywczych zapewnia homeostazę układu nerwowego [12]. Bariera krew-mózg chroniąc mózg przed drobnoustrojami i toksynami jednocześnie stanowi poważne wyzwanie gdy konieczne jest dostarczanie do mózgu substancji leczniczych. Duże cząsteczki, nie są w stanie przekroczyć bariery krew-mózg. To ograniczenie w dużej mierze przyczynia się do braku skutecznej terapii chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona.

Pomimo obecności na rynku preparatów łagodzących objawy i opóźniających rozwój tych schorzeń, do dziś nie opracowano skutecznej terapii prowadzącej do ich całkowitego wyleczenia. W przypadku choroby Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer's disease*), w roku 2024 dostępnych było siedem preparatów stosowanych w celu łagodzenia objawów. Wśród tych leków znajdują się inhibitory cholinesterazy, antagoniści receptora NMDA oraz przeciwciała monoklonalne przeciwko amyloidowi- β [13]. W poszukiwaniu preparatu, który będzie w stanie zahamować rozwój AD już na wczesnym etapie, badacze skupiają się na różnych celach molekularnych. Jednym z nich jest *apoE4*, allel $\epsilon 4$ genu kodującego apolipoproteinę E. Wystąpienie w genomie *ApoE* $\epsilon 4$ uważane jest za główny czynnik genetyczny prawdopodobieństwa wystąpienia choroby Alzheimera o późnym początku [14]. Zakłada się zatem, że wyciszenie tego genu, może znacząco ograniczyć ryzyko wystąpienia choroby.

W celu zahamowania ekspresji niepożądanego genu można zastosować metody uszkadzające dany gen, np. metoda CRISPR/Cas9 lub metoda zapobiegająca translacji danego genu poprzez ukierunkowane działanie odpowiednio skonstruowanego siRNA [15]. Wyłączenie ekspresji genu jest wieloetapowym procesem [16], którego schemat na przykładzie siRNA przedstawiono na **Rycinie 2**.



Rycina 2. Schemat mechanizmu działania siRNA (ang. small interfering RNA) w komórce.

Dwuniciowe siRNA (dsRNA) jest degradowane przez endonukleazę DICER do krótkich fragmentów nukleotydów. W następnym etapie siRNA wiąże się do kompleksu RISC, gdzie białko Ago2 rozplątuje podwójną nić i łączy nić sensowną. Nić antysensowna naprowadza kompleks RISC na komplementarną nić mRNA, prowadząc do zahamowania jej translacji. Choć

wykorzystanie siRNA wydaje się prostą techniką modyfikacji genów, jest ono obarczone pewnymi ograniczeniami. Występując w formie wolnej siRNA jest niestabilny, stosunkowo szybko ulega degradacji i wykazuje niską internalizację do komórek [17]. Dlatego też poszukuje się nośników, które pomogą rozwiązać powyższe problemy.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena właściwości biofizycznych i biologicznych dwóch pegylowanych karbokrzemowych nanocząstek złota (1) AuNP14a i (2) AuNP14b oraz ich kompleksów z siRNA anty-*apoE*. Główne cele pracy podzielono na następujące zadania badawcze:

1. Ocena zdolności nanocząstek złota AuNP14a i AuNP14b do tworzenia kompleksów z siRNA oraz biofizyczna charakterystyka powstałych kompleksów.
2. Określenie charakteru interakcji AuNP14a i AuNP14b z białkami osocza oraz błonami lipidowymi.
3. Określenie cytotoksyczności i genotoksyczności badanych nanocząstek złota oraz ich kompleksów z siRNA.
4. Ocena zdolności kompleksów AuNP/siRNA do wnikania do komórek oraz wpływu tych kompleksów na przepuszczalność modelu bariery krew-mózg.
5. Weryfikacja poziomu przeciwzapalnych i prozapalnych cytokin wydzielanych przez komórki PBMC po podaniu nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA.

Hipoteza badawcza

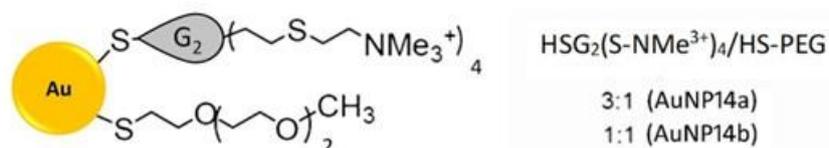
Nanocząstki złota funkcjonalizowane PEG stanowią bezpieczne i skuteczne narzędzie do dostarczania siRNA do komórek docelowych.

Materiały

1. Nanocząstki złota

- AuNP14a – stosunek dendron:PEG 3:1
- AuNP14b – stosunek dendron:PEG 1:1

Karbokrzemowe nanocząstki złota AuNP14a i AuNP14b zostały zsyntetyzowane i udostępnione do badań przez Katedrę Chemii Organicznej i Nieorganicznej, Wydziału Farmacji, Uniwersytetu w Alcalá de Henares (Madryt) w ramach wieloletniej współpracy z Katedrą Biofizyki Ogólnej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego. Wstępna charakterystyka badanych AuNP została przedstawiona w publikacji „Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles” autorstwa Barrios-Gumiel A., Sánchez-Nieves J., Pedziwiatr-Werbicka E. i wsp [18]. Strukturę AuNP przedstawiono schematycznie na **Rycinie 3**.



Rycina 3. Struktura karbokrzemowych nanocząstek złota funkcjonalizowanych PEG. Synteza AuNPs przeprowadzona była w środowisku wodnym w reakcji H₂AuCl₄·3H₂O z mieszaniną dwóch ligandów zawierających reszty siarkowe: (1) dendron kationowy HSG₂(SNMe³⁺)₄, (2) komercyjny PEG CH₃O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂SH, HS-PEG. Reduktorem reakcji był NaBH₄.

2. siRNA (Dharmacon Inc., Lafayette, CO, USA)

- siRNA *apoE*: nić sensowna: 5'-GAUUACCU^gGCGCUGGGUGCUU-3';
nić antysenesowna : 5'-PGCACCCAGCGCAGGUAUUCUU-3'
- siRNA *apoE*-FITC: nić sensowna: 5'-FL-GAUUACCU^gGCGCUGGGUGCUU-3';
nić antysenesowna : 5'-PGCACCCAGCGCAGGUAUUCUU-3'

3. Linie komórkowe

- Komórki śródbłonna mikronaczyń mózgowych wyizolowanych z kory mózgowej HBEC-5i (ATCC, Manassas, VA, USA)
- Astrocyty ludzkie HA (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA)
- Ludzkie perycyty naczyń włosowatych mózgu HBVP (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA)

4. Komórki izolowane z kożucha leukocyтарно-пłytkowego

- Komórki monojądrzaste krwi obwodowej PBMC

Kožuchy pozyskiwano w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi. Krew pochodziła od zdrowych dawców, którzy udzielili zgody na wykorzystanie elementów krwi do badań naukowych bez udostępnienia danych osobowych.

5. Białka

- Albumina surowicza ludzka (HSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Transferyna surowicza ludzka (Tf) (Biorbyt Ltd, Cambridge, UK)

6. Lipidy

- DMPC (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA)

Metody

1. Określenie optymalnych stężeń AuNP do tworzenia stabilnych kompleksów z siRNA wykonano za pomocą technik polaryzacji fluorescencji oraz elektroforezy żelowej.
2. W celu zmierzenia średnicy hydrodynamicznej i oszacowania ładunku powierzchniowego kompleksów AuNP/siRNA wykorzystano techniki: a) dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i b) elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS).
3. Technikę dichroizmu kołowego wykorzystano do określenia zmian strukturalnych siRNA oraz zmian zachodzących w strukturze drugorzędowej białek po dodaniu nanocząstek złota.

4. Cytotoksyczność nanocząstek oraz ich kompleksów z siRNA określono za pomocą testów redukcji MTT i resazury (Alamar Blue), testu uwalniania LDH oraz techniką pomiaru impedancji komórek metodą RTCA.
5. Technika spektroskopii fluorescencyjnej została wykorzystana do określenia charakteru interakcji nanocząstek złota z białkami osocza oraz błonami lipidowymi.
6. Transmisyjna mikroskopia elektronowa posłużyła do zobrazowania struktur powstałych po interakcji nanocząstek złota z białkami i liposomami.
7. Izotermiczna kalorymetria miareczkowa posłużyła do określenia dynamiki wiązania nanocząstek z białkami osocza.
8. Alkaliczny test kometowy został zastosowany do analizy efektu genotoksyczności w komórkach w obecności nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA.
9. Technikę cytometrii przepływowej wykorzystano do ilościowej oceny internalizowanych kompleksami AuNP/siRNA komórek.
10. Mikroskopia konfokalna została użyta jako metoda pozwalająca na zobrazowanie utworzonych kompleksów w komórkach.
11. Test DCFDA/H₂DCFDA wykonano w celu zmierzenia poziomu reaktywnych form tlenu powstających w komórkach pod wpływem badanych związków.
12. Zmiany potencjału błon mitochondrialnych w odpowiedzi na obecność badanych związków analizowano za pomocą testu z wykorzystaniem barwnika JC-1.
13. Integralność modelu bariery krew-mózg po podaniu badanych związków analizowano przez pomiar śródbłonkowego oporu elektrycznego (TEER), impedancji oraz w testem przepuszczalności dekstranu znakowanego fluoresceiną.
14. Za pomocą testów opartych na systemie MAGPIX określono poziom wybranych cytokin wytwarzanych przez komórki PBMC jako odpowiedź na obecność nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA.

Omówienie wyników

W pierwszej pracy wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity” celem było określenie optymalnych stężeń, w których nanocząstki AuNP14a i AuNP14b tworzą kompleksy z siRNA, a następnie scharakteryzowanie właściwości biofizycznych i biologicznych powstałych kompleksów. W pierwszym etapie wykonano pomiary średnicy hydrodynamicznej oraz ładunku powierzchniowego siRNA, a następnie przeprowadzono jego miareczkowanie badanymi nanocząstkami. Zaobserwowano, że ujemnie naładowany siRNA zmienia swój ładunek na dodatni w obecności nanocząstki AuNP14a w stężeniu 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oraz przy prawie dwukrotnie wyższym stężeniu (55 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nanocząstki AuNP14b. Efekt ten był zgodny z oczekiwaniami, gdyż AuNP14a posiada większy stosunek dodatnio naładowanych dendronów karbokrzemowych do cząsteczki PEG niż AuNP14b. Jednocześnie określono rozmiar tworzących się kompleksów, a pomiar indeksu rozproszenia (PDI, ang. *polydispersity index*) wykazał, że mierzone próbki można uznać za monodispersyjne.

W kolejnym etapie pracy wykonano pomiar polaryzacji fluorescencji oraz elektroforezę w żelu agarozowym. Pomiary pozwoliły zaobserwować spadek fluorescencji siRNA znakowanego fluoresceiną (siRNA-FL) przy jednoczesnym wzroście polaryzacji fluorescencji. Osiągnięcie fazy plateau uznano za punkt wysycenia znakowanego siRNA miareczkowanym związkiem. Taki efekt obserwowano po dodaniu 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AuNP14a oraz 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AuNP14b do siRNA-FL, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi w pierwszym etapie badań. Elektroforeza żelowa pozwala na analizę tworzenia kompleksów siRNA z nanocząstkami. Stężenie AuNP14a przy którym zaobserwowano zanik fluorescencji znakowanego siRNA było zgodne z wcześniej opisanymi wynikami uzyskanymi innymi metodami. Natomiast AuNP14b nie wpływała na fluorescencję siRNA nawet przy stężeniu przekraczającym 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Możliwe, że przyczyną tego jest stosunkowo niewielki rozmiar nanocząstki ograniczający lub uniemożliwiający jej kompleksację z siRNA.

Sprawdzono także, w jakim stopniu obecność nanocząstek złota wpłynie na strukturę przestrzenną siRNA. Zaobserwowano, że AuNP14a zmienia strukturę siRNA w większym stopniu niż AuNP14b, a dodatkowo w stężeniach $>50 \mu\text{g}/\text{mL}$ powoduje lekkie przesunięcie widma w stronę wyższych długości fal. Ponadto, eliptyczność siRNA przy długości fali 265 nm, nie ulegała istotnym

zmianom w przypadku obu nanocząstek, co pozwala wnioskować, że badane AuNPs nie zaburzają funkcjonalności siRNA.

Ostatni etap badań zawartych w tej publikacji miał na celu określenie cytotoksyczności nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA. W celu sprawdzenia wpływu badanych związków na żywotność komórek wykonano testy MTT, LDH oraz Alamar Blue. Różnorodność zastosowanych metod umożliwiła sprawdzenia wpływu AuNP na różne procesy metaboliczne komórek. Testy MTT oraz LDH wykonano na adherentnej linii komórkowej HBEC-5i, natomiast test Alamar Blue na zawieszinowych komórkach PBMC. W teście MTT wykazano, że nanocząstki złota nie wykazują cytotoksyczności w stężeniach, w których tworzą kompleksy z siRNA. Inny efekt zaobserwowano po zastosowaniu kompleksów AuNP/siRNA. Kompleks AuNP14a/siRNA wykazał umiarkowany efekt cytotoksyczny (ok. 60% żywotności) już w stężeniu 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, natomiast nanocząstka AuNP14b skompleksowana z siRNA była niecytotoksyczna, nawet w stężeniu 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Wyniki te były zgodne z wynikami otrzymanymi za pomocą testów LDH i redukcji resazuryny. Podsumowując, nanocząstki złota i ich kompleksy z siRNA w wybranych stężeniach były bezpieczne dla badanych komórek, co dało podstawę do kontynuacji badań.

Druga publikacja wchodząca w skład pracy doktorskiej, zatytułowana „Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin”, skupia się na interakcjach badanych nanocząstek z wybranymi białkami surowicy ludzkiej oraz błonami lipidowymi. Nanocząstki, ze względu na swoją budowę, po podaniu do krwioobiegu przyciągają do siebie liczne molekuly, głównie białka, a te tworzą tzw. „koronę białkową” [19]. Białka te oddziałują z nanocząstką, wpływając na jej ładunek powierzchniowy, powinowactwo do innych struktur biologicznych czy wydajność. W przedstawionej pracy wykorzystano albuminę (HSA) oraz transferynę (Tf) surowicy ludzkiej jako białka modelowe. Badania rozpoczęto od pomiarów średnicy hydrodynamicznej oraz potencjału zeta obu białek, a następnie obserwowano, jak parametry te zmieniają się wraz z rosnącym stężeniem nanocząstek AuNP14a i AuNP14b w próbce. Obecność nanocząstek złota spowodowała wzrost potencjału zeta HSA oraz Tf, które w $\text{pH} = 7,4$ posiadały ładunek ujemny. W przypadku transferyny zaobserwowano całkowitą zmianę ładunku na dodatni. Rozmiar utworzonych kompleksów zmierzono za pomocą technik DLS i transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Obie metody wykazały, że białka łączą się z nanocząstkami, jednak efekt ten był najbardziej zauważalny w przypadku HSA skoniugowanego z AuNP14a.

W następnym etapie pracy sprawdzono, jak obecność nanocząstek wpłynie na drugorzędową strukturę badanych białek. W tym celu zastosowano technikę spektroskopii dichroizmu kołowego (CD). Wykazano, że obie nanocząstki powodują znaczne zmniejszenie zawartości helisy alfa obu białek jedynie w najwyższych stosowanych stężeniach (>100 µg/mL), natomiast nieistotnie wpływają na zmiany struktury drugorzędowej w niższych stężeniach. Dodatkowo za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej przeprowadzono test wygaszania fluorescencji tryptofanu (Trp) pod wpływem rosnącego stężenia AuNP. W badaniu tym obserwowano, czy dodanie nanocząstek będzie powodowało przesunięcie widma w kierunku dłuższych fal (red shift) lub krótszych (blue shift), co również mogłoby świadczyć o zmianach konformacyjnych HSA i Tf. Dany efekt zauważono w przypadku traktowania albuminy nanocząstką AuNP14a w wysokim stężeniu. Obecność nanocząstki spowodowała delikatne przesunięcie maksimum fluorescencji w kierunku fal czerwonych, z czego wywnioskować można, że struktura HSA uległa pewnemu rozluźnieniu, powodując większą ekspozycję tryptofanu.

Współpraca z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pozwoliła na zbadanie powinowactwa białek do nanocząstek złota oraz określenie efektów ich wiązania. W tym celu wykorzystano metodę izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC). Stwierdzono, że wszystkie reakcje obserwowane pomiędzy białkami, a nanocząstkami były endotermiczne, a zatem tworzenie wiązań wymagało pobrania energii z otoczenia. Również w tym przypadku najsilniejsze oddziaływanie obserwowano pomiędzy albuminą, a AuNP14a, natomiast najslabsze efekty zanotowano w przypadku transferyny i AuNP14b.

W kolejnym etapie pracy zbadano oddziaływanie AuNP z modelowymi błonami lipidowymi. Liposomy zostały przygotowane z wykorzystaniem syntetycznego lipidu DMPC metodą ekstruzji. Analiza zdjęć otrzymanych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) udowodniła, że liposomy DMPC w obecności nanocząstek złota zachowują swoją formę i nie ulegają degradacji. Pomiar ładunku powierzchniowego liposomów wykazał, że obecność nanocząstek złota powoduje jego zmianę z neutralnego na dodatni. Dodatkowo zbadano wpływ nanocząstek na płynność błon lipidowych. W tym celu zmierzono anizotropię fluorescencji znaczników TMA-DPH oraz DPH wbudowanych w dwuwarstwę lipidową. Pierwszy z wymienionych znaczników lokalizuje się w polarnej, zewnętrznej części błony, natomiast drugi zakotwicza się w niepolarniej, wewnętrznej części dwuwarstwy. Zaobserwowano, że obie badane nanocząstki powodowały wzrost anizotropii fluorescencji zarówno w przypadku sondy DPH, jak i TMA-DPH.

Wyniki te wskazują, że AuNP14a i AuNP14b powodują usztywnienie błony i zmniejszenie jej płynności, a zatem wchodzi one w interakcje z dwuwarstwą lipidową.

Celem ostatniej pracy wchodzącej w skład rozprawy zatytułowanej „Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer’s Disease” była ocena zdolności utworzonych kompleksów AuNP/siRNA do wnikania do komórek śródbłonna oraz określenie efektów biologicznych wywołanych przez nanocząstki. W pierwszym etapie pracy z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej została oceniona wydajność wnikania badanych kompleksów do komórek linii HBEC-5i. Obecność kompleksów w komórkach obserwowano już po 3 godzinach inkubacji, jednak procent internalizacji wynosił około 40% w przypadku kompleksów AuNP14a/siRNA i zaledwie ok. 10% w przypadku AuNP14b/siRNA. Po 24 godzinnej inkubacji komórek z kompleksami AuNP/siRNA zaobserwowano 80% internalizację w przypadku obu badanych kompleksów. Dodatkowo wykazano, że internalizacja nieskompleksowanego siRNA utrzymywała się na poziomie około 5% po 3 i 24 godzinach inkubacji. Za pomocą techniki mikroskopii konfokalnej zobrazowano obecność znakowanego siRNA będącego składnikiem kompleksu AuNP/siRNA wewnątrz komórek. Analiza obrazów z uzyskanych zdjęć pozwoliła zaobserwować, że kompleksy AuNPs/siRNA lokują się głównie w cytoplazmie badanych komórek.

W kolejnym etapie pracy sprawdzono czy nanocząstki i ich kompleksy z siRNA wykazują działanie genotoksyczne w komórkach śródbłonna. W tym celu wykonano test kometowy. Wykazano, że po 24 godzinnej inkubacji nanocząstka AuNP14a powodowała nieznaczne uszkodzenia DNA na poziomie 10%, jednak efekt ten został zniesiony po skompleksowaniu z siRNA. Nanocząstka AuNP14b nie wywoływała efektu genotoksycznego zarówno podana w stanie wolnym, jak i w kompleksie z siRNA.

Następnie zbadano poziom reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach śródbłonna oraz zmiany potencjału mitochondrialnego w różnych odstępach czasowych po podaniu nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA. Sprawdzenie tych parametrów pozwoliło na określenie czy organelle komórkowe i ich metabolizm nie uległy uszkodzeniu po podaniu badanych związków. Do pomiaru RFT wykorzystano fluorescencyjny znacznik H2DCF-DA, natomiast zmiany potencjału mitochondrialnego zostały określone za pomocą sondy JC-1. Wyniki pomiarów wskazały, że po 30 minutach komórki reagowały gwałtownym wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu, a efekt ten był najbardziej zauważalny w obecności kompleksu AuNP14b/siRNA. Jednocześnie

obserwowano, że po 3 oraz 24 godzinach po podaniu związków poziom RFT stabilizował się i wracał do poziomu fizjologicznego. Zmiany potencjału mitochondrialnego były najbardziej widoczne po 3 godzinach inkubacji komórek z badanymi związkami. Błony mitochondrialne w zależności od podanego związku ulegały depolaryzacji lub hiperpolaryzacji, przy czym po 24 godzinach obserwowano tendencję do stabilizacji i powrotu do wartości wyjściowych.

Ostatnim etapem trzeciej pracy było sprawdzenie cytotoksyczności badanych kompleksów wobec dwóch dodatkowych linii komórkowych: astrocytów (HA) i perycytów (HBVP). Komórki te, wraz ze zbadanymi już wcześniej komórkami śródbłonna, wykorzystywane są do tworzenia modeli bariery krew-mózg w warunkach *in vitro*. Planując rozszerzenie badań na tym modelu, w pracy skupiono się na sprawdzeniu, czy nanocząstki i ich kompleksy wywołują efekt cytotoksyczny w monohodowlach. W przeprowadzonym teście MTT po 24 godzinnej inkubacji komórek z AuNP i AuNP/siRNA stwierdzono, że wolne nanocząstki są bardziej cytotoksyczne niż ich kompleksy z siRNA w stosunku do obu linii komórkowych. AuNP14a wywoływały zależny od stężenia efekt cytotoksyczny, który był łagodzony przez kompleksację z siRNA. Nanocząstki AuNP14b wydawały się bardziej cytotoksyczne w małych dawkach, szczególnie dla komórek HBVP. Z kolei wyższe stężenia zarówno AuNP14b, jak i jego kompleksu z siRNA nie wykazały istotnej cytotoksyczności względem badanych komórek.

Wyniki nieopublikowane

Materiały i metody

Hodowla komórek tworzących model bariery krew-mózg *in vitro*

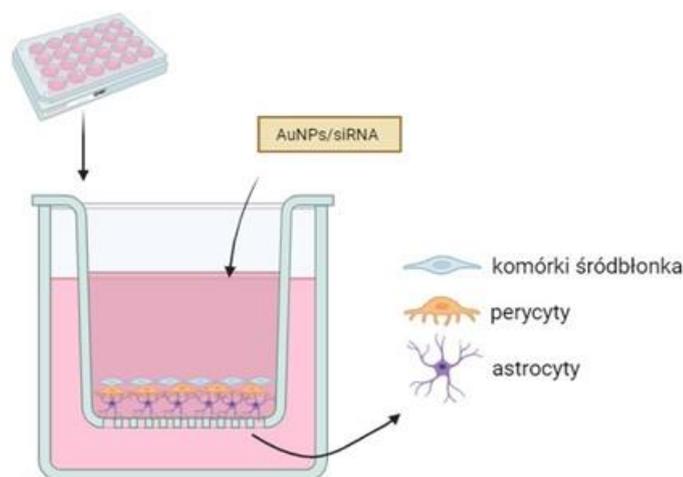
W celu stworzenia modelu bariery krew-mózg prowadzono hodowle komórkowe z wykorzystaniem wkładów membranowych o średnicy porów 1 μm (ThinCert Cell Culture Inserts, Greiner Bio-One, NC, USA) umieszczanych na 24-dołkowych płytkach polistyrenowych. Wkłady pokryte poli-L-lizyną (PLL) (ScienCell Research Laboratories, CA, USA) w stężeniu 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pozostawiano w inkubatorze (37°C, 5 % CO_2) na minimum godzinę. Następnie usuwano nadmiar PLL, na wkładkę wysiewano astrocyty (HA) w gęstości 2 x 10⁴ kom/cm², a do dołków płytki wlewano medium dedykowane do hodowli astrocytów (Astrocyte Medium, ScienCell Research Laboratories, CA, USA). Po 48 godzinach hodowli wysiewano perycyty (HBVP) w gęstości 2 x 10⁴ kom/cm² wymieniając medium na dedykowane do hodowli perycytów (Pericyte Medium, ScienCell Research Laboratories, CA, USA). Po kolejnej 48-godzinnej inkubacji usuwano medium, wysiewano komórki śródbłonka (HBEC-5i) w gęstości 8 x 10⁴ kom/cm² i inkubowano przez kolejne 9 dni w medium przeznaczonym do hodowli komórek śródbłonka (DMEM-F12, Biowest, Nuaille, France), wymieniając je co 48 godzin [20]. Następnie dodawano badane związki.

Pomiar śródbłonkowego oporu elektrycznego (TEER, ang. *transendothelial electrical resistance*)

Pomiary TEER przeprowadzono w celu określenia integralności modelu bariery, przed a następnie po dodaniu badanych związków (**Rycina 4.**). W tym celu wykorzystano aparat epitelialny Volto-Ohmomierz EVOM3 (World Precision Instruments, FL, USA) z komorą EndOhm posiadającą dwie okrągłe elektrody. Pomiary rozpoczęto po 24 godzinach od dodania ostatniej linii komórkowej do hodowli, a następnie opór elektryczny modelowej bariery mierzono codziennie przez 12 dni od dodania związków. Wyniki przedstawiono jako wartość oporu R [Ω] po odjęciu tła, które stanowił wkład z czystym medium, bez komórek. Otrzymaną wartość przeliczano na powierzchnię wkładu według wzoru:

$$R_k = (R_1 - R_2) \times A$$

gdzie, R_k – opór końcowy, R_1 – opór kohodowli, R_2 – opór tła, A – powierzchnia wkładu w cm^2 .



Rycina 4. Schemat hodowli astrocytów (HA), perycytów (HBVP) i komórek śródbłonka (HBEC-5i) odpowiadającej modelowi bariery krew-mózg warunkach *in vitro*

Test przepuszczalności bariery krew-mózg z wykorzystaniem dekstranu znakowanego fluoresceiną

W kolejnym etapie sprawdzono, jak badane nanocząstki złota i ich kompleksy wpływają na przepuszczalność modelowej bariery krew-mózg. W tym celu do hodowli komórek na wkładzie dodano znakowany fluoresceiną dekstran 40 kDa (Invitrogen, MA, USA) o końcowym stężeniu 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Wkłady przełożono na czarne płytki 24-dołkowe, w których umieszczono medium hodowlane. Ilość dekstranu, który przepłynął z wkładu do dołka płytki mierzono przez 2 godziny w dwóch odstępach czasowych, 3 dni po dodaniu związków oraz 5 dni po dodaniu związków do hodowli komórek. Pomiary fluorescencji wykonano na czytniku płytek Biotek (BioTek Instruments Inc., VT, USA), ustawiając długość fali wzbudzenia na 485 nm, a długość fali emisji na 530 nm. Uzyskane wyniki przeliczono na procent przepuszczalności względem komórek nietraktowanych według wzoru:

$$P = F_p / F_k \times 100\%$$

gdzie: P – przepuszczalność, F_p – fluorescencja badanej próby, F_k – fluorescencja próby kontrolnej.

Określenie cytotoksyczności badanych związków na podstawie pomiarów impedancji mierzonej w czasie rzeczywistym

W celu zbadania cytotoksyczności AuNP i AuNP/siRNA względem komórek tworzących model bariery krew-mózg zmierzono impedancję. Wykorzystano do tego aparat xCELLigence RTCA eSight (Agilent Technologies, CA, USA). Komórki wysiano na dedykowane do aparatu płytki 96-dołkowe z mikroelektrodami (E-plate) zgodnie z wyżej opisaną metodą. Przeżywalność komórek przedstawiono jako Cell Index. Dodatkowo do komórek dodano znacznik eLive (Agilent Technologies, CA, USA), który związany z DNA daje sygnał fluorescencyjny. Razem z kamerą zintegrowaną z aparatem umożliwiło to rejestrację proliferacji w czasie rzeczywistym. Efekty przedstawiono na zdjęciach w wybranych odstępach czasowych.

Analiza odpowiedzi immunologicznej komórek z wykorzystaniem systemu MAGPIX

W końcowym etapie badań oceniono wpływ nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA na odpowiedź immunologiczną monojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC), poprzez oznaczenie poziomu wybranych cytokin. W tym celu wykorzystano system MAGPIX (Luminex, TX, USA) oparty na zasadzie testu immunoenzymatycznego ELISA. System wykorzystuje technologię mikrosfer paramagnetycznych opłaszczonych przeciwciałami i jest w stanie wykrywać wiele metabolitów jednocześnie. W celu przeprowadzenia badania wyizolowano komórki PBMC (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) z kożucha leukocytno-płytkowego pozyskanego z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi. Część zawartości kożucha zachowywano w celu pozyskania osocza. Komórki PBMC wyizolowano metodą wirowania na gradiencie Histopaque-1077 (Merck, Darmstadt, Niemcy) przez 30 min, 1600 obr/min. Osocze otrzymywano poprzez odwirowanie kożucha przez 15 min, 4200 obr/min. Komórki PBMC wysiano w dwóch rodzajach podłoży: 1) medium hodowlane RPMI (Biowest, Nuaille, Francja) z 10% FBS (Sigma-Aldrich, MA, USA) oraz 2) medium hodowlane RPMI z 45% osoczem od tego samego dawcy. Badane związki również zostały przygotowane w dwóch układach, 1) zawieszono w standardowym buforze PBS oraz 2) zawieszono w roztworze PBS z 45 % osoczem. Po 45 minutach inkubacji związków w badanych układach, dodawano je do wcześniej wysianych komórek. Kontrolę pozytywną w układzie stanowił LPS *E.coli* O55:B5 (Merck, Darmstadt, Niemcy) w stężeniu końcowym 1 µg/mL. Po 48 godzinach inkubacji zebrano supernatanty z hodowli, a następnie oznaczono w nich poziom IFN-α₂, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40 oraz TNF-α. Analiza

poziomu cytokin z wykorzystaniem systemu MAGPIX została przeprowadzona w komercyjnej współpracy z Uniwersyteckim Laboratorium Komórkowym CoreLab działającym przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi. Do analizy otrzymanych danych wykorzystano program Belysa Immunoassay Curve Fitting (Merck Darmstadt, Niemcy). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm standardowy błąd średniej z 6 powtórzeń.

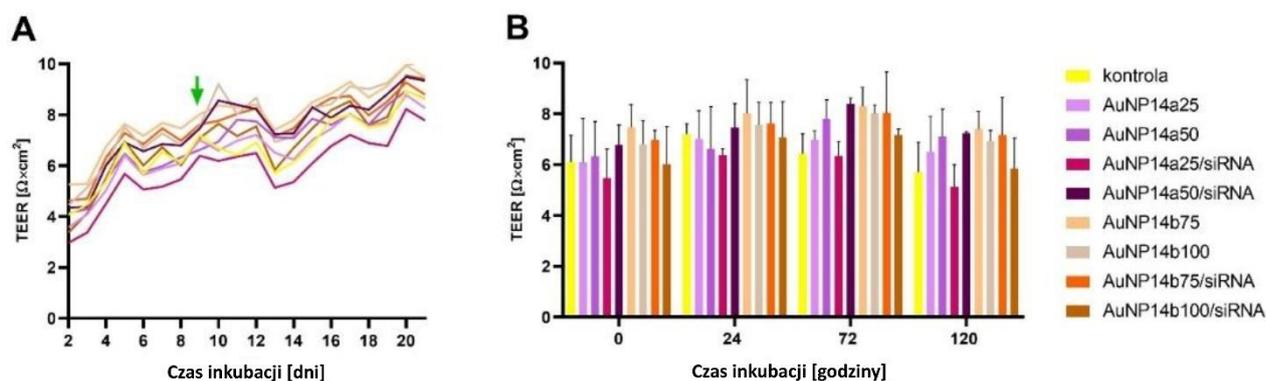
Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, MA, USA). Do obliczeń wykorzystano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Wyniki uznawano za statystycznie istotne przy wartości $p < 0.05$.

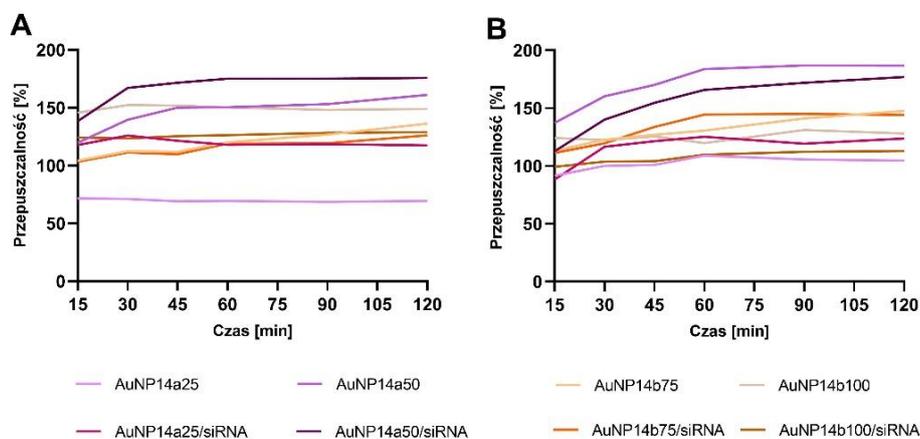
Wyniki

Integralność komórek tworzących model bariery krew-mózg określona na podstawie pomiarów TEER i testu przepuszczalności dekstranu

W pierwszym etapie badań oceniono zmiany oporu elektrycznego modelowej bariery krew-mózg utworzonej z komórek HA, HBVP i HBEC-5i, rejestrowane pod wpływem badanych nanocząstek złota. Pomiar TEER prowadzono codziennie od 2 doby po wysianiu komórek, przez kolejne 9 dni, po czym do hodowli dodawano badane związki i przez kolejne 12 dni wykonywano dalsze pomiary. Zaobserwowano, że opór elektryczny komórek rósł w czasie, a obecność badanych związków wpłynęła na ten efekt w niewielkim stopniu (**Rycina 5**). Po 5 dniach inkubacji zaobserwowano niewielki wzrost oporu elektrycznego po dodaniu nieskompleksowanej nanocząstki AuNP14a w stężeniu 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oraz niewielki spadek w stężeniu 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Obecność AuNP14b w stężeniu 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zarówno w stanie nieskompleksowanym, jak i skompleksowanym z siRNA powodowała nieznaczny wzrost oporu elektrycznego. Odnotowane zmiany nie były jednak istotne statystycznie zarówno w porównaniu do czasu „0” oznaczającego pomiar przed dodaniem badanych związków, jak i względem wartości uzyskanych dla komórek nietraktowanych.



Rycina 5. Wpływ nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA na zmiany oporu elektrycznego (TEER) modelu bariery krew-mózg *in vitro*. A) Zmiany wartości TEER mierzone od 2 doby po wysianiu komórek HBEC-5i. Zielona strzałka wskazuje dzień dodania związków do hodowli. B) Wartości TEER monitorowane w czasie inkubacji z badanymi związkami. Dane przedstawiają średnią \pm SD ($n = 3$).



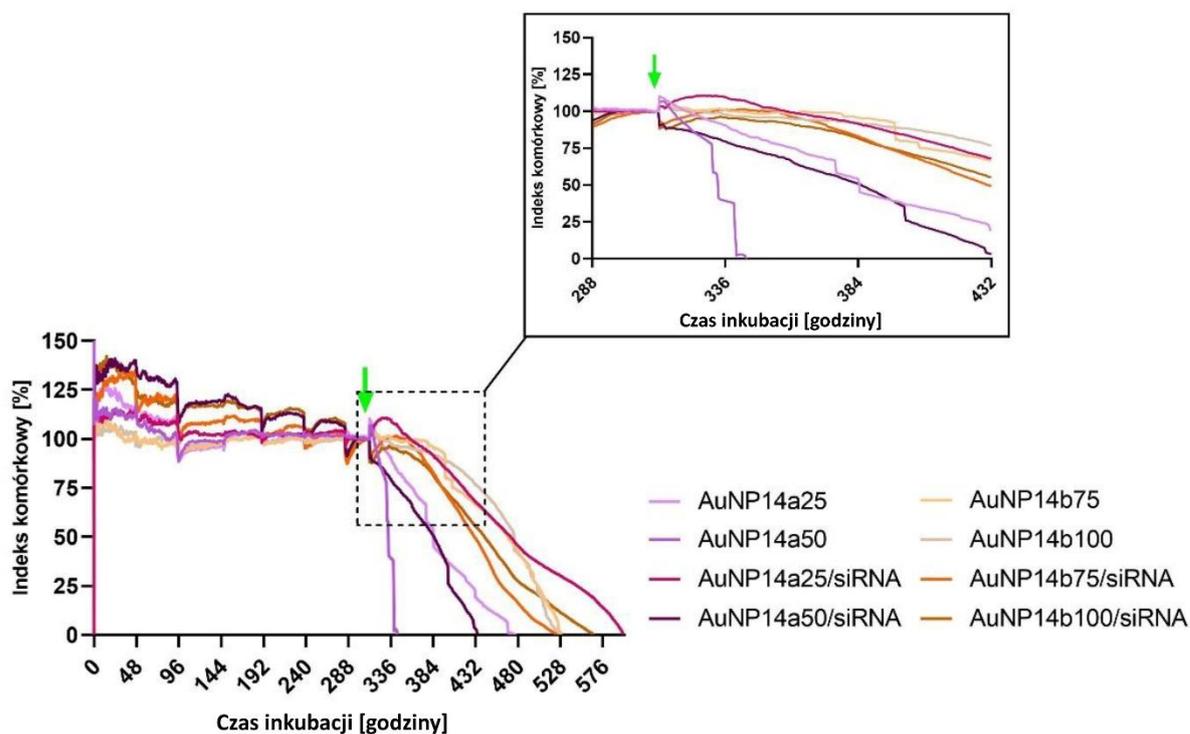
Rycina 6. Wpływ nanocząstek złota oraz ich kompleksów z siRNA na przepuszczalność modelowej bariery krew-mózg utworzonej z komórek HA, HBVP i HBEC-5i, oceniany w 3 dniu (A) i 5 dniu (B) po aplikacji związków. Wartości zostały znormalizowane względem komórek nietraktowanych (kontrola). Wyniki zaprezentowane na wykresach stanowią średnią z trzech prób.

W kolejnym etapie oceniono integralność modelu bariery krew-mózg z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanego dekstranu. Hodowlę komórek prowadzono w identyczny sposób jak przy pomiarach TEER. Test z dekstranem wykonano trzeciego i piątego dnia inkubacji z badanymi związkami. W obu odstępach czasowych największy wzrost przepuszczalności bariery obserwowano w ciągu 30 minut od dodania znakowanego dekstranu (**Rycina 6**). W trzecim dniu w obecności AuNP14a w stężeniu 25 µg/mL odnotowano uszczelnienie bariery. Mimo, że w piątym dniu zaobserwowano wzrost przepuszczalności bariery, jej wartość nadal pozostawała zbliżona do poziomu obserwowanego w próbach kontrolnych.

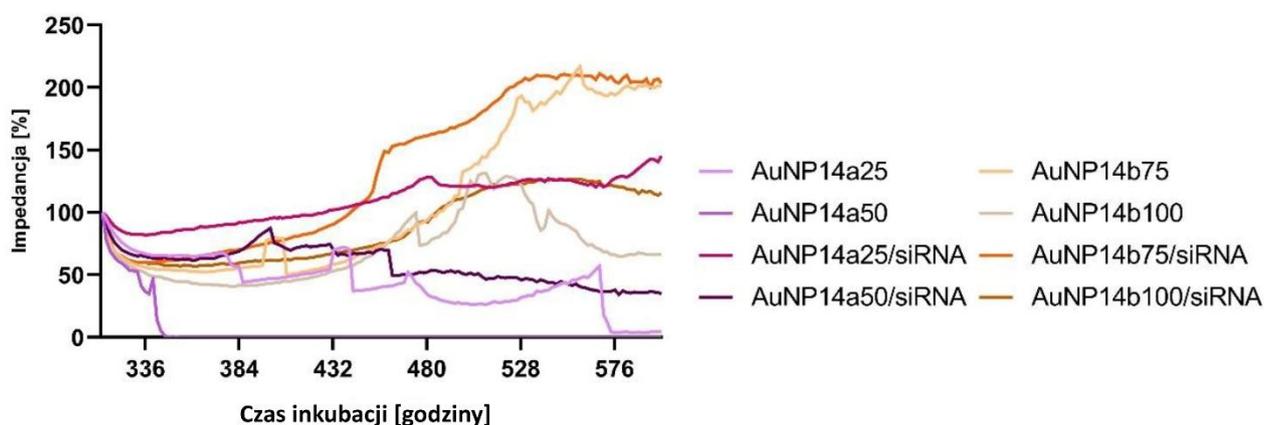
Zbliżony poziom niskiej przepuszczalności zaobserwowano po zastosowaniu kompleksu AuNP14a/siRNA. Jednakże ta sama nanocząstka w wyższym stężeniu znacząco zaburzała integralność bariery, prowadząc do ok. 50% wzrostu przepuszczalności, zarówno w postaci wolnej, jak i w formie kompleksu z siRNA. Efekty obserwowane po zastosowaniu nanocząstki AuNP14b były bardziej łagodne i w obu odstępach czasowych powodowały wzrost przepuszczalności o 20-25%. Jedynie zastosowanie AuNP14b w wyższym stężeniu (100 µg/mL) w trzecim dniu inkubacji istotnie obniżało integralność bariery, powodując zwiększenie przepuszczalności dla dekstranu o około 50% w porównaniu z komórkami nietraktowanymi.

Ocena wpływu nanocząstek złota na przeżywalność komórek w modelu bariery krew-mózg

Żywotność i integralność komórek została sprawdzona przed i po dodaniu badanych związków z wykorzystaniem systemu RTCA (analiza komórek w czasie rzeczywistym, ang. *real-time cell analysis*), który umożliwia pomiar impedancji komórek. Aparat wyposażony jest w mikroskop fluorescencyjny z kamerą, umożliwiającą rejestrowanie obrazów w wybranych interwałach czasowych. Obserwacje prowadzono od dnia wysiania komórek pierwszej linii przez następne 27 dni. Po 9 dniach od wysiania komórek ostatniej linii dodano testowane związki oraz znacznik fluorescencyjny eLive, barwiący żywe komórki. Intensywność fluorescencji została przeliczona na wartości liczbowe umożliwiając ilościową ocenę przeżywalności komórek. Zaobserwowano, że dodanie nanocząstek oraz ich kompleksów z siRNA do hodowli komórek spowodowało spadek impedancji zależny zarówno od rodzaju użytej nanocząstki oraz tego czy nanocząstka była skompleksowana z siRNA (**Rycina 7**). Zastosowanie nanocząstki AuNP14a w stężeniu 50 µg/mL spowodowało znaczący spadek impedancji, jednak efekt ten był łagodzony w przypadku obecności siRNA. Podobną zależność zaobserwowano w wynikach żywotności komórek (**Rycina 8**).



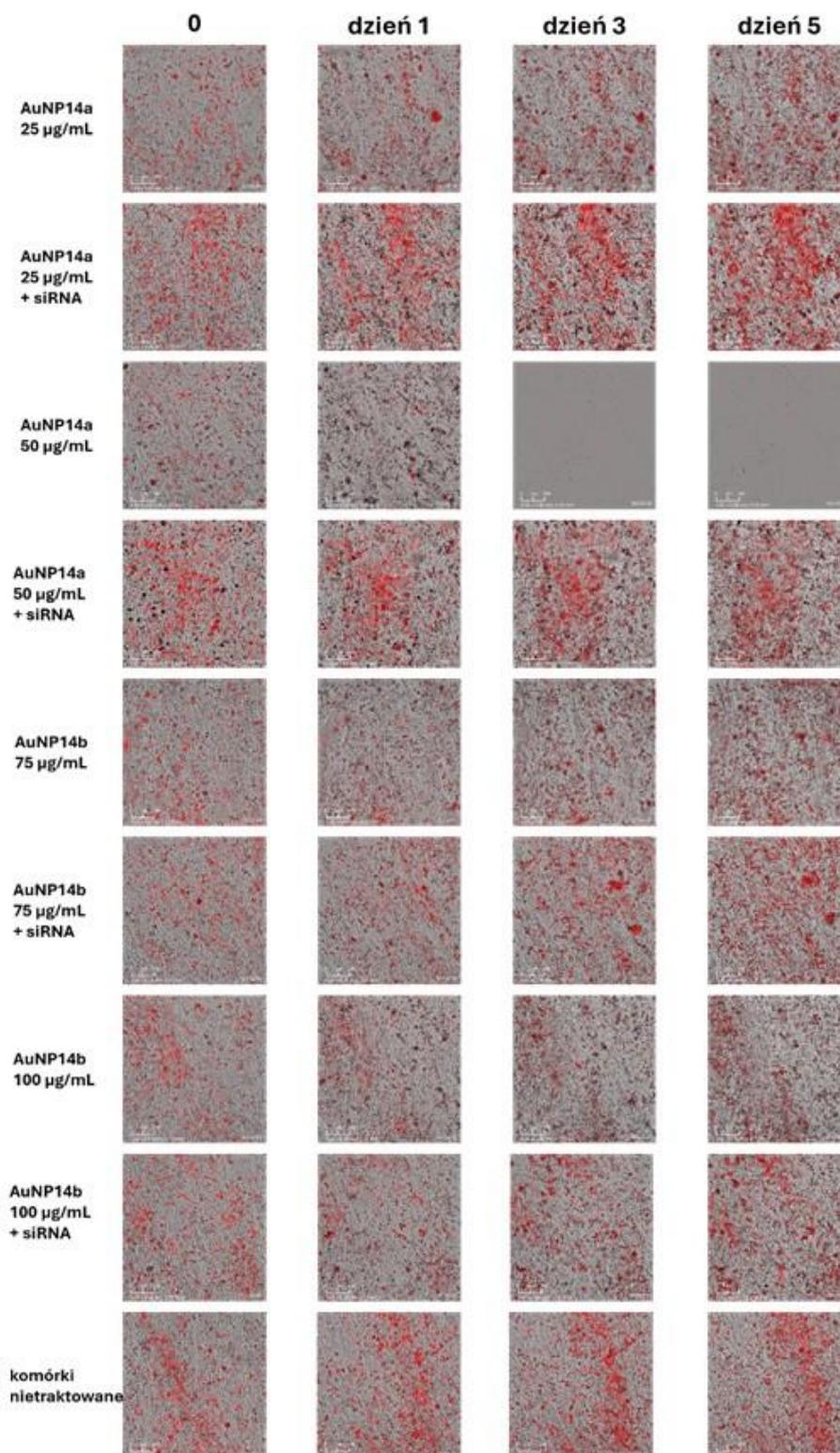
Rycina 7 Wpływ nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA na zmiany impedancji komórek HA, HBVP i HBEC-5i modelowej bariery krew-mózg znormalizowanej względem komórek nietraktowanych. Zielona strzałka wskazuje czas dodania do komórek badanych związków. W kwadracie po prawej stronie wykresu powiększono czas od 24 godzin przed traktowaniem do piątego dnia inkubacji ze związkami. Krzywe przedstawiają wyniki uśrednione ($n = 6$).



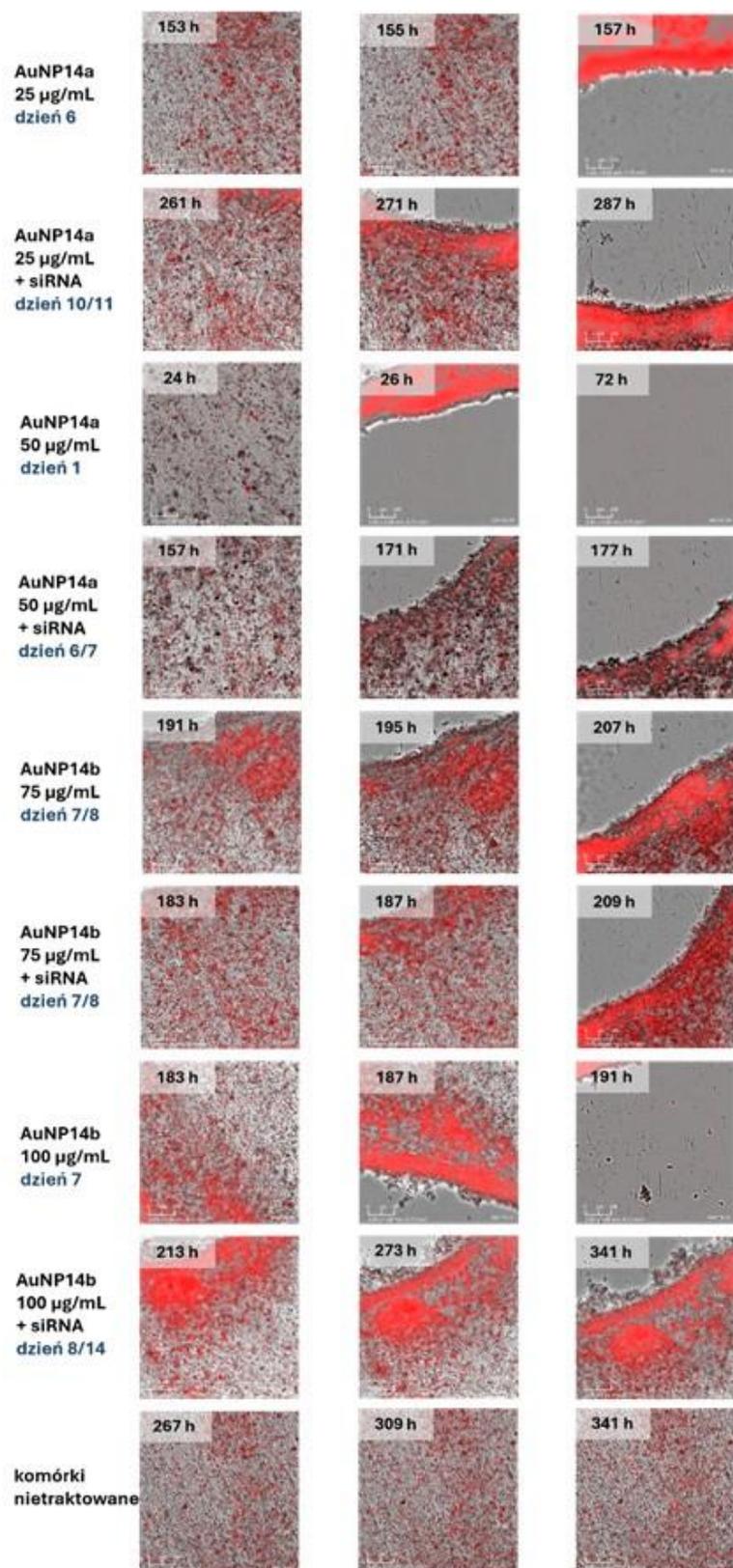
Rycina 8. Całkowita zintegrowana intensywność barwy czerwonej sygnału fluorescencyjnego (RRI, ang. *red total integrated intensity*) dla komórek traktowanych nanocząstkami złota i ich

kompleksami z siRNA w odniesieniu do kontroli negatywnej. Znacznik fluorescencyjny emitował sygnał w komórkach żywych. Krzywe przedstawiają wartości średnie (n = 6).

AuNP14a w stężeniu 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ w kompleksie z siRNA nie wpływało na integralność bariery od 1 do 10 dnia inkubacji (**Rycina 9 i 10**). Nanocząstka AuNP14b zarówno w formie wolnej, jak i skompleksowanej z siRNA niezależnie od zastosowanego stężenia nie spowodowała zmian impedancji ani nie wpływała na przeżywalność komórek w hodowli. Najmniejszy wpływ na zmiany morfologiczne bariery obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym wykazywał kompleks AuNP14b/siRNA w stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gdzie do ostatniego dnia eksperymentu obserwowano jedynie częściowe uszkodzenie struktury bariery oraz utrzymującą się wysoką żywotność komórek.



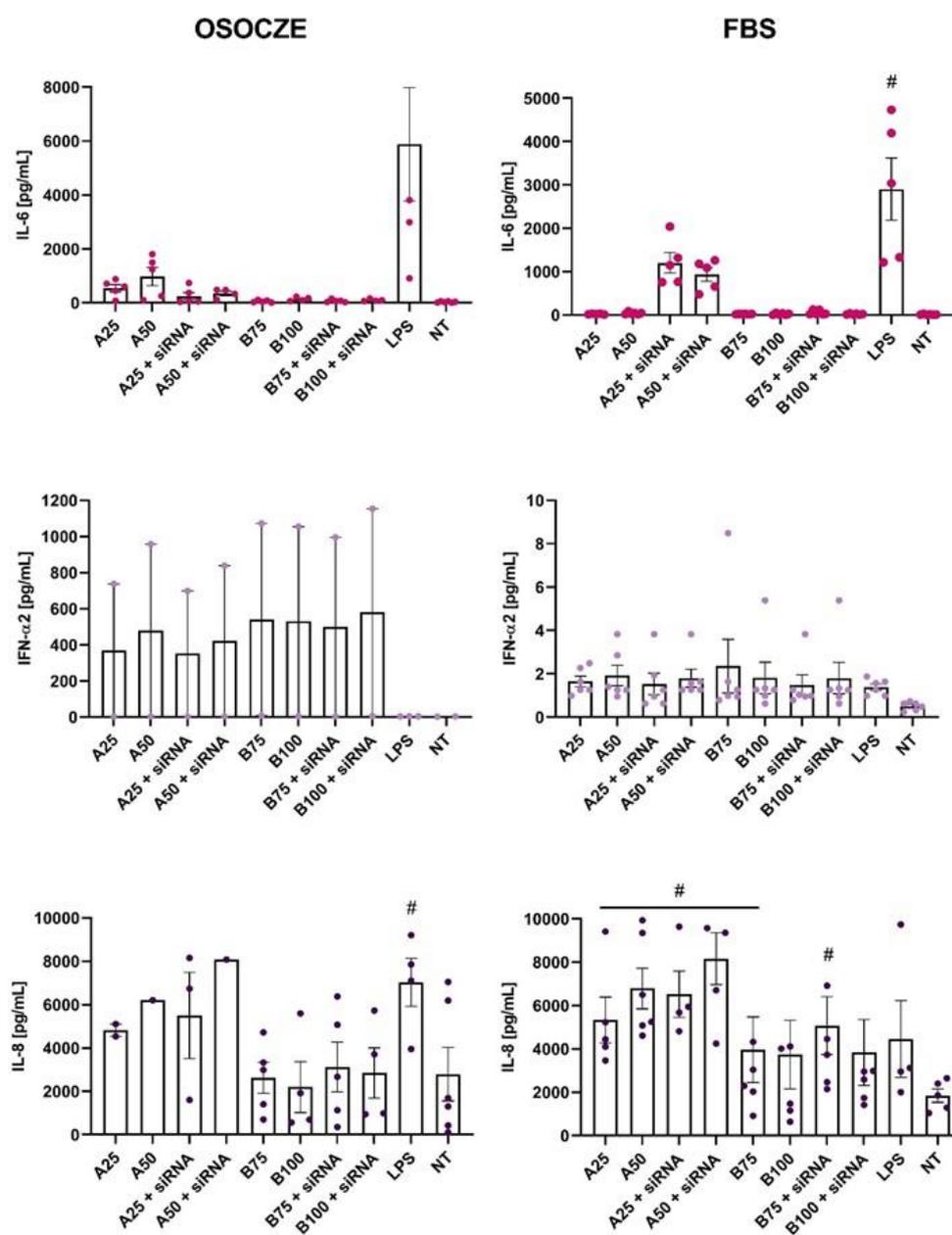
Rycina 9. Zdjęcia komórek modelu bariery krew-mózg po dodaniu nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA. Czerwony sygnał pochodzi od znacznika fluorescencyjnego, wiążącego się z DNA. Obrazy przedstawiają hodowlę komórek bezpośrednio po dodaniu nanocząstek (czas „0”) oraz po 24, 72 i 120 godzinach inkubacji.

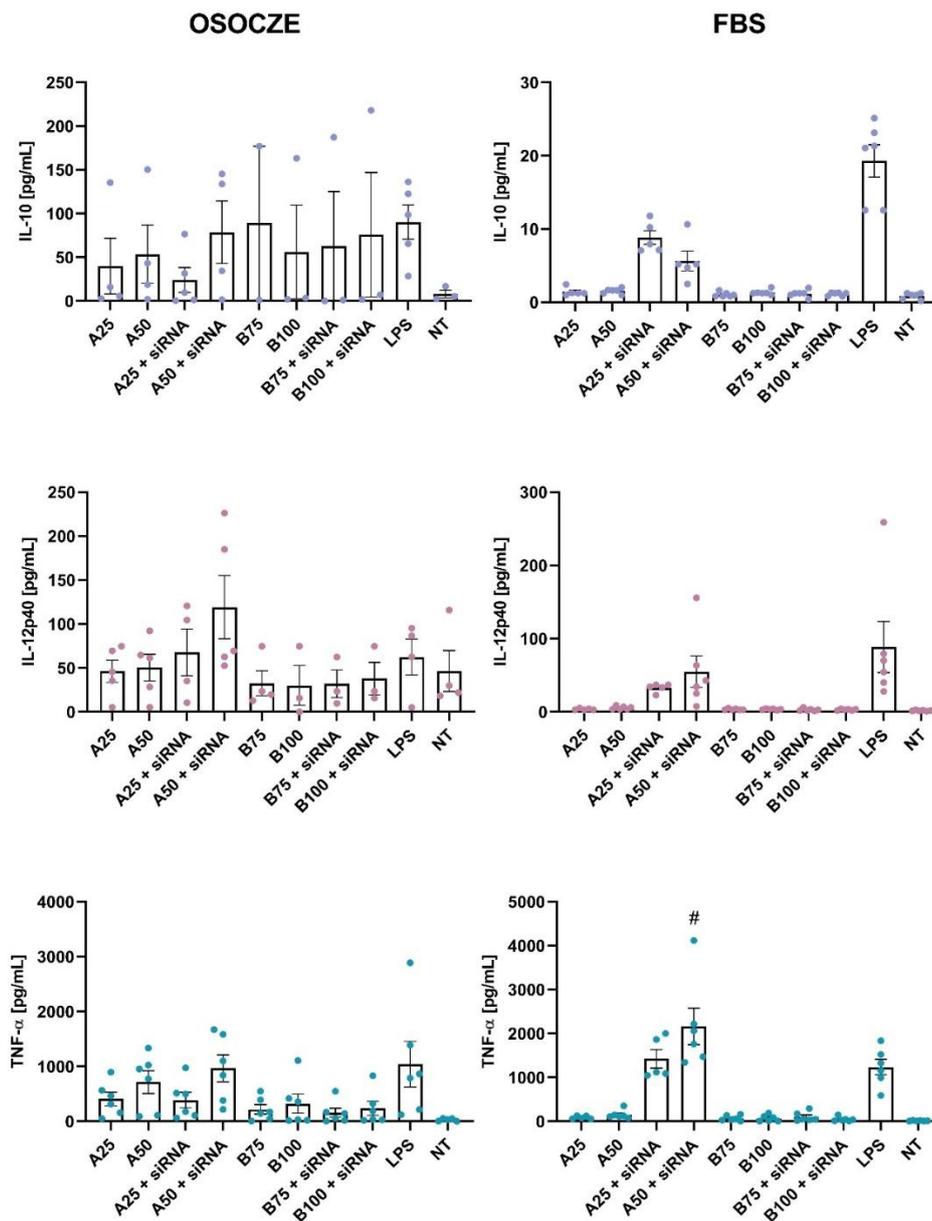


Rycina 10. Zdjęcia komórek modelu bariery krew-mózg przedstawiające zakres uszkodzeń w czasie, indywidualnie dla każdego badanego związku. W lewym górnym rogu każdego zdjęcia podano czas inkubacji od momentu aplikacji nanocząstek.

Odpowiedź immunologiczna komórek na badane nanocząstki złota

W kolejnym etapie badań sprawdzono jak nanocząstki złota i ich kompleksy z siRNA wpływają na odpowiedź immunologiczną komórek PBMC. Oceniono poziom sześciu wybranych cytokin w dwóch układach badawczych opisanych w sekcji „Materiały i metody”. Zaobserwowano, że wyniki otrzymane dla nanocząstek inkubowanych w obecności osocza w większości przypadków były bardziej zróżnicowane, niż te dla nanocząstek inkubowanych w obecności FBS (**Rycina 11**).





Rycina 11. Poziom cytokin wydzielanych przez komórki PBMC w obecności nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA. Komórki kontrolne opisano skrótem NT (nieotraktowane). Jako kontrolę pozytywną wykorzystano próbki zawierające lipopolisacharyd *E. coli* (LPS). Na rycinie przedstawiono skrócone nazwy stosowanych związków według legendy: AuNP14a 25 µg/mL – A25, AuNP14a 50 µg/mL – A50, AuNP14a 25 µg/mL + siRNA – A25 + siRNA, AuNP14a 50 µg/mL + siRNA – A50 + siRNA; AuNP14b 75 µg/mL – B75, AuNP14b 100 µg/mL – B100, AuNP14b 75 µg/mL + siRNA – B75 + siRNA, AuNP14b 100 µg/mL + siRNA – B100 + siRNA. Wykresy przedstawiają dane indywidualne w postaci kropek oraz wartości średnie ± SEM w postaci słupków (n = min. 3).

Zarówno podczas inkubacji z osoczem, jak i z FBS, nanocząstki indukowały wydzielanie IL-8 na stosunkowo wysokim i porównywalnym poziomie. Podobną tendencję obserwowano także dla IL-12p40, jednak w tym przypadku poziom wydzielanych cytokin był wyższy w obecności osocza. Poziomy TNF- α i IL-6 również były wyższe po zastosowaniu nanocząstek inkubowanych w osoczu w porównaniu do tych inkubowanych w FBS. Wyjątek stanowiły kompleksy AuNP14a/siRNA, które wywołały silniejszą odpowiedź cytokinową w warunkach pozbawionych osocza. Stężenia IL-10 i INF- α 2 były istotnie niższe i bardziej stabilne, w przypadku zastosowania nanocząstek inkubowanych z FBS w porównaniu do tych inkubowanych z osoczem.

Poziom badanych cytokin był zauważalnie wyższy po zastosowaniu nanocząstek AuNP14a, w porównaniu do AuNP14b. Dodatkowo, w większości przypadków, kompleksacja AuNP14a z siRNA potęgowała odpowiedź immunologiczną prowadząc do zwiększenia produkcji cytokin. Jednak jedyną statystycznie istotną różnicę w poziomie wydzielanych cytokin w porównaniu do komórek nietraktowanych odnotowano dla IL-8 w układzie z FBS.

Omówienie wyników nieopublikowanych

Nanocząstki złota są intensywnie badane jako nośniki leków oraz kwasów nukleinowych. W literaturze opisano również wykorzystanie pegylowanych nanocząstek złota do dostarczania czynników terapeutycznych do komórek. Jednak wiele dotychczasowych badań koncentruje się wyłącznie na tworzeniu kompleksów nanocząstek z biomolekułami, pomijając istotne czynniki, które mogą ograniczać skuteczność transportu przenoszonego materiału do komórek docelowych. W ramach niniejszej pracy doktorskiej pegylowane nanocząstki złota zostały przebadane pod kątem ich potencjału do przenoszenia terapeutycznego siRNA oraz zdolności przekroczenia modelowej bariery krew-mózg, utworzonej z trzech różnych typów komórek, w tym komórek śródbłonna. Sprawdzono wpływ nanocząstek na integralność utworzonej bariery oraz przeżywalność zastosowanych komórek w hodowli *in vitro*. W tym celu zastosowano szereg metod takich jak pomiar śródbłonkowego oporu elektrycznego (TEER), analiza przepuszczalności z wykorzystaniem dekstranu znakowanego fluoresceiną oraz pomiary impedancji i żywotności komórek w czasie rzeczywistym (RTCA). Technika TEER umożliwia ilościowy pomiar oporu

elektrycznego [21], a uzyskane w wybranych odstępach czasowych dane odzwierciedliły integralność strukturalną bariery. Metoda RTCA została wykorzystana do analizy zmian impedancji w czasie rzeczywistym na podstawie adhezji komórek do pokrytego elektrodami dna płytki [22]. Zebrane dane umożliwiły przeprowadzenie oceny połączeń międzykomórkowych oraz analizę żywotności komórek. Wyniki pomiarów TEER nie wykazały istotnych zmian oporu elektrycznego komórek tworzących model bariery krew-mózg pod wpływem badanych nanocząstek oraz ich kompleksów z siRNA w porównaniu do grupy kontrolnej którą stanowiły komórki nietraktowane. Jedynie kompleks AuNP14a/siRNA (25 µg/mL) powodował nieznaczny spadek oporu elektrycznego. Wartości rezystencji dla pozostałych związków były zbliżone lub niewiele większe niż dla komórek kontrolnych.

W pomiarach impedancji oraz żywotności komórek nanocząstka AuNP14a w stężeniu 50 µg/mL wykazywała najwyższą cytotoksyczność, gdy była stosowana w stanie nieskompleksowanym. Kompleksacja z siRNA łagodziła efekt cytotoksyczny. Pozostałe badane formułacje powodowały odklejanie komórek od dna płytki/elektrod po 6-10 dniach od ich dodania, przy czym szybkość tego procesu była różna dla różnych związków. Zarówno w pomiarach RTCA jak i TEER, obserwowano, że nanocząstka AuNP14b wpływała w mniejszym stopniu na integralność bariery niż AuNP14a. Wyniki testu na przepuszczalność bariery z wykorzystaniem dekstranu w większym stopniu pokrywały się z wynikami uzyskanymi metodą pomiaru impedancji niż z wynikami TEER. Wyraźnie obserwuje się, że spadek impedancji spowodowany obecnością AuNP14a w wyższym stężeniu (**Rycina 7**) koreluje ze wzrostem przepuszczalności bariery (**Rycina 6**). Podobnie, powolny spadek impedancji w czasie wywołany przez kompleks AuNP14a/siRNA (25 µg/mL) został odnotowany jako znikomy wpływ na przepuszczalność bariery w pierwszych dniach po podaniu związku. Otrzymane wyniki dają podstawy do przypuszczeń, że podanie kompleksów AuNP/siRNA w warunkach *in vivo* nie powinno negatywnie wpływać na funkcjonalność bariery. Jednak zastosowane metody, choć miarodajne, posiadają swoje ograniczenia i warto zaznaczyć, że są punktem wyjściowym dla bardziej złożonych analiz. Biorąc pod uwagę, że bariera krew-mózg jest narażona na nacisk spowodowany ciśnieniem krążącej krwi [23], w przyszłości warto przeprowadzić pomiary TEER w odpowiednich warunkach przepływu (ang. *shear stress*).

Wprowadzenie nowego związku do organizmu wiąże się z ryzykiem wystąpienia mniej lub bardziej nasilonej reakcji odpornościowej. Nanocząstki złota mogą wywoływać szereg odpowiedzi

immunologicznych, począwszy od łagodnej eliminacji przez makrofagi, aż po silną reakcję przeciwwzapalną. Reakcja odpornościowa komórek może zdecydować czy związek będzie w stanie dotrzeć do miejsca docelowego, czy zostanie zniszczony przez komórki układu immunologicznego [24]. W niniejszej pracy doktorskiej sprawdzono charakter odpowiedzi immunologicznej wywołanej przez badane nanocząstki w komórkach monojądrzastych krwi obwodowej na przykładzie określenia produkowanych przez komórki wybranych cytokin. Modyfikacja nanocząstek cząsteczkami PEG zwiększa ich hydrofilność oraz zmniejsza podatność na interakcje z białkami maskując nanocząstkę przed rozpoznaniem przez komórki układu odpornościowego. Z drugiej strony PEG może również być czynnikiem wywołującym reakcje nadwrażliwości. Na odpowiedź układu odpornościowego wobec nanocząstek wpływa szereg czynników, w tym ich kształt, rozmiar czy ładunek, a także rodzaj i stężenie zastosowanego PEG [25]. Pomimo, że pegylowane nanocząstki złota często opisywane są jako związki ignorowane przez układ odpornościowy [25,26], ich właściwości powinny być oceniane indywidualnie w każdym przypadku.

W niniejszej pracy analizę odpowiedzi immunologicznej wywołanej przez nanocząstki złota oraz ich kompleksy z siRNA przeprowadzono w dwóch układach: standardowym, w którym związki zawieszano w buforze i dodawano do medium zawierającym surowicę bydlęcą oraz alternatywnym, w którym nanocząstki były preinkubowane i hodowane w obecności osocza. Osocze zastosowano w celu stworzenia warunków możliwie najbardziej zbliżonych do warunków *in vivo* oraz w celu oceny czy opsonizacja nanocząstek białkami osocza wpływa na odpowiedź immunologiczną komórek. Odpowiedź immunologiczną oceniano na podstawie analizy stężeń sześciu wybranych cytokin, tj. IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, TNF- α i IFN- α 2. Zaobserwowano, że zastosowanie badanych związków silnie indukowało wydzielanie cytokiny IL-8, która pełni funkcję chemokiny. Jest ona jednym z najsilniejszych czynników przyciągających neutrofile i odgrywa istotną rolę w odpowiedzi na infekcje [27]. W warunkach inkubacji z FBS wykazano, że zarówno wolna forma AuNP14a, jak i jej kompleks z siRNA istotnie zwiększa poziom IL-8 w porównaniu do komórek nietraktowanych. Dla nanocząstki AuNP14b podobną zależność zaobserwowano dla kompleksu z siRNA w stężeniu 75 μ g/mL. Należy podkreślić, że neutrofile przyciągane przez IL-8 uczestniczą w eliminacji martwych komórek, dlatego obserwowany wzrost poziomu tej cytokiny po 48-godzinnej inkubacji z nanocząstkami może być częściowo związany z ich potencjalną cytotoksycznością. Ponadto, mimo braku istotności statystycznej, nanocząstka AuNP14a

wykazywała silniejsze działanie indukujące wydzielanie IL-12p40, TNF- α oraz IL-10 w porównaniu do AuNP14b, szczególnie w warunkach inkubacji z osoczem. Zaobserwowany efekt ten może wynikać z różnic w wielkości nanocząstek.

Nanocząstki o mniejszej średnicy, takie jak AuNP14b (23.3 nm) mogą posiadać powierzchnię niewystarczającą do skutecznego wiązania białek układu dopełniacza które odgrywają kluczową rolę w mechanizmach nieswoistej odpowiedzi odpornościowej [24]. Wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak IL-6 czy TNF- α , może wskazywać na aktywację układu dopełniacza [28]. Otrzymane wyniki wskazują, że cytokiny te wytwarzane są na niewielkim poziomie po inkubacji komórek z większą nanocząstką AuNP14a (34 nm) i jej kompleksami z siRNA, podczas gdy traktowanie ich AuNP14b o mniejszej średnicy nie wywołuje widocznego efektu. Po 48 godzinach inkubacji nanocząstki wykazywały zdolność do aktywacji chemokin. Zaobserwowano przewagę indukcji cytokin prozapalnych, w porównaniu do cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10. Nanocząstki AuNP14a w niewielkim stopniu stymulowały produkcję cytokin prozapalnych, zwłaszcza, gdy były inkubowane w obecności osocza. Nanocząstki AuNP14b wywierały minimalny wpływ na poziom badanych cytokin, co może wskazywać, że pozostały nierozpoznane przez komórki układu odpornościowego. Silniejsza odpowiedź immunologiczna obserwowana w przypadku układu z nanocząstkami inkubowanymi w obecności osocza może być związana z obecnością w badanych próbkach przeciwciał anty-PEG, które wykrywane są u ok. 20 % ludzi [29].

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań można wnioskować, że pegylowane karbokrzemowe nanocząstki złota AuNP14a i AuNP14b skoniugowane z siRNA nie zaburzają integralności modelowej bariery krew-mózg i nie wywołują istotnych efektów cytotoksycznych. Nanocząstka AuNP14a i jej kompleksy z siRNA indukują wyraźniejszą odpowiedź immunologiczną w porównaniu z nanocząstką AuNP14b. Otrzymane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych etapów badań, w celu opracowania skutecznych systemów dostarczania siRNA przez barierę krew-mózg.

Wnioski

1. Pegylowane nanocząstki złota AuNP14a i AuNP14b tworzą stabilne kompleksy z siRNA.
2. Nanocząstki złota wchodzą w interakcje z modelowymi i biologicznymi błonami lipidowymi, a także z albuminą i transferyną, nie zmieniając w sposób znaczący ich struktury.
3. Nanocząstki złota wykazują niską cytotoksyczność wobec komórek śródbłonna, astrocytów i perycytów wchodzących w skład modelu bariery krew-mózg.
4. Kompleksy AuNP/siRNA wnikają do komórek śródbłonna, lokalizując się głównie w cytoplazmie i nie wywołują istotnych efektów genotoksycznych.
5. Kompleksy nanocząstek złota z siRNA nie zaburzają integralności komórek hodowli stanowiącej model bariery krew-mózg *in vitro*.
6. Nanocząstka złota AuNP14a, w porównaniu do AuNP14b, cechuje się wyższą skutecznością w dostarczaniu siRNA oraz wyraźniejszym potencjałem immunomodulującym, co czyni ją bardziej obiecującym nośnikiem terapeutycznym.

Literatura

1. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 112, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25010112>
2. Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology* 2022 20:1, 20(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/S12951-022-01477-8>
3. Schroffenegger, M., & Reimhult, E. (2019). Thermoresponsive core-shell nanoparticles and their potential applications. *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology* (Vol. 1–5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10431-X>
4. Mahato, R. (2017). Multifunctional Micro- and Nanoparticles. *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42978-8.00002-4>
5. Mehravani, B., Ribeiro, A. I., & Zille, A. (2021). Gold Nanoparticles Synthesis and Antimicrobial Effect on Fibrous Materials. *Nanomaterials*, 11(5), 1067. <https://doi.org/10.3390/NANO11051067>
6. Bailly, A. L., Correard, F., Popov, A., Tselikov, G., Chaspoul, F., Appay, R., ... Esteve, M. A. (2019). In vivo evaluation of safety, biodistribution and pharmacokinetics of laser-synthesized gold nanoparticles. *Scientific Reports*, 9(1), 12890. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-48748-3>
7. Nguyen, T. T. A., Dutour, R., Conrard, L., Vermeersch, M., Mirgaux, M., Perez-Morga, D., ... Demeestere, I. (2025). Effect of Surface Modification of Gold Nanoparticles Loaded with Small Nucleic Acid Sequences on Cytotoxicity and Uptake: A Comparative Study In Vitro. *ACS Applied Bio Materials*, 8(4), 3040–3051. https://doi.org/10.1021/ACSABM.4C01861/ASSET/IMAGES/LARGE/MT4C01861_0007.JPEG

8. Carnovale, C., Bryant, G., Shukla, R., & Bansal, V. (2019). Identifying Trends in Gold Nanoparticle Toxicity and Uptake: Size, Shape, Capping Ligand, and Biological Corona. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03227>
9. Abed, S. N., Deb, P. K., Surchi, H. S., Kokaz, S. F., Jamal, S. M., Bandopadhyay, S., & Tekade, R. K. (2018). Nanocarriers in different preclinical and clinical stages. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00017-0>
10. Vinothini, K., & Rajan, M. (2018). Mechanism for the Nano-Based Drug Delivery System. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00009-X>
11. Brzezińska, K., & Ziąja, M. (2012). Struktura I Funkcje Bariery Krew -Mózg the Structure and Role of Blood -Brain Barrier. *Postępy Biologii Komórki*, 39(1), 84–99. Retrieved from http://www.pbkom.eu/sites/default/files/artykulydo2012/STRUKTURA_I_FUNKCJE_BARIERY_KREW-MÓZG.pdf
12. Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>
13. Kim, T. K., Hong, J. M., Kim, J., Kim, K. H., Han, S. J., Kim, I. C., ... Yim, J. H. (2024). Therapeutic Potential of Ramalin Derivatives with Enhanced Stability in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Molecules*, 29(22). <https://doi.org/10.3390/molecules29225223>
14. Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C. C., & Bu, G. (2019). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nature Reviews Neurology*, 15(9), 501–518. <https://doi.org/10.1038/S41582-019-0228-7>
15. Taiber, S., & Avraham, K. B. (2019). Genetic therapies for hearing loss: Accomplishments and remaining challenges. *Neuroscience letters*, 713, 134527. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2019.134527>

16. Pérez-Carrión, M. D., Posadas, I., & Ceña, V. (2024). Nanoparticles and siRNA: A new era in therapeutics? *Pharmacological Research*, 201, 107102. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2024.107102>
17. Cortez-Jugo, C., Masoumi, S., Chan, P. P. Y., Friend, J., & Yeo, L. (2022). Nebulization of siRNA for inhalation therapy based on a microfluidic surface acoustic wave platform. *Ultrasonics Sonochemistry*, 88, 106088. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2022.106088>
18. Barrios-Gumiel, A., Sánchez-Nieves, J., Pedziwiatr-Werbicka, E., Abashkin, V., Shcharbina, N., Shcharbin, D., ... de la Mata, F. J. (2020). Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 573, 118867. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118867>
19. Sun, Y., Zhou, Y., Rehman, M., Wang, Y. F., & Guo, S. (2024). Protein Corona of Nanoparticles: Isolation and Analysis. *Chem and Bio Engineering*, 1(9), 757–772. <https://doi.org/10.1021/cbe.4c00105>
20. Lubin, K. E., & Knipp, G. T. (n.d.). Design of experiment based optimization of an in vitro direct contact triculture blood brain barrier model for permeability screening. <https://doi.org/10.15406/ppij.2021.09.00340>
21. Srinivasan, B., Shuler, L., & Hickman, J. J. (2015). TEER measurements in cells. *Journal of Laboratory Automation* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.TEER
22. Abd Talib, F. N. A., Marzuki, M., & Hoe, S. L. L. (2023). Analysis of NK-92 cytotoxicity in nasopharyngeal carcinoma cell lines and patient-derived xenografts using impedance-based growth method. *Heliyon*, 9(7), e17480. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17480>
23. Stone, N. L., England, T. J., & O'Sullivan, S. E. (2019). A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00230>
24. Pondman, K., Le Gac, S., & Kishore, U. (2023). Nanoparticle-induced immune response: Health risk versus treatment opportunity? *Immunobiology*, 228(2). <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152317>

25. Shi, D., Beasock, D., Fessler, A., Szebeni, J., Ljubimova, J. Y., Afonin, K. A., & Dobrovolskaia, M. A. (2022). To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114079>
26. Kozics, K., Sramkova, M., Kopecka, K., Begerova, P., Manova, A., Krivosikova, Z., ... Gabelova, A. (2021). Pharmacokinetics, biodistribution, and biosafety of pegylated gold nanoparticles in vivo. *Nanomaterials*, 11(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nano11071702>
27. Cambier, S., Gouwy, M., & Proost, P. (2023). The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cellular and Molecular Immunology*, 20(3), 217–251. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-00974-6>
28. Pondman, K. M., Salvador-Morales, C., Paudyal, B., Sim, R. B., & Kishore, U. (2017). Interactions of the innate immune system with carbon nanotubes. *Nanoscale Horizons*, 2(4), 174–186. <https://doi.org/10.1039/c6nh00227g>
29. Garay, R. P., El-Gewely, R., Armstrong, J. K., Garratty, G., & Richette, P. (2012). Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(11), 1319–1323. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.720969>

Streszczenie w języku polskim

Nośniki leków to związki, których celem jest dostarczenie substancji bioaktywnych do docelowego miejsca działania. Mogą być wykorzystywane do przenoszenia leków oraz materiału genetycznego przez bariery biologiczne. W poszukiwaniu potencjalnych kandydatów na nośniki leków często bierze się pod uwagę różnego rodzaju nanocząstki, wśród których szczególne miejsce zajmują nanocząstki złota (AuNP). Nanocząstki złota charakteryzują się szerokim zakresem właściwości biofizycznych, dzięki którym znajdują zastosowanie w biomedycynie. Wyróżniają się wysoką biokompatybilnością, niską cytotoksycznością oraz łatwością modyfikacji powierzchni.

Jedną z obiecujących strategii funkcjonalizacji AuNP jest ich pegylacja (koniugacja z glikolem polietylenowym), postrzegana jako obiecująca strategia dla przenoszenia leków i kwasów nukleinowych, zwłaszcza w kontekście dostarczania leczniczych siRNA do tkanek i komórek chronionych przez barierę krew-mózg.

Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy opłaszczone PEG nanocząstki złota, AuNP14a i AuNP14b, różniące się stosunkiem dendronów karbokrzemowych do PEG, będą zdolne do tworzenia kompleksów z siRNA i wnikania do komórek modelu bariery krew-mózg. Badany siRNA by ukierunkowany na wyciszenie genu *apoE*, którego allel $\epsilon 4$ jest związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia u nosiciela choroby Alzheimera.

Uzyskane wyniki potwierdziły możliwość kompleksowania AuNP z siRNA (siApoE), przy czym w przypadku AuNP14a kompleksy z siRNA powstawały w niższych stężeniach niż w obecności AuNP14b. Wykazano również, że badane nanocząstki oddziałują z białkami osocza bez istotnych zaburzeń ich struktury drugorzędowej oraz wchodzi w interakcje z błonami lipidowymi. Zaobserwowano efektywnie wnikanie kompleksów AuNPs/siRNA do komórek śródbłonna oraz ich akumulację w komórkach, głównie w cytoplazmie. Odnotowano również niską cytotoksyczność badanych nanocząstek wobec komórek śródbłonna, astrocytów i perycytów, przy czym obecność siRNA dodatkowo obniżała cytotoksyczność nanocząstek. Genotoksyczność AuNP i ich kompleksów z siRNA była stosunkowo niska, a obserwowane zmiany poziomu reaktywnych form tlenu i potencjału błony mitochondrialnej ulegały normalizacji w ciągu 24 godzin.

Zebrane dane wskazują, że pegylowane nanocząstki złota AuNP14a i AuNP14b spełniają kluczowe kryteria kandydatów na nośniki terapeutycznego siRNA, a spośród dwóch badanych formułacji bardziej obiecująca wydaje się AuNP14a niż AuNP14b.

Streszczenie w języku angielskim

Drug carriers are substances designed to improve bioactive substances delivery to specific target sites within the body. They can be used to transport both drugs and genetic material across biological barriers. In the search for potential drug carriers, various types of nanoparticles are often considered, among which gold nanoparticles (AuNPs) have attracted significant attention. Gold nanoparticles possess a wide range of biophysical properties that make them suitable for biomedical applications. They exhibit high biocompatibility, low cytotoxicity, and can be readily surface-modified. PEGylation of gold nanoparticles (i.e., their conjugation with polyethylene glycol) is regarded as a promising strategy for the delivery of drugs and nucleic acids, particularly for transporting therapeutic siRNA to tissues and cells protected by the blood-brain barrier.

The aim of this study was to investigate whether PEG-coated gold nanoparticles, AuNP14a and AuNP14b, differing in the ratio of carbosilane dendrons to PEG chains, are capable of forming complexes with siRNA and of being internalized by cells in a blood-brain barrier (BBB) model. The selected siRNA targets the *apoE* gene, specifically the $\epsilon 4$ risk allele, which is associated with the development of Alzheimer's disease. Obtained results confirmed the feasibility of conjugating AuNPs with siRNA (siApoE). It has been shown that AuNP14a formed stable complexes with siRNA at lower concentrations than AuNP14b. The nanoparticles interacted with plasma proteins without significantly disrupting their secondary structure and interacted with lipid membranes. Efficient cellular uptake of the AuNP/siRNA complexes was observed in endothelial cells, along with their intracellular accumulation, primarily in the cytoplasm. The tested nanoparticles exhibited low cytotoxicity toward endothelial cells, astrocytes, and pericytes, and the presence of siRNA further reduced their cytotoxic potential. The genotoxicity of both AuNPs and their siRNA complexes was relatively low. Additionally, observed changes in reactive oxygen species level and mitochondrial membrane potential normalized within 24 hours.

The obtained data indicate that PEGylated gold nanoparticles AuNP14a and AuNP14b meet key criteria for therapeutic siRNA carriers. Among the two considered formulations, AuNP14a appears to be more promising than AuNP14b.



Article

Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity

Elżbieta Okła¹, Piotr Białecki¹ , Marta Kędzierska¹ , Elżbieta Pędziwiatr-Werbicka¹, Katarzyna Miłowska¹ , Samuel Takvor^{2,3,4}, Rafael Gómez^{2,3,4} , Francisco Javier de la Mata^{2,3,4} , Maria Bryszewska¹ and Maksim Ionov^{1,*}

- ¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 141/143 Pomorska St., 90-236 Lodz, Poland
- ² Department of Organic and Inorganic Chemistry, Research Chemistry Institute “Andrés M. del Río” (IQAR), University of Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Spain
- ³ Networking Research Center for Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), 28029 Madrid, Spain
- ⁴ Institute “Ramón y Cajal” for Health Research (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain
- * Correspondence: maksim.ionov@biol.uni.lodz.pl

Abstract: Drug delivery systems such as dendrimers, liposomes, polymers or gold/silver nanoparticles could be used to advance modern medicine. One significant pharmacological problem is crossing biological barriers by commonly used drugs, e.g., in the treatment of neurodegenerative diseases, which have a problem of the blood-brain barrier (BBB) restricting drug delivery. Numerous studies have been conducted to find appropriate drug carriers that are safe, biocompatible and efficient. In this work, we evaluate pegylated gold nanoparticles AuNP14a and AuNP14b after their conjugation with therapeutic siRNA directed against APOE4. This genetic risk factor remains the strongest predictor for late-onset Alzheimer’s disease. The study aimed to assess the biophysical properties of AuNPs/siAPOE complexes and to check their biological safety on healthy cells using human brain endothelial cells (HBEC-5i). Techniques such as fluorescence polarization, circular dichroism, dynamic light scattering, ζ -potential measurements and gel retardation assay showed that AuNPs form stable complexes with siRNA. Subsequently, cytotoxicity assays proved the biological safety of formed conjugates. Obtained results enabled us to find effective concentrations of AuNPs when complexes are formed and non-toxic for healthy cells. One of the studied nanoparticles, AuNP14b complexed with siRNA, displayed lower cytotoxicity (MTT assay, cells viability $-74.8 \pm 3.1\%$) than free nanoparticles ($44.7 \pm 3.6\%$). This may be promising for further investigations in nucleic acid delivery and could have practical use in treating neurodegenerative diseases.

Keywords: gold nanoparticles; siRNA; complex formation; biophysical interaction; cytotoxicity



Citation: Okła, E.; Białecki, P.; Kędzierska, M.; Pędziwiatr-Werbicka, E.; Miłowska, K.; Takvor, S.; Gómez, R.; de la Mata, F.J.; Bryszewska, M.; Ionov, M. Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6638. <https://doi.org/10.3390/ijms24076638>

Academic Editor: Jie Chen

Received: 7 March 2023

Revised: 26 March 2023

Accepted: 1 April 2023

Published: 2 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nanotechnology is a branch of science that finds many applications in many fields of study, such as biomedicine, engineering, chemistry, and physics. For example, nanoparticles can be used as antibacterial agents, biosensors, pollution removals, and immunostimulators in vaccines and drug delivery systems [1,2]. Furthermore, modern biomedical nanosystems can deliver drugs by passive or self-delivery. The first relies on the hydrophobic effect and drug encapsulation into nanoparticle cavities, and the second consists of the direct conjugation of the targeted molecule [3,4]. Also, the targeting of delivered structures can be divided into active and passive. Active targeting has a more elaborate mechanism of action, where administrated complex binds to specific receptors in the site of action. On the other hand, complex affinity to the binding site or its biophysical properties is used in passive targeting, where nanostructure with drug adrift in the bloodstream [3].

Gold Nanoparticles (AuNPs) are promising carriers for different biomolecules such as drugs, therapeutic proteins, DNA or RNA. AuNPs' size-to-volume ratio, positive charge and ability to protect the payload molecule from degradation or undesired immunological reaction could play a key role in biomedicine [5]. They can also be metabolized in lysosomes, where they dissolve ROS activity [6]. Modifications such as the formation of silica shells, protein attachments and pegylation have been studied to make these nanoparticles stable, safe and efficient [7]. AuNPs covered with PEG (polyethylene glycol) are more durable because PEG prevents them from aggregation.

Moreover, the presence of PEG increases solubility in water and cellular uptake and avoids adverse immunological responses. However, the outer layer of PEG can impact the AuNP positive charge leading to the obstruction of complexation [8,9]. Therefore, it is essential to establish the best protocol and crucial PEG concentration [10–12]. Furthermore, adding PEG into the gold nanoparticle structure can facilitate the passage of nanoparticles through different biological barriers such as mucus (e.g., in the airways or vagina) or the extracellular matrix in the brain tissue after crossing the blood-brain barrier [13–15]. PEG-nanoparticles' ability to impact the brain tissue makes them worthy of study in brain delivery systems.

This study focused on pegylated gold nanoparticles as the potential carriers for therapeutic small interfering RNA (siRNA) directed towards the apolipoprotein E gene (ApoE). One of the alleles of this gene, ApoE4, is related to the onset of Alzheimer's disease. This mechanism is connected to an excessive β -amyloid deposition with simultaneous poor clearance of these peptides [16]. However, siRNA alone is very unstable, has unsatisfactory pharmacokinetic properties and can have non-intentional effects [17]. To make it more stable, siRNA was submitted to some chemical modifications where the siRNA complexation with cationic nanoparticles, such as AuNPs, presents a wide range of benefits. The siRNA sealed by the nanoparticle was more likely to arrive at its target and not be destroyed by the external environment or detected by the immunological system. Moreover, the outer positive charge facilitated the cellular uptake of the complex [18]. AuNPs can also support the siRNA escape from endosomes [19,20].

To assess AuNP/siRNA-*APOE4* complexation, we chose 2 gold nanoparticles, AuNP14a and AuNP14b, characterized in previous publications [21–23]. Both of these compounds are cationic dendronized gold nanoparticles coated with PEG. However, they differ in the dendron/PEG ratio, which for AuNP14a is higher (3:1) than for AuNP14b (1:1). Because a different amount of PEG on the particle surface may change its characteristics and mode of action, [24] it was decided to check which nanoparticle would have better effects as a potential carrier. The aim of this study is the examination of the biophysical characterization of the AuNP/siRNA complexes and whether they are safe and efficient to further investigation for the application in the treatment of neurodegenerative diseases. The preliminary data displayed below focuses on determining the AuNP/siRNA complexation ratio, nanoparticle impact on siRNA structure, and cytotoxicity assessment of the tested complexes. Low cytotoxicity and affinity to nucleic acid suggest that tested nanoparticles can be investigated as potential carriers of therapeutic siRNA. This research is the first that presents these specific AuNPs conjugated with siApoE4, playing an essential role in the onset of neurodegenerative diseases, proving that these kinds of complexes could be safe for healthy cells.

2. Results and Discussion

2.1. Zeta Potential and Hydrodynamic Diameter

The zeta potential of AuNP/siRNA complexes was measured in a constant siRNA concentration (1 $\mu\text{mol/L}$) with different nanoparticle concentrations ranging from 20 to 80 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 1A). This study assessed the AuNP concentration needed for the complex saturation. ζ -potential curves crossed "0" toward positive values when the nanoparticle concentrations reached 30 $\mu\text{g/mL}$ (AuNP14a) and 55 $\mu\text{g/mL}$ (AuNP14b). This difference can be explained by the higher positive charge of nanoparticle AuNP14a. The positive

charge of a compound facilitates cell uptake but also increases nanoparticle cytotoxicity [25]. Therefore, finding the optimal concentration for efficient complexation with siRNA and safe application is essential.

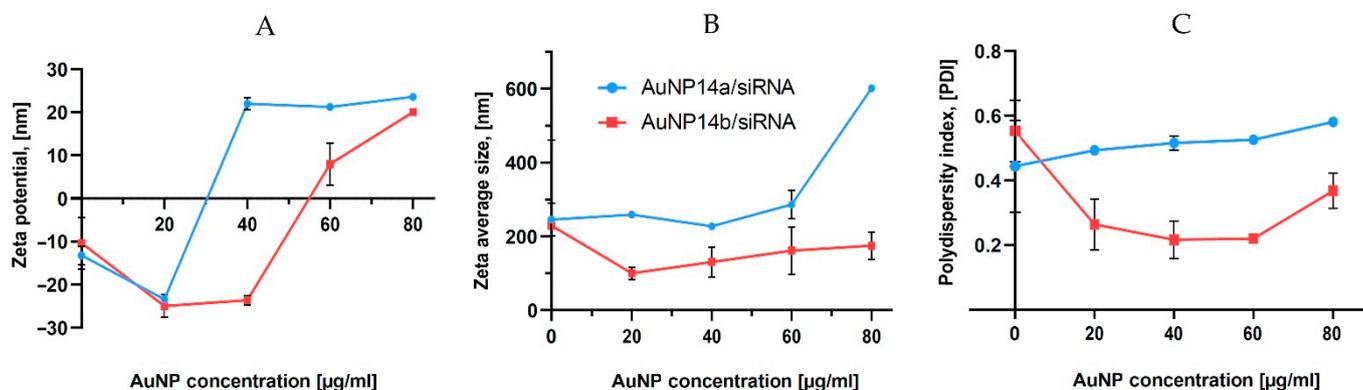


Figure 1. Zeta potential (A), hydrodynamic diameter (B) and polydispersity index (C) of siRNA alone and in the presence of increasing amounts of studied gold nanoparticles. Measurements were performed by the titration method. siRN concentration, 1 µM. The results represent mean values with standard deviation ($n = 3$).

Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed to assess the AuNPs/siRNA hydrodynamic diameter in relation to increasing nanoparticle concentration. In the case of AuNP14a, the hydrodynamic diameter was around 250 nm, while for AuNP14b it was 150 nm (Figure 1B). DLS data for free siRNA shows relatively large sizes, in line with other reports [25–27], and can be explained by the formation of higher-sized aggregates by noncomplexed siRNA [28]. Accordingly, the PDI of measured complexes increased with higher amounts of AuNPs (Figure 1C), showing that bigger complexes become less monodispersed and have a higher tendency for aggregation [29].

2.2. Fluorescence Polarization

The fluorescence polarization technique was used to confirm the ability of the tested gold nanoparticles to complex with siRNA. When a complex is formed, the fluorescently labelled siRNA movement in solvent slows, fluorescence intensity drops, and polarization increases [30]. Polarization results indicate that the complexation ratios are compatible with those established by zeta potential measurements. The measurement benchmark was a polarization obtained for 1 µmol/L of siRNA-FL in phosphate buffer, presented as 100%. The plateau phase was reached at 23–25 µg/mL concentration for AuNP14b (Figure 2A) and 54–60 µg/mL for AuNP14a (Figure 2B). Results confirm the hypothesis that a greater amount of AuNP14b than AuNP14a is needed to form a complex. Comparing the results for both nanoparticles, it could be seen that AuNP14a, used in smaller concentrations, induced higher polarization values than AuNP14b. The molecular weight of ligands is one of the factors that can influence the degree of siRNA fluorescence polarization change [31]. AuNP14a, bigger with a higher dendron/PEG ratio, presented higher fluorescence polarization values in the plateau phase than the smaller AuNP14b.

2.3. Agarose Gel Electrophoresis

Gel electrophoresis is another simple but precise method, which helps to determine the character of interaction between siRNA and AuNPs and establish the appropriate concentrations of ligand needed to form a fully saturated complex with siRNA. Fluorescence decay can indicate that nonlabelled nanoparticles bind to siRNA molecules and slow down the movement of the negatively charged siRNA through the gel. When concentrations of the nanoparticle are high enough to saturate the complex, siRNA cannot migrate towards the anode due to the loss of negative charge by the complexes and the increased size [32]. In the case of AuNP14a, it was observed that the fluorescence band disappeared between

the concentrations of 20 and 30 $\mu\text{g/mL}$, with this result matching other applied methods (Figure 3A). The electropherogram of AuNP14b (Figure 3B) shows that the nanoparticle could not saturate the complex in the same concentrations and quenched the fluorescence signal in concentrations above 60 $\mu\text{g/mL}$. This effect might have been caused by the smaller size and lower molecular weight of AuNP14b, similar to the impact of other nanoparticles reported in [26,33]. As the concentration of AuNP14b increases, the siRNA band starts to decline.

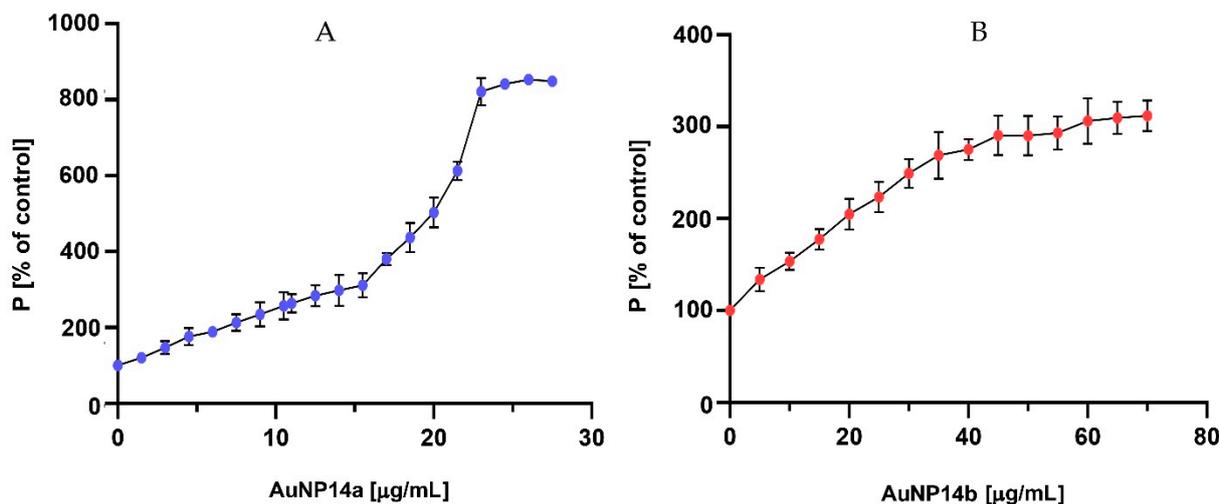


Figure 2. Changes in siRNA-FL fluorescence polarization after titration with (A) AuNP14a and (B) AuNP14b. Results of samples containing AuNPs presented as [%] of siRNA values without nanoparticles. siRNA concentration 1 $\mu\text{mol/L}$ in sodium phosphate buffer 10 mmol/L , pH 7.4. $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$. Results are mean \pm standard deviation (SD), $n = 3$.

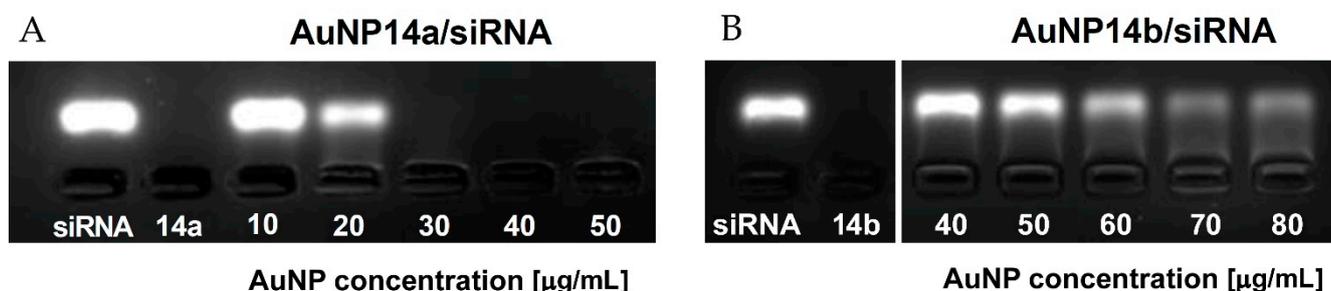


Figure 3. 3% Agarose gel electropherograms of ApoE4 siRNA complexed with gold nanoparticles, (A) AuNP14a and (B) AuNP14b. Samples containing 1 $\mu\text{mol/L}$ siRNA per line and nanoparticles applied in the corresponding concentrations were prepared in sodium phosphate buffer 10 mmol/L in the presence of GelRed stain. Gels were visualized upon transillumination at 525 nm.

Gel retardation assay was also applied to analyze the time stability of studied complexes. AuNP14a/siRNA complexes were prepared 48 h, 24 h and 1 h before electrophoresis in the conditions described above. Results show that studied nanoconjugates are stable in time (Figure S1).

2.4. Circular Dichroism

Measurements of circular dichroism (CD) were performed to investigate the changes in the secondary structure of siRNA. The complexation of siRNA with the nanoparticle changes with the siRNA secondary structure. A CD technique enables an investigation of the binding of tested molecules to siRNA without using any probes [34,35]. The titration of nanoparticles led to decreases in siRNA ellipticity yield. This effect showed the complexation between AuNP and siRNA molecules [36]. In the case of tested gold nanoparticles,

we observed that the ellipticity decreases specifically for siRNA peaks at $\lambda = 265$ nm and increases at $\lambda = 210$ nm (Figure 4A,B). The spectra shift to the right visible on graphs may represent slight structural changes in the siRNA secondary structure. Obtained results showed that AuNP14a generated a more visible shift and possibly caused bigger structural changes in nucleic acid than AuNP14b. In addition, AuNP14b in higher concentrations seemed to form more stable complexes with the siRNA than AuNP14a, maintaining a constant level of ellipticity and spectra shifting. The CD results, expressed as molar ellipticity θ ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$), confirmed that both gold nanoparticles interacted with siRNA due to the changes in the ellipticity. However, the interaction had a small impact on the secondary structure of nucleic acid and did not modify its biological activity, as confirmed by the data presented in Figure 4C. representing the changes in mean ellipticity at $\lambda = 265$ nm.

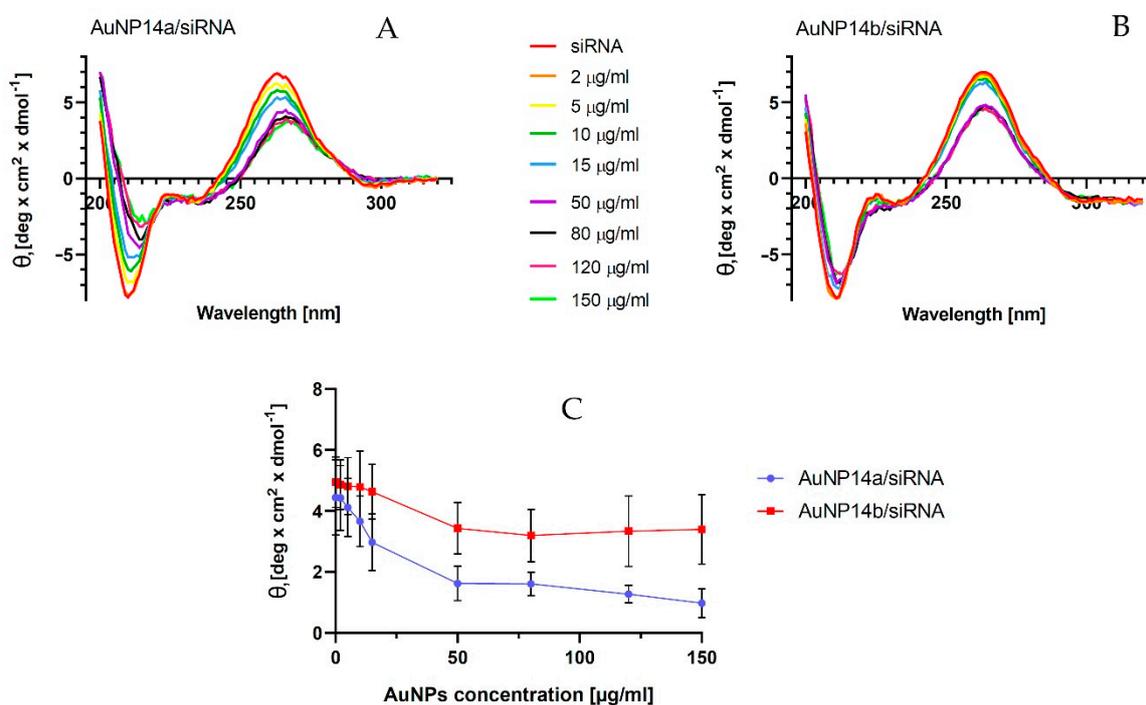


Figure 4. Effect of gold nanoparticles on siRNA's secondary structure (θ —ellipticity). (A) Spectra CD of siRNA at the presence of AuNP14a, and (B) AuNP14b. (C) Changes in mean ellipticity at $\lambda = 265$ nm. Measurements were conducted in $\lambda = 200$ – 320 nm in phosphate buffer, pH = 7.4. The concentration of siRNA 1 $\mu\text{mol/L}$. The values are the mean \pm standard error of the mean (SEM), $n = 3$.

2.5. Cytotoxicity

Nanoparticles used as drug carriers and especially for gene delivery through the Blood Brain Barrier (BBB) must be non-toxic to human cells. Since AuNPs and their complexes with siRNA could be involved in treating brain diseases, human brain endothelial cells (HBEC-5i) were chosen to determine their toxicity. The HBEC-5i cell line was selected for this experiment because these cells can express the ApoE gene [37]. It was important to find the nontoxic or low toxic AuNP concentration for cells of the BBB and crucial in the case of tested AuNPs when considering their further testing in terms of potential delivery of siRNA to the brain. In addition, the viability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the presence of AuNP/siRNA complexes was assessed. PBMC cells can be used when the cytotoxicity of ligands is analyzed. In this study, MTT and LDH assays were performed for HBEC-5i cells (Figure 5). PBMC cell viability was tested with the Alamar Blue test (Figure 6) as with the previously described method [17]. This technique represents the ability of PBMC cells to metabolize resazurin after incubating with the tested compounds.

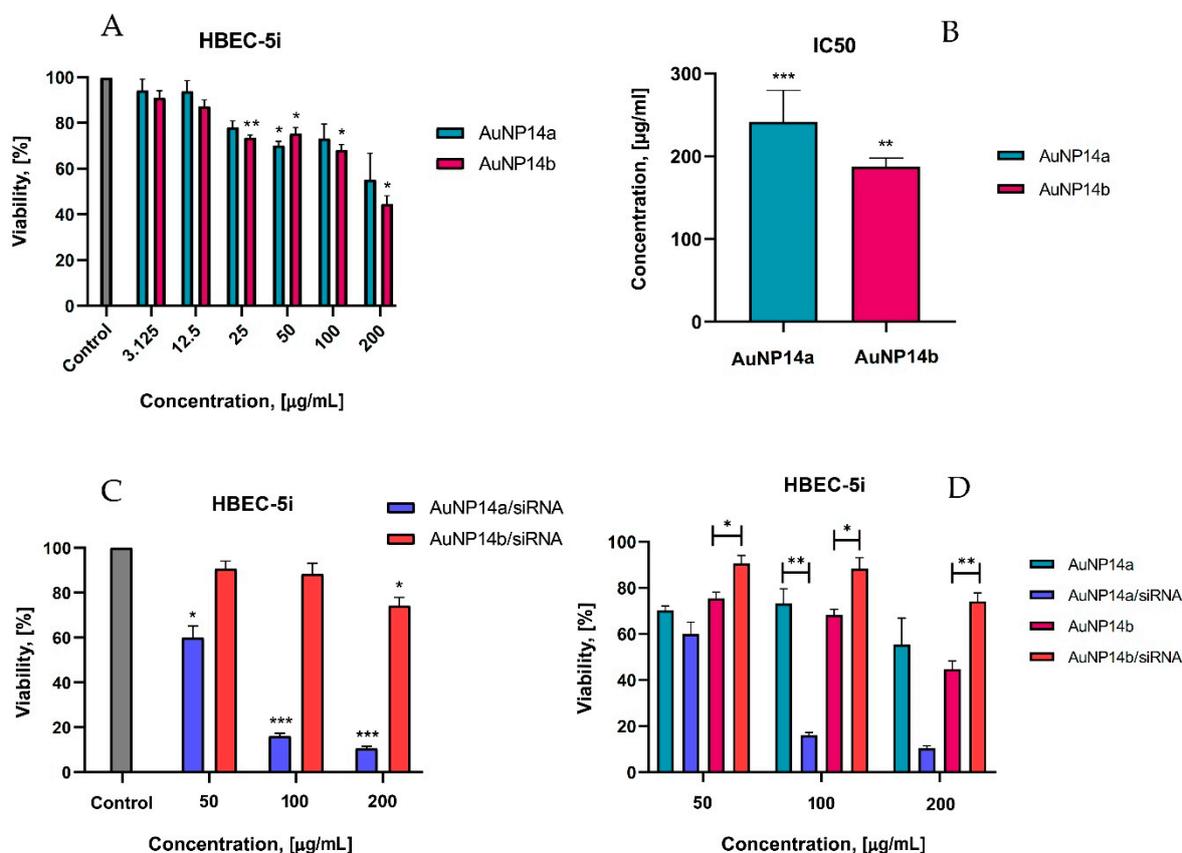


Figure 5. Cytotoxicity effect of AuNPs alone and their complexes with siRNA toward HBEC-5i cells, MTT assay. **(A)** The viability of HBEC-5i cells in the presence of AuNPs at the concentrations varied from 1.56 to 200 µg/mL. Statistical significance showed when compared with the control, non-treated cells. **(B)** Calculated from the results shown on panel A, IC₅₀ values of noncomplexed nanoparticles vs. control (100% viability). **(C)** The viability of HBEC-5i cells in the presence of AuNPs/siRNA complexes. Significant differences compared to the negative control. **(D)** Comparison of the cytotoxic effects of naked AuNPs and their complexes with siRNA. Statistical significance was marked for the same concentrations between AuNPs alone and in the complex with siRNA. To form the AuNP/siRNA complex, the concentration of siRNA was always 1 µmol/L, whereas the concentration of nanoparticles was varied—incubation time for all samples 24 h. Data points represent means ± SD obtained from min. 3 separate experiments. Statistical significance was assessed using a two-way ANOVA test ($n = 3$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$).

2.5.1. Viability of HBEC-5i Cells by MTT Test

Our studies revealed that nanoparticles had no toxic effect on human brain endothelial cells at concentrations less than 12.5 µg/mL. According to studies, the cytotoxic effect is considered a $\geq 30\%$ reduction of cells [38]. Only higher concentrations of nanoparticles (≥ 200 µg/mL) exhibited a strong cytotoxic effect (Figure 5A) showing a viability level of $55.4 \pm 11.5\%$ for AuNP14a and $44.7 \pm 3.6\%$ for AuNP14b. Compared with non-treated cells (negative controls), statistically significant effects were observed for AuNP14a in concentrations of 50 µg/mL and with a viability value of $70.3 \pm 1.8\%$. For AuNP14b, all concentrations above 25 µg/mL (viability $73.6 \pm 1.3\%$) were statistically significant and presented a cytotoxic effect at the highest concentration ($44.7 \pm 3.6\%$). For both nanoparticles, IC₅₀ was defined (Figure 5B). The IC₅₀ value for AuNP14a was higher than for AuNP14b, 241.5 ± 38 µg/mL and 187.3 ± 10.5 µg/mL, respectively. These proportions drastically changed, especially in the case of AuNP14a, when nanoparticles were complexed with siRNA (Figure 5C).

In the highest tested concentration of AuNP14a/siRNA, the complex was strongly destructive for cells, while AuNP14b conjugated with siRNA showed only mild cytotoxicity ($10.4 \pm 1\%$ and $74.8 \pm 3.1\%$ respectively). The statistical analysis showed that complexation with siRNA decreases the toxicity of AuNP14b towards HBEC-5i but not for AuNP14a (Figure 5D).

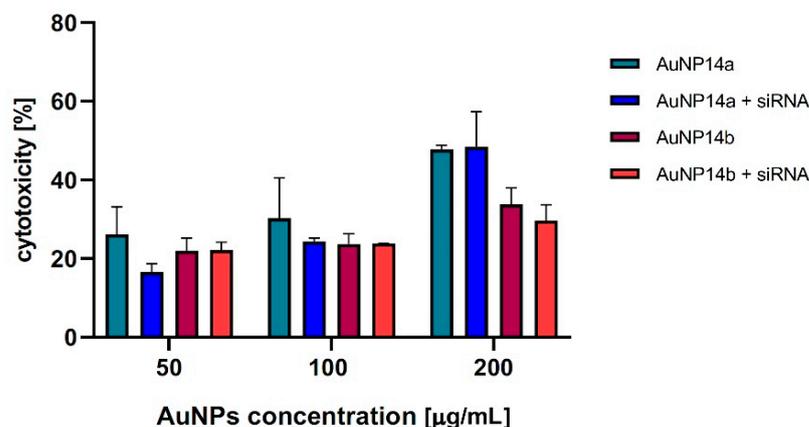


Figure 6. Cytotoxicity effect of AuNPs alone and complexes with siRNA toward HBEC-5i cells, LDH assay. The nanoparticles concentrations varied from 50 to 200 µg/mL. All results were compared to positive control with Triton X-100: incubation time, 24 h. Data points represent means \pm SD obtained from min. 3 separate experiments.

2.5.2. Viability of HBEC-5i Cells by LDH Assay

To confirm the results obtained by MTT assay, the additional viability tests were performed by LDH assay. The data presented in Figure 6 indicate that the presence of gold nanoparticles or AuNPs/siRNA complexes reduces the HBEC-5i viability. In addition, the results obtained in both tests showed a higher cytotoxicity of AuNP14a than AuNP14b, for which statistically significant changes in the case of the LDH test were determined for concentration 200 µg/mL. However, AuNP14b did not show any significant changes in cytotoxicity after complexation with siRNA.

2.5.3. Viability of PBMCs Cells by Alamar Blue Assay

The viability of PBMC cells tested using Alamar Blue assay after their incubation with AuNP/siRNA complexes showed lower cytotoxicity in comparison to previously described results. It was noticed that PBMC after treatment with 50 µg/mL of AuNP14a/siRNA showed a viability of $75.4 \pm 5\%$ and for AuNP14b/siRNA of $85.7 \pm 5.7\%$ (Figure 7).

Because AuNPs can interact with peripheral blood *mononuclear* cells (the major cells in the human body's immunity) and change their response to the ligand action, it is crucial to maintain the high level of these cells after AuNPs administration [21,39].

Results obtained in this study confirm our hypothesis that studied gold nanoparticles could be considered in further investigations as a possible delivery platform for siRNA. Furthermore, the complexation and cytotoxicity tests indicate the optimum AuNP concentration that can be applied to form the AuNP/siRNA complexes is 50 µg/mL. These findings agree with previously published results that characterized gold nanoparticles as possible nanocarriers for nucleic acids [40–42].

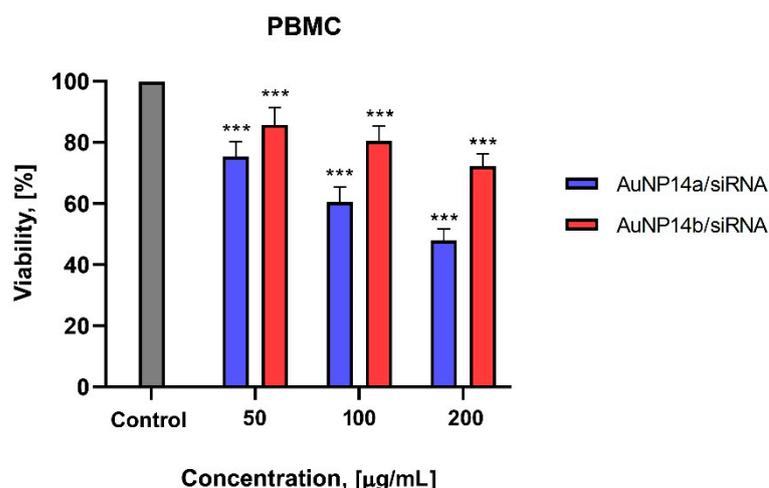


Figure 7. Viability of PBMC cells after incubating with AuNPs/siRNA complexes, Alamar Blue assay. Statistical effects showed in comparison to control cells. The concentration of siRNA is 1 µmol/L, incubation time 24 h. Data points represent means ± SD obtained from min. 3 separate experiments. Statistical significance was assessed using a two-way ANOVA test ($n = 3$, $*** p < 0.0001$).

3. Materials and Methods

3.1. Pegylated Gold Nanoparticles of the Second Generation

The biochemical characteristics and synthesis steps of gold nanoparticles containing polyethylene-glycol (PEG) and named AuNP14a and AuNP14b are described previously [21–23]. The AuNPs structure and characterization are present in Figure 8 and Table 1. The weight concentration (µg/mL) of AuNPs was used to study their biological effects, complexation characteristics and cytotoxic effects.

- AuNP14a, dendron/PEG molar ratio = 3:1
- AuNP14b, dendron/PEG molar ratio = 1:1

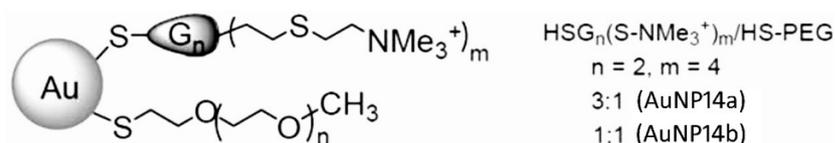


Figure 8. Structure of tested dendronized AuNPs modified with PEG. AuNPs were synthesized in water by the reaction of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ with a mixture of two ligands containing a thiol moiety: (1) the cationic dendrons $\text{HSG}_2(\text{SNMe}_3^+)_4$ and (2) commercial PEG ligand $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, HS-PEG. In addition, NaBH_4 was used as a reducing agent [21].

Table 1. Characterization of gold nanoparticles considered in this work [21].

Nanoparticle	Solubility	Dendron/PEG Molar Ratio	¹ ZP, (mV)	² d, (nm)
AuNP14a	water	3/1	44.9	34.00
AuNP14b	water	1/1	41.1	23.3

¹ Zeta potential; ² zeta average size (DLS).

3.2. siRNA

Gold nanoparticles were complexed with non-fluorescent or FITC-labelled siRNA coding ApoE4 (Sense: 5′G.A.U.U.A.C.C.U.G.C.G.C.U.G.G.G.U.G.C.U.U. Antisense: 5′-P.G.C.A.C.C.C.A.G.C.G.C.A.G.G.U.A.A.U.C.U.U.). siRNA was purchased from Dharmacon Inc., Lafayette, CO, USA. siRNA was dissolved in 1xsiRNA buffer (Dharmacon Inc., Lafayette, CO, USA).

3.3. Materials

HBEC-5i cell line was purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). DMEM-F12 and RPMI-1640 were acquired from Biowest, Nuaille, France. Other reagents used in cell cultures (ECGS, 1% Penicillin-Streptomycin, FBS, MTT, Resazurin, Triton X-100) were purchased from Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. DMSO used in the MTT assay was purchased from Avantor, Radnor, PA, USA. CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay kit was acquired from Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. Gelatin was obtained from Serva, Heidelberg, Germany. PBS used in experiments was prepared from tablets acquired from Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. While preparing gel electrophoresis, agarose from Maximus, Łódź, Poland and GelRed stain purchased from Biotium, Inc., Fremont, CA, USA, was used.

3.4. AuNp:siRNA Complex Formation

AuNps/siRNA complexes were formed using a previously reported protocol [43] with minor modifications. Appropriate volumes of siRNA and AuNPs dissolved in sodium phosphate buffer 10 mmol/L, pH 7.4 were mixed at the concentrations giving desired AuNP/siRNA molar ratios. The mixture was gently vortexed and incubated for 20 min at room temperature. Mixtures used for complex characterization or in vitro experiments were made in the same conditions (buffer, temperature, etc.). Complexes were prepared with autoclaved buffer and components. Solutions were kept in sterile conditions in the dark.

3.5. ζ -Potential and Hydrodynamic Diameter

Measurements of the potential and size of the particles were performed on a Malvern Zetasizer Nano ZS, Worcestershire (UK). Solutions of siRNA (1 μ M) in PBS were prepared and titrated with AuNPs, up to 80 μ g/mL. Zeta potential was estimated with Helmholtz–Smoluchowski's equation. Results were collected from 5 measurements, 7 runs each and provided information about the complexation ratio. Any changes in the zeta potential of complexes in time (relative value estimated to incubation time, 15 min) were measured during 240 min to estimate the time stability of formed complexes. The zeta potential of AuNP/siRNA complexes was measured to assess the stability of the obtained complexes over time. The measurement was carried out for complexes formed by siRNA (constant concentration 1 μ mol/L) and concentrations of nanoparticles, corresponding to the saturated complex $C_{\text{AuNP14a}} = 60 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{AuNP14b}} = 130 \mu\text{g/mL}$.

The size of gold nanoparticles was measured by the dynamic light scattering method. Backscatter was set for 173°, Abs = 720 nm, and refractive index (RI) was 0.28. The number of the performed measurements was 5, 3 runs each.

3.6. Fluorescence Polarization

As an alternate method to confirm the complexation ratio, 1 μ M of siRNA-FL in a phosphate buffer (10 mmol/L, pH = 7.4) was prepared and measured in a PerkinElmer LS-50B spectrofluorometer (excitation: $\lambda = 485 \text{ nm}$, emission: $\lambda = 516 \text{ nm}$). siRNA was then titrated with increasing concentrations of the tested AuNPs.

3.7. Gel Retardation Assay

To check the appropriate concentrations of the components for the AuNP/siRNA complex formation, 3% agarose gel electrophoresis was performed. Complexes were prepared in PBS and incubated for 15 min at room temperature. The concentration of siRNA was constant (1 μ mol/L). The negative control used a non-complexed nanoparticle in its highest applied concentration. Electrophoresis was run for 45 min (90 V, 35 mA) with GelRed stain (0.05 μ g/1 mL). Results were analyzed using ChemiDoc-It² Imager (UVP, Cambridge, UK).

3.8. Circular Dichroism (CD)

The circular dichroism technique was applied to analyze the changes in the siRNA secondary structure involved in the presence of tested gold nanoparticles. siRNA was titrated with the AuNPs in a concentration range 2–150 µg/mL. Changes in the ellipticity of the nucleic acid were checked using a Jasco J-815 CD spectrometer (Jasco International Co., Ltd., Tokyo, Japan). Baseline and probes were measured in phosphate buffer (10 mmol/L, pH = 7.4) at a wavelength set from 200 to 320 nm.

3.9. Cell Culture

In vitro experiments were conducted on human brain endothelial cells (HBEC-5i) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). HBEC-5i was purchased from ATCC and cultured in 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin and DMEM-12F media enriched with 40 µg/mL endothelial cell growth supplement (ECGS). Culture flasks were covered with 1% gelatin. PBMCs were isolated from the buffy coat fraction from healthy blood donors obtained from Central Blood Bank and cultured in RPMI-1640 medium with 10% FBS with the addition of 1% antibiotic. Both cell lines were incubated under standard conditions (37 °C, 5% CO₂).

3.10. Cytotoxicity

MTT test. The cytotoxicity of AuNPs and their complexes with siRNA towards the HBEC-5i cell line was tested using an MTT assay. Cells were seeded on 96-well plates in density 1×10^4 cells/well and incubated under standard conditions. AuNPs or AuNP/siRNA complexes at 1–400 µg/mL concentration range were added to the cells and incubated for 24 h. MTT solution at the concentration 0.5 mg/mL in PBS was added for 3 h, 100 µL DMSO was added to the samples to dissolve the formazan crystals. Sample absorbance was measured at the wavelengths $\lambda = 580$ nm and $\lambda = 720$ nm using a multiwell plate reader (BioTek PowerWave HT, BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA). The cell viability percentage was calculated by the formula:

$$\% \text{ viability} = (A_s / A_c) \times 100\% \quad (1)$$

where: A_s —absorbance of treated cells, A_c —absorbance of control cells.

Alamar blue assay. The cytotoxicity of AuNP complexes with siRNA was tested on PBMCs. Cells were seeded on 96-well black plates in density 1×10^4 cells/well and incubated under standard conditions. Next, AuNPs/siRNA in selected concentrations were added to the cells and incubated 24 h. After this time, resazurin solution in PBS was added to cells to obtain a final concentration of 0.125 mg/mL per well. After 2 h incubation, fluorescence was read at a multiwell plate reader with wavelengths set at $\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm. The cell viability percentage was calculated by the same formula as presented in the MTT assay.

LDH assay. The cytotoxicity of AuNPs and their complexes with siRNA towards the HBEC-5i cell line was additionally tested using an LDH assay. Cells were seeded on 96-well plates in a 1×10^4 cells/well density and incubated under standard conditions. AuNPs or AuNP/siRNA complexes at 50–200 µg/mL concentrations were added to the cells and incubated for 24 h. The colorimetric test quantified lactate dehydrogenase, an enzyme released from damaged cells where lactate dehydrogenase reduces NAD⁺ to NADH, and NADH reduces tetrazole salts to a colored product—formazan. Absorbance measurement at $\lambda = 490$ nm was used to assess the amount of formazan formed. Cells were incubated for 24 h. After the time had elapsed, 10 µL of the test substance was added per well, and 50 µL of the medium was transferred to a new 96-well plate. A reaction mixture with CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit Substrate Mixture was prepared by dissolving it in 11.4 mL of distilled water, followed by the addition of 600 µL Assay Buffer Stock Solution. 50 µL of the reaction mixture was added to each well, and the plate was left for 30 min in the dark. Sample absorbance was measured at the wavelengths $\lambda = 580$ nm and $\lambda = 720$ nm using

a multiwell plate reader (BioTek PowerWave HT, BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA). The cell viability percentage was calculated by the formula:

$$\% \text{ viability} = (A_s / A_c) \times 100\% \quad (2)$$

where: A_s —absorbance of treated cells, A_c —absorbance of control cells

3.11. Statistical Analysis

The results are presented as mean values \pm standard deviation (SD) of 3 independent experiments ($n = 3$). For CD results standard error of the mean (SEM) instead of SD was shown. The stability of complexes in time is presented as mean values \pm standard deviation (SD) of 6 independent experiments ($n = 6$). To analyze the data Two-way Anova and a Mixed-effects analysis were applied. Statistical significance was taken as p -values that were considered statistically significant as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

4. Conclusions

This work describes the biophysical properties and cytotoxicity profiles of 2 gold nanoparticles (AuNP14a and AuNP14b) conjugated with therapeutical siRNA directed toward the apolipoprotein E gene (ApoE). Both compounds were analysed and compared. The tested AuNPs were able to form complexes with anti-ApoE siRNA. Obtained results indicate that nanocomplexes formed by AuNP14b (1:1 dendron/PEG ratio) are more suitable as siRNA carriers when compared to the systems formed by AuNP14a (3:1 dendron/PEG ratio). The AuNP14b/siRNA system had an appropriate size, and PDI index desired for drug carriers and was less toxic towards human brain endothelial (HBEC-5i) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The complexation of positive AuNPs with anionic nucleic acid positively impacted the nanoparticle toxicity against studied normal cells. Therefore, the compound AuNP14b should be further examined for its effective internalization, drug protection, release kinetic and reduced toxicity.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24076638/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.B., E.P.-W., K.M. and M.I.; methodology, E.O., E.P.-W., K.M. and M.I.; software, E.O.; validation, M.I.; formal analysis, E.O., E.P.-W., K.M. and M.I.; investigation, E.O., P.B. and M.K.; resources, M.B., S.T., R.G. and F.J.d.l.M.; data curation, M.I.; writing—original draft preparation, E.O.; writing—review and editing, M.I., M.B., E.P.-W., R.G. and F.J.d.l.M.; visualization, E.O.; supervision, M.I.; project administration, M.B. and M.I.; funding acquisition, M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grant 2018/30/Z/NZ1/00911 of the Project “NanoTendo” financed by the National Science Centre, Poland, under the M-ERA.NET 2, which has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement no. 685451, co-financed by a grant of the National Science Centre of Poland under “Beethoven Life 1” program, project no: 2018/31/F/NZ5/03454 “NP-HALE”, and grant PID2020-112924RBI00 (MINECO).

Institutional Review Board Statement: All the experiments published in this manuscript comply with the current laws of the country in which they were performed and were approved by the Ethics Committee of the University of Lodz, Poland (NR19/KBBN-UŁ/III/2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Razavi, R.; Amiri, M.; Alshamsi, H.; Eslaminejad, T.; Salavati-Niasari, M. Green synthesis of Ag nanoparticles in oil-in-water nano-emulsion and evaluation of their antibacterial and cytotoxic properties as well as molecular docking. *Arab. J. Chem.* **2021**, *14*, 103323. [[CrossRef](#)]
2. Biswas, P.; Polash, S.A.; Dey, D.; Kaium, M.A.; Mahmud, A.R.; Yasmin, F.; Baral, S.K.; Islam, M.A.; Rahaman, T.I.; Abdullah, A.; et al. Advanced implications of nanotechnology in disease control and environmental perspectives. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *158*, 114172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Patra, J.K.; Das, G.; Fraceto, L.F.; Ramos Campos, E.V.; del Pilar Rodriguez-Torres, M.; Acosta-Torres, L.S.; Diaz-Torres, L.A.; Grillo, R.; Swamy, M.K.; Sharma, S.; et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lu, H.; Wang, J.; Wang, T.; Zhong, J.; Bao, Y.; Hao, H. Recent Progress on Nanostructures for Drug Delivery Applications. *J. Nanomater.* **2016**, *2016*, 5762431. [[CrossRef](#)]
5. Amina, S.J.; Guo, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 9823–9857. [[CrossRef](#)]
6. Balfourier, A.; Luciani, N.; Wang, G.; Lelong, G.; Ersen, O.; Khelifa, A.; Alloyeau, D.; Gazeau, F.; Carn, F. Unexpected intracellular biodegradation and recrystallization of gold nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 103–113. [[CrossRef](#)]
7. Kang, H.; Buchman, J.; Rodriguez, R.; Ring, H.; He, J.; Bantz, K.; Haynes, C. Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 664–699. [[CrossRef](#)]
8. Huang, J.; Xiao, K. Nanoparticles-Based Strategies to Improve the Delivery of Therapeutic Small Interfering RNA in Precision Oncology. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1586. [[CrossRef](#)]
9. Fang, Y.; Xue, J.; Gao, S.; Lu, A.; Yang, D.; Jiang, H.; He, Y.; Shi, K. Cleavable PEGylation: A strategy for overcoming the ‘PEG dilemma’ in efficient drug delivery. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 22–32. [[CrossRef](#)]
10. Suk, J.S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L.M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51. [[CrossRef](#)]
11. Jain, S.; Hirst, D.G.; O’Sullivan, J.M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* **2012**, *85*, 101–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Grodzicka, M.; Pena-Gonzalez, C.; Ortega, P.; Michlewska, S.; Lozano, R.; Bryszewska, M.; de la Mata, F.; Ionov, M. Heterofunctionalized polyphenolic dendrimers decorated with caffeic acid: Synthesis, characterization and antioxidant activity. *Sustain. Mater. Technol.* **2022**, *33*, e00497. [[CrossRef](#)]
13. Cone, R.A. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 75–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Suk, J.S.; Lai, S.K.; Wang, Y.-Y.; Ensign, L.M.; Zeitlin, P.L.; Boyle, M.P.; Hanes, J. The penetration of fresh undiluted sputum expectorated by cystic fibrosis patients by non-adhesive polymer nanoparticles. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2591–2597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nance, E.A.; Woodworth, G.F.; Sailor, K.A.; Shih, T.-Y.; Qu, X.; Swaminathan, G.; Xiang, D.; Eberhart, C.; Hanes, J. A Dense Poly(ethylene glycol) Coating Improves Penetration of Large Polymeric Nanoparticles within Brain Tissue. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 149ra119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yamazaki, Y.; Zhao, N.; Caulfield, T.R.; Liu, C.C.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Pathobiology and targeting strategies. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 501–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hu, B.; Zhong, L.; Weng, Y.; Peng, L.; Huang, Y.; Zhao, Y.; Liang, X.-J. Therapeutic siRNA: State of the art. *Signal Transduct. Target Ther.* **2020**, *5*, 101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ihnatsyeyu-Kachan, A.; Dzmitruk, V.; Apartsin, E.; Krasheninina, O.; Ionov, M.; Loznikova, S.; Venyaminova, A.; Miłowska, K.; Shcharbin, D.; Mignani, S.; et al. Multi-Target Inhibition of Cancer Cell Growth by siRNA Cocktails and 5-Fluorouracil Using Effective Piperidine-Terminated Phosphorus Dendrimers. *Colloids Interfaces* **2017**, *1*, 6. [[CrossRef](#)]
19. Sioud, M.; Furset, G.; Cekaite, L. Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *361*, 122–126. [[CrossRef](#)]
20. Shaabani, E.; Sharifiaghdam, M.; Lammens, J.; De Keersmaecker, H.; Vervaet, C.; De Beer, T.; Motevasali, E.; Ghahremani, M.H.; Mansouri, P.; De Smedt, S.; et al. Increasing angiogenesis factors in hypoxic diabetic wound conditions by siRNA delivery: Additive effect of LbL-gold nanocarriers and desloratadine-induced lysosomal escape. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9216. [[CrossRef](#)]
21. Barrios-Gumiel, A.; Sánchez-Nieves, J.; Pedziwiatr-Werbicka, E.; Abashkin, V.; Shcharbina, N.; Shcharbin, D.; Glińska, S.; Ciepluch, K.; Kuc-Ciepluch, D.; Lach, D.; et al. Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2020**, *573*, 118867. [[CrossRef](#)]
22. Pedziwiatr-Werbicka, E.; Gorzkiewicz, M.; Horodecka, K.; Lach, D.; Barrios-Gumiel, A.; Sánchez-Nieves, J.; Gómez, R.; De La Mata, F.; Bryszewska, M. PEGylation of Dendronized Gold Nanoparticles Affects Their Interaction with Thrombin and siRNA. *J. Phys. Chem. B* **2021**, *125*, 1196–1206. [[CrossRef](#)]
23. Pedziwiatr-Werbicka, E.; Gorzkiewicz, M.; Michlewska, S.; Ionov, M.; Shcharbin, D.; Klajnert-Maculewicz, B.; Pena-Gonzales, C.E.; Sanchez-Nieves, J.; Gomez, R.; Bryszewska, M. Evaluation of dendronized gold nanoparticles as siRNAs carriers into cancer cells. *J. Molec. Liquids* **2021**, *324*, 114726. [[CrossRef](#)]

24. Miteva, M.; Kirkbride, K.C.; Kilchrist, K.V.; Werfel, T.A.; Li, H.; Nelson, C.E.; Gupta, M.K.; Giorgio, T.D.; Duvall, C.L. Tuning PEGylation of mixed micelles to overcome intracellular and systemic siRNA delivery barriers. *Biomaterials* **2015**, *38*, 97–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 5577–5591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Michlewska, S.; Ionov, M.; Maroto-Díaz, M.; Szwed, A.; Ilnatsyey-Kachan, A.; Loznikova, S.; Shcharbin, D.; Maly, M.; Ramirez, R.; De La Mata, F.; et al. Ruthenium dendrimers as carriers for anticancer siRNA. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *181*, 18–27. [[CrossRef](#)]
27. Del Olmo, N.; Holota, M.; Michlewska, S.; Gómez, R.; Ortega, P.; Ionov, M.; De La Mata, F.; Bryszewska, M. Copper (II) Metallodendrimers Combined with Pro-Apoptotic siRNAs as a Promising Strategy Against Breast Cancer Cells. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Troiber, C.; Kasper, J.; Milani, S.; Scheible, M.; Martin, I.; Schaubhut, F.; Kuchler, S.; Rädler, J.; Simmel, F.; Friess, W.; et al. Comparison of four different particle sizing methods for siRNA polyplex characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *84*, 255–264. [[CrossRef](#)]
29. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Davarani, F.H.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. [[CrossRef](#)]
30. Gorzkiewicz, M.; Kopeć, O.; Janaszewska, A.; Konopka, M.; Pędziwiatr-Werbicka, E.; Tarasenko, I.; Bezrodnyi, V.; Neelov, I.; Klajnert-Maculewicz, B. Poly(Lysine) dendrimers form complexes with sirna and provide its efficient uptake by myeloid cells: Model studies for therapeutic nucleic acid delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3138. [[CrossRef](#)]
31. Hendrickson, O.; Taranova, N.; Zherdev, A.; Dzantiev, B.; Eremin, S. Fluorescence Polarization-Based Bioassays: New Horizons. *Sensors* **2020**, *20*, 7132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Andrzejewska, W.; Wilkowska, M.; Skrzypczak, A.; Kozak, M. Ammonium Gemini Surfactants Form Complexes with Model Oligomers of siRNA and dsDNA. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Techaarpornkul, S.; Wongkupasert, S.; Opanasopit, P.; Apirakaramwong, A.; Nunthanid, J.; Ruktanonchai, U. Chitosan-Mediated siRNA Delivery In Vitro: Effect of Polymer Molecular Weight, Concentration and Salt Forms. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 64–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Siligardi, G.; Hussain, R. Applications of Circular Dichroism. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 2nd ed.; Lindon, J.C., Ed.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2010; pp. 9–14. ISBN 978-0-12-374413-5.
35. Büyükköroğlu, G.; Dora, D.D.; Özdemir, F.; Hizel, C. Techniques for protein analysis. In *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life*; Barh, D., Azevedo, V., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 1, pp. 317–351. ISBN 978-0-12-804659-3. [[CrossRef](#)]
36. Law, M.; Jafari, M.; Chen, P. Physicochemical Characterization of SiRNA-peptide Complexes. *Biotechnol. Progress* **2008**, *24*, 957–963. [[CrossRef](#)]
37. Alagarsamy, J.; Jaeschke, A.; Hui, D.Y. Apolipoprotein E in Cardiometabolic and Neurological Health and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9892. [[CrossRef](#)]
38. Fellows, M.D.; O'Donovan, M.R. Cytotoxicity in cultured mammalian cells is a function of the method used to estimate it. *Mutagenesis* **2007**, *22*, 275–280. [[CrossRef](#)]
39. Swartzwelter, B.; Michelini, S.; Frauenlob, T.; Barbero, F.; Verde, A.; De Luca, A.; Pantes, V.; Duschl, A.; Horejs-Hoeck, J.; Italiani, P.; et al. Innate Memory Reprogramming by Gold Nanoparticles Depends on the Microbial Agents That Induce Memory. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 4582. [[CrossRef](#)]
40. Shaabani, E.; Sharifiaghdam, M.; De Keersmaecker, H.; De Rycke, R.; De Smedt, S.; Faridi-Majidi, R.; Braeckmans, K.; Fraire, J. Layer by Layer Assembled Chitosan-Coated Gold Nanoparticles for Enhanced siRNA Delivery and Silencing. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 831. [[CrossRef](#)]
41. Xue, C.; Hu, S.; Gao, Z.; Wang, L.; Luo, M.; Yu, X.; Li, B.; Shen, Z.; Wu, Z. Programmably tiling rigidified DNA brick on gold nanoparticle as multi-functional shell for cancer-targeted delivery of siRNAs. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2928. [[CrossRef](#)]
42. Yang, Y.; Han, Y.; Sun, Q.; Cheng, J.; Yue, C.; Liu, Y.; Song, J.; Jin, W.; Ding, X.; de la Fuente, J.; et al. Au-siRNA aptamer nanocages as a high-efficiency drug and gene delivery system for targeted lung cancer therapy. *J. Nanobiotechnol.* **2021**, *19*, 54. [[CrossRef](#)]
43. Ionov, M.; Lazniewska, J.; Dzmitruk, V.; Halets, I.; Loznikova, S.; Novopashina, D.; Apartsin, E.; Krasheninina, O.; Venyaminova, A.; Milowska, K.; et al. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction. *Int. J. Pharm.* **2015**, *485*, 261–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supporting Information

Article

Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity

Elżbieta Okła¹, Piotr Białecki¹, Marta Kędzińska¹, Elżbieta Pędziwiatr-Werbicka¹, Katarzyna Miłowska¹, Samuel Takvor^{2,3,4}, Rafael Gómez^{2,3,4}, Francisco Javier de la Mata^{2,3,4}, Maria Bryszewska¹ and Maksim Ionov^{1,*}

¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 141/143 Pomorska St., 90-236 Lodz, Poland

² Department of Organic and Inorganic Chemistry, Research Chemistry Institute "Andrés M. del Río" (IQAR), University of Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Spain

³ Networking Research Center for Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), 28029 Madrid, Spain

⁴ Institute "Ramón y Cajal" for Health Research (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain

* Correspondence: maksim.ionov@biol.uni.lodz.pl

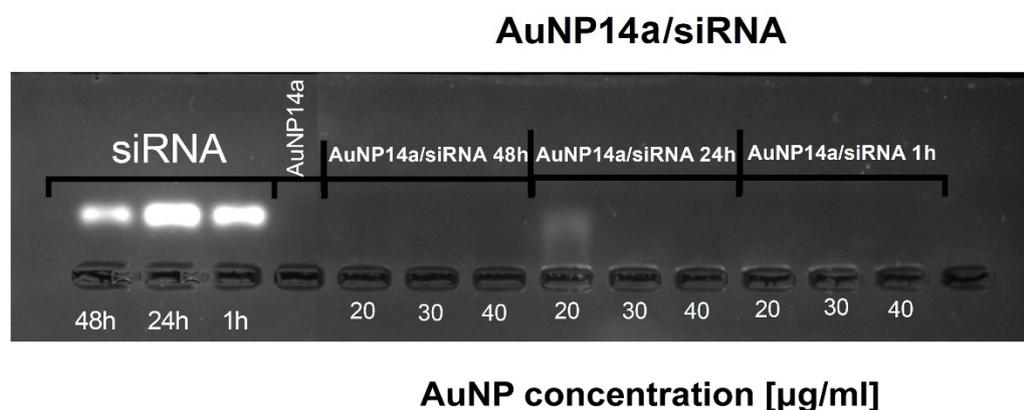


Figure S1. AuNP14a/siRNA complex stability in time (1 h, 24 h and 48 h). 3% Agarose gel electrophoregrams of ApoE4 siRNA alone or complexed with gold nanoparticle. Samples containing 1 $\mu\text{mol/L}$ siRNA per line and nanoparticles applied in the corresponding concentrations were prepared in sodium phosphate buffer 10 mmol/L in the presence of GelRed stain. Gels were visualized upon transillumination at 525 nm.



OPEN Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin

Elżbieta Okła^{1,2}, Sylwia Michlewska³, Adam Buczkowski⁴, Serafin Zawadzki^{1,5}, Katarzyna Miłowska¹, Javier Sánchez-Nieves^{6,7}, Rafael Gómez^{6,7}, Francisco Javier de la Mata^{6,7}, Maria Bryszewska¹, Janusz Blasiak⁸ & Maksim Ionov^{1,8}

Gold nanoparticles (AuNPs) are potentially applicable in drug/nucleic acid delivery systems. Low toxicity, high stability, and bioavailability are crucial for the therapeutic use of AuNPs and they are mainly determined by their interactions with proteins and lipids on their route to the target cells. In this work, we investigated the interaction of two pegylated gold nanoparticles, AuNP14a and AuNP14b, with human serum proteins albumin (HSA) and transferrin (Tf) as well as dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) liposomes, which can be a representative of biomembranes. We showed that AuNP14a/b interacted with HSA and Tf changing their electrical, thermodynamic, and structural properties as evidenced by dynamic light scattering, zeta potential, transmission electron microscopy, circular dichroism, fluorescence quenching, and isothermal titration calorimetry. These nanoparticles penetrated the DMPC membrane suggesting their ability to reach a target inside the cell. In most of the effects, AuNP14b was more effective than AuNP14a, which might result from its more positive charge. Further studies are needed to evaluate whether the interaction of AuNP14a/b with HSA and Tf is safe for the cell/organism and whether they may safely penetrate natural membranes.

Keywords Pegylated gold nanoparticles, Serum human albumin, Transferrin, Protein corona, DMPC lipid membranes, Liposomes

Abbreviations

AuNPs	gold nanoparticles
Tf	transferrin
siRNA	small interfering RNA
BBB	the blood-brain barrier
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DLS	Dynamic light scattering
RI	refractive index
CD	Circular dichroism
DPH	(1,6-diphenylhexatriene) and its hydrophilic derivative
TMA-DPH	(1-(4-Trimethylammonio-phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene p-toluenesulfonate)

¹Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of General Biophysics, University of Lodz, Pomorska 141/143, Lodz 90–236, Poland. ²University of Lodz Doctoral School of Exact and Natural Sciences, 21/23 Matejki St., Lodz 90-237, Poland. ³Faculty of Biology and Environmental Protection, Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, University of Lodz, Banacha 12/16, Lodz 90–237, Poland. ⁴Faculty of Chemistry, Department of Physical Chemistry, Division of Biophysical Chemistry, University of Lodz, Pomorska 165, Lodz 90-236, Poland. ⁵BioMedChem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, 21/23 Matejki St., 90-237 Lodz, Poland. ⁶Universidad de Alcalá Department of Organic and Inorganic Chemistry, and Research Institute in Chemistry “Andrés M. del Río” (IQAR), Spain and Instituto Ramon y Cajal de Investigacion Sanitaria, IRYCIS, Colmenar Viejo Road, Km 9, 100, Madrid 28034, Spain. ⁷Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain. ⁸Collegium Medicum, Faculty of Medicine, Mazovian Academy in Plock, Pl. Dabrowskiego 2, Plock 09-402, Poland. ✉email: elzbieta.okla@biol.uni.lodz.pl; maksim.ionov@biol.uni.lodz.pl

TEM	transmission electron microscopy
ITC	isothermal titration calorimetry
HSA	human serum albumin
PEG	polyethylene glycol
CD	circular dichroism

Colloidal gold nanoparticles (AuNPs) are considered non-toxic therapeutic drug/nucleic acid carriers and therefore it is important to assess their interaction with biomolecules that can be encountered on their way to the target site^{1,2}. In a biological environment, AuNPs can induce a cascade of different mechanisms and interactions, depending on their size, shape, charge, and cargo Xu³. In this work, we investigated two pegylated gold nanoparticles, AuNP14a and AuNP14b, with the dendron: polyethylene glycol (PEG) ratio 3:1 and 1:1, respectively, and their interaction with human serum albumin (HSA), transferrin (Tf) and lipid membranes that may impede the transit of nanoparticles and induce unwanted side effects. The synthesis, biophysical properties, and cytotoxic effects of these AuNPs were shown in our previous works^{4–7}. We showed that those AuNPs could be considered carriers of siApoE4 (anti-ApoE4 siRNA), a siRNA targeting a major genetic risk factor for Alzheimer disease^{7,8}.

We chose HSA as it is the major plasma protein, may effectively bind diverse ligands and so is widely used in biological studies of nanomaterials^{9–11}. Transferrin is a blood glycoprotein essential in iron transport and the maintenance of the blood-brain barrier (BBB), and therefore involved in the pathogenesis of many human disorders^{12,13}. Therefore, disturbance in the structure and functions of these proteins by nanoparticles may lead to their toxic effects.

The small size and high surface-to-volume ratio of nanoparticles facilitate their binding to biomolecules and the formation of “protein corona”^{10,11,14}. Covering NPs with proteins depends on the characteristics of nanomaterial (shape, size, curvature, surface area) and is driven by various forces, including Van der Waals interactions, hydrogen bonds, or electrostatic interactions¹⁵. However, some NPs can inhibit protein secondary structure conversion and consequently the inflammatory reaction¹⁶. It was shown that pre-coating of NPs by proteins prevented their removal by the immune system before cellular uptake and facilitated reaching the target site¹⁷. This phenomenon occurs in the case of transferrin-coated nanoparticles¹⁸. Since Tf receptors are present in the BBB cells, Tf is a common choice of protein corona to improve drug delivery to the brain^{18–20}.

Nanoparticles can also interact with biomembranes containing lipid bilayers with hydrophilic and hydrophobic parts essential for the uptake of nanoparticles²¹. Cationic AuNPs can penetrate the lipid bilayer through the hydrophobic tail region²². However, in vivo NPs interact with membranes as a nanoparticle-protein agglomerate. This can decrease the adhesion of NPs to the cell membrane and their cytotoxic effect^{23,24}. The modification of lipid structure after interaction with nanoparticles depends on the charge of NPs but also its other physicochemical features, including size and shape as well as membrane complexity and its surface tension²⁵. Moreover, the adhesion forces alter the elastic lipid membrane, so it can wrap around a nanoparticle. The energy of adhesion determines whether the nanoparticle will be wrapped partly or wholly and consequently, it will be internalized and anchored in the lipid membrane or completely engulfed through endocytosis²⁶. Therefore, studying the nanoparticle–membrane interaction is important in the understanding of NPs bioactivity and biodistribution.

In this work, we investigated the interaction of AuNP14a/b with HSA, Tf, and lipid membranes using dynamic light scattering, zeta potential, transmission electron microscopy, circular dichroism, fluorescence quenching, and isothermal titration calorimetry.

Materials and methods

Materials

Two pegylated gold nanoparticles, AuNP14a and AuNP14b, with carbosilane dendrons were synthesized at the University of Alcalá (Alcalá de Henares, Spain) as described previously [5]. AuNP14a and AuNP14b have the same gold core and the dendron to PEG ratio 3:1 and 1:1, respectively (Fig. 1). Either AuNP was taken from its stock (1 mg/mL) phosphate buffer solution, pH 7.4, and added to the working sample to give a final concentration in the range of 5–90 µg/mL. Control samples received buffer only. Human serum albumin was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and human transferrin from Biorbyt Ltd (Cambridge, UK). 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

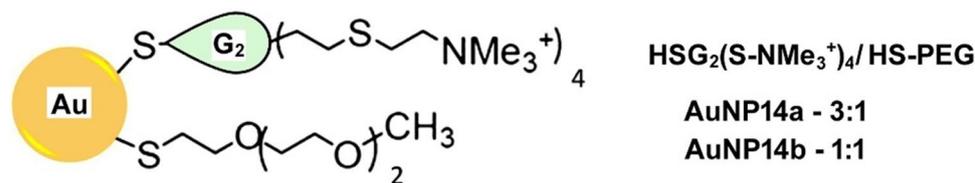


Figure 1. Structure of pegylated gold nanoparticles of second generation (G_2) with carbosilane dendron (left panel). The cationic dendron, $\text{HSG}_2(\text{SNMe}_3^+)_4$ and commercial PEG ligand $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, HS-PEG with the presentation of dendron/PEG ratio (right panel).

Zeta potential and dynamic light scattering

Zeta potential and hydrodynamic diameter of proteins titrated with AuNP14a/b (5–60 µg/mL) were measured in phosphate buffer (10 mM, pH7.4) on Zetasizer Nano ZS analyzer (Malvern Instrument Ltd., Malver, UK). The concentration of proteins was 0.25 µM. The results of zeta potential were calculated with the Helmholtz–Smoluchowski equation. Results were collected from 3 measurements, 7 runs each. Dynamic light scattering (DLS) measurements provided information about the size of proteins and agglomerates they formed with AuNPs. The backscatter was set for 173°, λ_{abs} 720 nm and refractive index (RI) was 0.28. The particle size was determined from 3 independent replicates- the average of 5 cycles each.

Circular dichroism

Circular dichroism (CD) measurements were performed to analyze changes in the secondary structure of HSA and Tf in the presence of AuNPs. Stock solutions of proteins at a final concentration of 0.5 µM each were prepared in the phosphate buffer and measured on a Jasco J-815 CD spectrometer (Jasco International Co., Ltd., Tokyo, Japan) at a wavelength set from 195 to 260 nm using a 0.5 nm quartz cell.

Fluorescence measurements

All fluorescence measurements were performed with protein solutions at 4 µM on a PerkinElmer LS-50B spectrofluorometer (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Quenching of fluorescence emitted by tryptophan of HSA and Tf upon AuNPs addition was observed at the wavelength emission range 305–445 nm (λ_{exc} 295 nm). The monochromator slits were set at 2.5 nm for excitation and 10 nm for emission. To assess the interaction of AuNPs with DMPC liposomes. Two fluorescent probes: DPH (1,6-diphenylhexatriene) and its hydrophilic derivative TMA-DPH (1-(4-Trimethylammonio)phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene p-toluenesulfonate) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) were separately used to determine whether the gold nanoparticles penetrate hydrophobic or hydrophilic region of the liposomal lipid bilayer, respectively. Samples were prepared in phosphate buffer. Both fluorescent probes were used at 2 µM, and DMPC was at 30 µg/mL. The excitation/emission wavelengths for DPH and TMA-DPH were 348/358 nm and 426/428 nm, respectively. An appropriate fluorescent probe was mixed with DMPC liposomes and AuNPs before measurements.

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscope JEOL-1010 (JEOL, Tokyo, Japan) was used to take a picture of protein corona forming around AuNPs and to show interactions between tested nanoparticles (AuNP14a, AuNP14b) and DMPC liposomes. Samples were prepared in the phosphate buffer and incubated (15 min, 37 °C) before placing them on a copper grid with a carbon surface. Grids with samples were stained with uranyl acetate solution for 2 min, washed, and dried at room temperature for 5 min. Then samples were examined in a transmission electron microscope.

Liposomes preparation

10 mg DMPC was dissolved in 400 µL chloroform and dried on a rotary evaporator (30 min, 37 °C). The obtained residue was dissolved in 3 mL of phosphate buffer to a final concentration of 5 mmol/L and vortexed until a homogeneous suspension was acquired. The solution was then extruded 21 times by passing the lipids through the 0.2 µm membrane using an Avanti extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). Liposomes were stored at 4 °C.

Isothermal calorimetric titration

An isothermal titration calorimeter LV Affinity ITC with gold cells (TA Instruments, New Castle, DE, USA) was applied to evaluate the thermodynamic properties of complexes of HSA or Tf with AuNP14a/b. The protein solution (20 µmol/L in a 1.4275 mL cell) was titrated by adding 50 × 5 µl doses of an 8 mg/mL AuNP solution from the syringe. The time interval between subsequent injections was 1200 s. Isothermal calorimetric measurements were carried out at 25 °C and a stirring speed of 410 rpm. The heat effects of AuNP dilution were determined separately maintaining the same calorimeter parameters. The heat effects of the direct interaction of protein with AuNP were calculated by subtracting the effects of AuNP alone. The binding isotherms describing the heat effects q of the direct interaction of the proteins with nanoparticles as a function of the titrated solution composition expressed as the ratio of AuNP mass per number of protein moles were analyzed for the endpoint of each titration, determined as the cross point of rectilinear fragments in the range of low and high AuNP concentrations.

Data analysis

All data were calculated from three independent replications and presented as mean ± SD. The normality of the data distributions was determined with the Shapiro-Wilk test. The statistical differences of tested probes to control were assessed using the Kruskal-Wallis test and one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. Mixed-effects analysis was used to compare effects between nanoparticles. All analyses were performed with GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Dynamic light scattering and ζ -potential

Measurements of protein hydrodynamic diameter were made to check whether HSA and Tf form agglomerates with the gold nanoparticles. The mean hydrodynamic diameter of native proteins was 12.03 ± 2.32 nm for HSA and 12.39 ± 0.84 nm for Tf. Upon addition of both nanoparticles hydrodynamic diameter of HSA changed and AuNP14a formed larger aggregates than AuNP14b (Fig. 2A). Increasing concentrations of nanoparticles did not

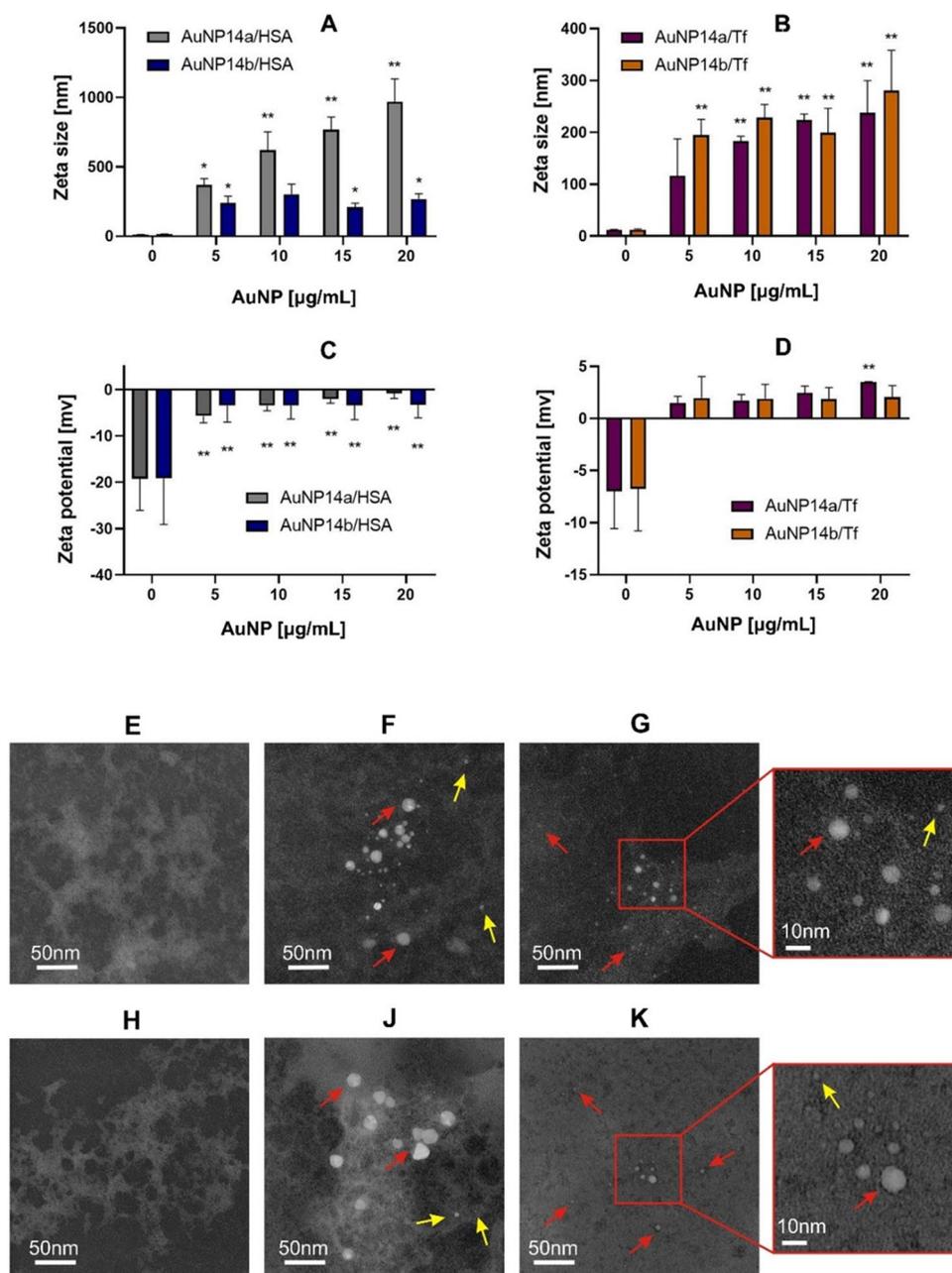


Figure 2. Influence of pegylated gold nanoparticles AuNP1a and AuNP14b on the hydrodynamic diameter expressed as zeta size of human serum albumin (HSA) (A) and transferrin (Tf) (B), and ζ -potential of HSA (C) and Tf (D). Graphs present mean values \pm SD, * - $p < 0.05$, *** - $p < 0.001$, $n = 3$. Transmission electron microscopy shows the morphology of the proteins in the presence and the absence of AuNP14a/b: HSA (E), HSA and AuNP14a (F), HSA and AuNP14b (G), Tf (H) Tf and AuNP14a (J) Tf and AuNP14b (K). Red arrows point at large and yellow arrows to small nanoparticle/protein complexes.

alter the negative charge of the protein (Fig. 2C). Both nanoparticles aggregated with Tf but the hydrodynamic diameter of these conglomerates was smaller than those with HSA (Fig. 2B). ζ -potential of Tf alone was slightly negative and although dosing nanoparticles changed the charge to positive, the difference was not significant (Fig. 2D).

Transmission electron microscopy

HSA (Fig. 2E) and Tf (Fig. 2H) after addition AuNPs formed aggregates seen as dense clouds around AuNPs (Fig. 2F, G and J, K). AuNPs tended to associate in a protein cluster and agglomerates with larger AuNP14a were captured as more dense electron structures than those with smaller AuNP14b. These observations that the AuNPs interacted with both proteins forming higher-order structures.

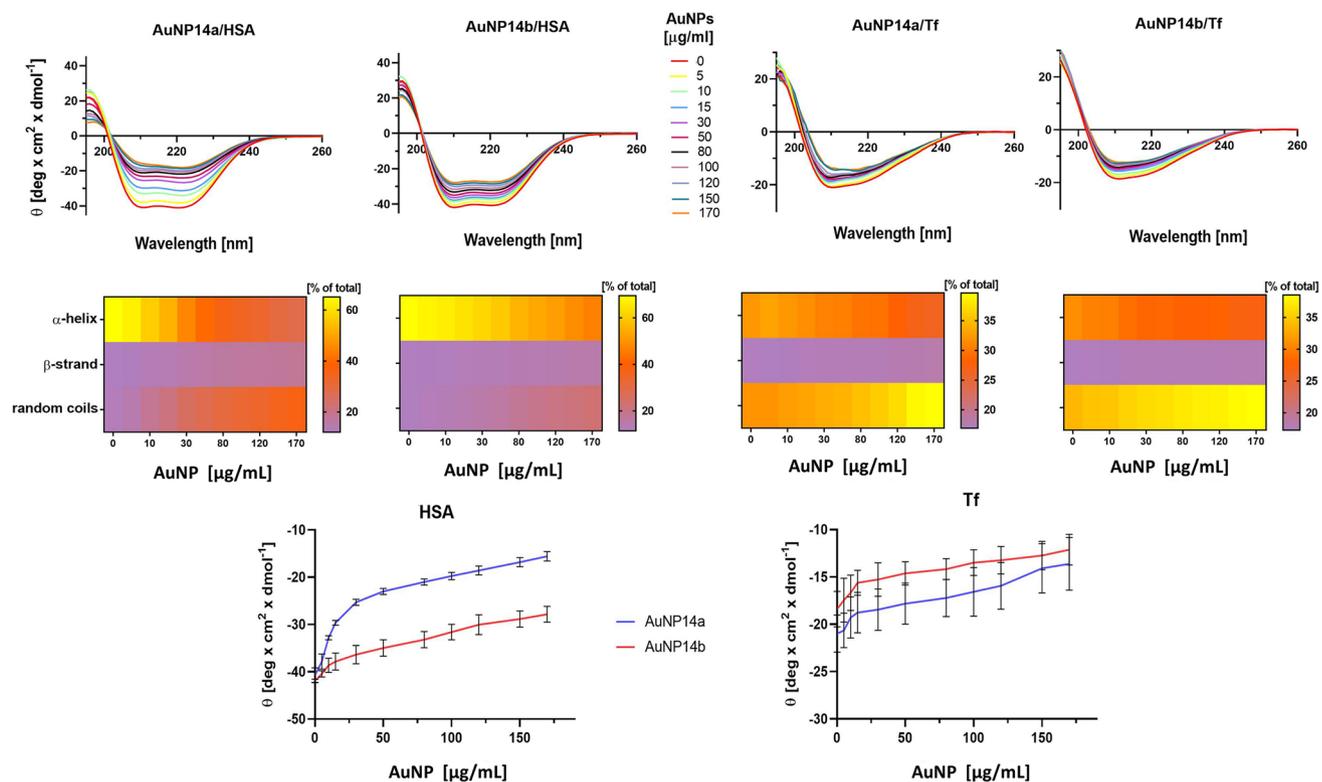


Figure 3. Circular dichroism spectra of human serum albumin (HSA) and transferrin (Tf) incubated with AuNP14a/b nanoparticles expressed by ellipticity (top panel). Heat maps for the contribution of α -helix, β -strand, and random coils conformation to the overall structure of the proteins incubated with the AuNPs (middle panel). Ellipticity of HSA and Tf in the presence of AuNPs at λ 208 nm (bottom panels). Mean \pm SD, $n = 3$.

Protein	AuNPs	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Fluorescence intensity (mean \pm SD)
HSA	AuNP14a	0	791.9 \pm 48.4
		60	195.3 \pm 2.3
	AuNP14b	0	839.1 \pm 41.2
		60	465.8 \pm 23.6
Tf	AuNP14a	0	663.2 \pm 26.4
		60	260.8 \pm 9.6
	AuNP14b	0	798.5 \pm 35
		60	452.7 \pm 24.2

Table 1. Quenching of the fluorescence of tryptophan in human serum albumin (HSA) and transferrin (tf) in the presence of gold nanoparticles AuNP14a and AuNP14b.

Circular dichroism

Circular dichroism (CD) measurements provided information about changes in the secondary structure of proteins induced by AuNPs. Both nanoparticles interacted with HSA and Tf changing their spatial structure (Fig. 3). The most pronounced changes were observed for HSA incubated with AuNP14a, which primarily affected the α -helix form of the protein. Both NPs induced similar structural changes in Tf. Data obtained for transferrin was comparable for both tested nanoparticles. Neither AuNP affected the β -strand form of the proteins (Tables S1–S4).

Fluorescence quenching

Quenching of the fluorescence of tryptophan (Trp), which is the source of intrinsic fluorescence of HSA and Tf, provided information on the binding of AuNPs with these proteins.

Table 1 presents the results of the quenching of fluorescence of HSA and Tf by the AuNP14a/b nanoparticles. It can be seen that AuNP14a quenched the Trp fluorescence more effectively than AuNP14b.

Isothermal titration calorimetry

Isothermal titration calorimetry indicated that both gold nanoparticles interacted with both proteins and all interactions were endothermic (Fig. 4). It can be seen that the most pronounced thermal interaction was for HSA and AuNP14a effect.

Size, ζ -potential, morphology and fluorescence anisotropy of DMPC liposomes

The addition of the gold nanoparticles did not change the size of DMPC liposomes as evaluated by dynamic light scattering (Fig. 5A). The ζ -potential of negatively charged DMPC turned positive in most cases after adding AuNPs (Fig. 5B). Without the gold nanoparticles, DMPC liposomes were featured by round, low-density homogenous objects (Fig. 5C). After treatment with AuNP14a/b, the liposomes were characterized by a higher density and more distinct edges. No changes were observed in the liposome size (Fig. 5D and E). Both nanoparticles penetrated the outer and inner parts of the liposome membrane, as evidenced by an increase in anisotropy fluorescence with DPH and TMA-DPH, respectively (Fig. 5F and G).

Discussion

Gold nanoparticles are widely studied as drug/nucleic acid carriers. Pegylated gold nanoparticles were also investigated as drug carriers. However, many of these studies are limited to the formation of a complex with the cargo and do not consider several factors that may impede the movement of the complex to the target cell. Although it was shown that the surface chemistry is responsible for the interaction of gold nanoparticles with bovine serum albumin, but we extended such study on human albumin and pegylated gold nanoparticles²⁷.

In this work, we examined the interaction between proteins, represented by HSA and Tf, and model membranes, represented by DMPC liposomes, with two pegylated gold nanoparticles AuNP14a and AuNP14b considered as potential drug/nucleic acid delivery systems. Therefore, our work provided some data on the possible effects induced by the nanoparticles on their way to the target. In the presence of AuNPs ζ -potential of HSA increased but remained negative. However, AuNPs induced a shift from negative to positive ζ -potential in Tf. These differences may be explained by the differences in the structure of HSA and Tf. Albumin is composed of three homologous domains, Tf has two domains and its main role is the transport of Fe(III) ions, thus it has a high affinity to bind positively charged particles^{10,11,28,29}. These features may, at least in part, contribute to a greater susceptibility of HSA to form aggregates than Tf, observed in this work. The isoelectric point (pI) of HSA and Tf is 5.0 and 5.7, respectively. Therefore, the surface charge of both proteins is negative as their pI is below pH of blood in normal conditions (average 7.4) and so both proteins may electrostatically interact with positively charged gold nanoparticles. The optimal zeta potential for drug and nucleic acid delivery by gold nanoparticles depends on several factors, including the cargo properties, the target cells, and their environment, and the physiological environment, generally, nanoparticles with a zeta potential greater than +25 mV or less than -25 mV are considered stable in suspension, as the surface charge prevents aggregation³⁰. However, for drugs, a slightly negative zeta can help to interact with cell membranes through attractive van der Waals forces, but a positive charge can help in binding the negatively charged nucleic acids. Although all experiments were performed in 10 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4), whose pH is not exactly physiological, our previous experience justifies using such buffer as optimal for the biophysical techniques we employed. Transmission electron microscopy showed aggregate formation by HSA and Tf upon the addition of AuNPs. Similar effects were observed and associated with protein corona formation in other studies^{31,32}.

We applied different HSA and Tf concentrations using different techniques to obtain an optimal output signal.

Both HSA and Tf displayed specific profiles in the far-UV spectrum observed in circular dichroism measurements. HSA has two negative peaks at 208 nm and 222 nm and Tf has a negative peak at 209 nm and a positive peak at 193 nm^{33,34}. Interaction with nanoparticles resulted in changes in these spectra and therefore alteration in the contribution of α -helix and random coils conformation in the overall structure of both proteins.

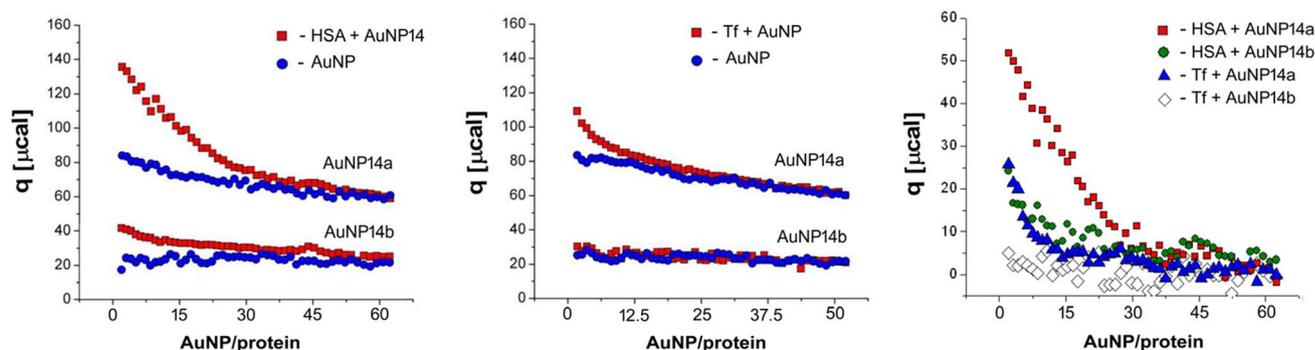


Figure 4. Thermal effects of the interaction between gold nanoparticles AuNP14a/b and human serum albumin (HSA) or transferrin (Tf) evaluated by the heat (q) in isothermal titration calorimetry (left and middle panels). The right panel presents the thermal effects of the direct interaction of the proteins with AuNPs after subtracting the effects of AuNP dilution from their corresponding thermal effects of the titration of the protein solution with AuNP solution.

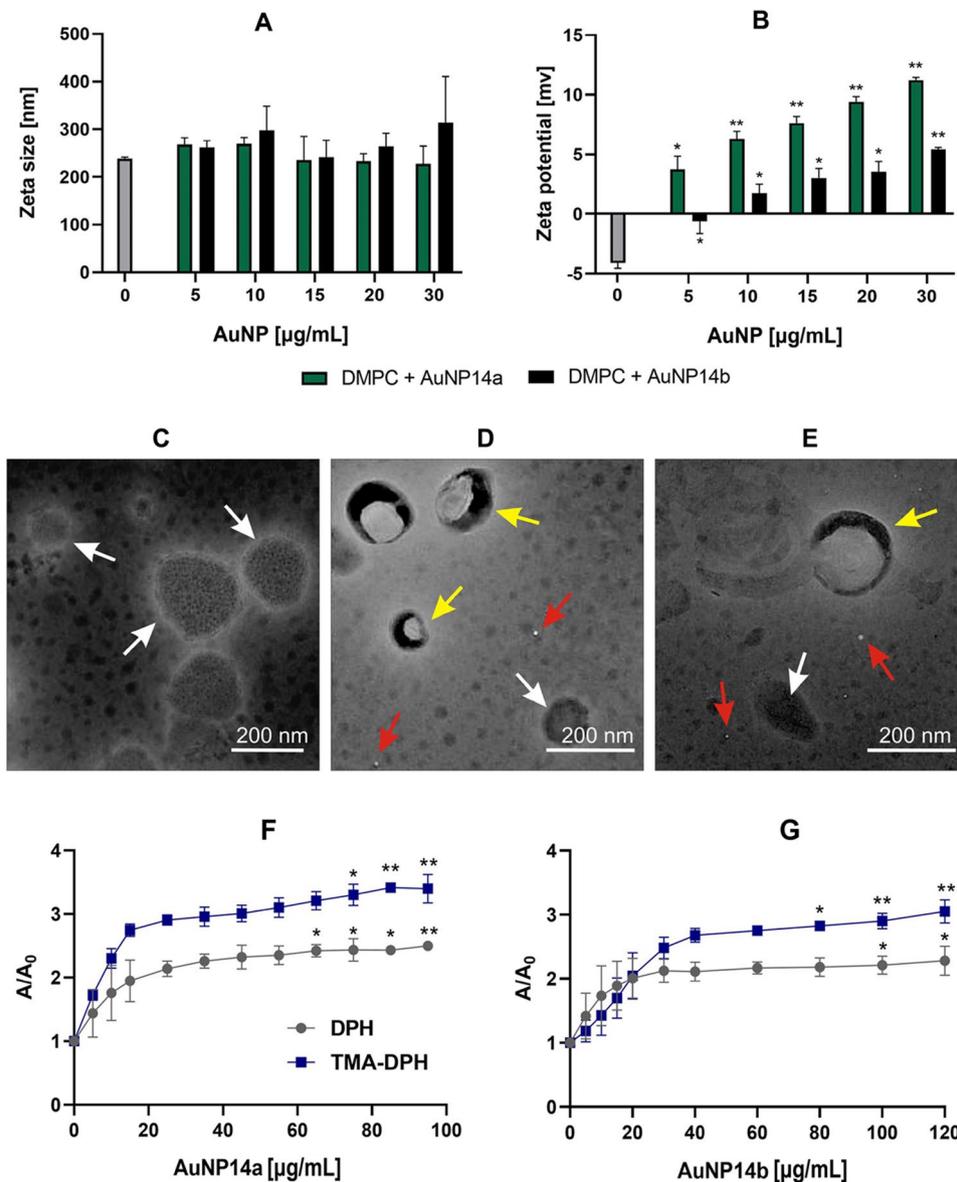


Figure 5. Zeta diameter (A) and zeta potential (B) of DMPC liposomes in the presence of gold nanoparticles AuNP14a/b. The shape of DMPC liposomes revealed by inverted transmission electron microscopy in the absence (C) and the presence of AuNP14a (D) and AuNP14b (E). White arrows point at free liposomes, red at free gold nanoparticles, and yellow at liposome/nanoparticle complexes. The mean relative fluorescence anisotropy (A/A_0) of the DPH and TMA-DPH probes added to DMPC liposomes incubated with AuNP14a (F) or AuNP14b (G). Error bars denote SD, $n=3$. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ as compared with free liposomes.

We did not perform functional studies for HSA and Tf in the presence or absence of gold nanoparticles. Therefore, it is not possible in this work to determine how the binding of these proteins by gold nanoparticles influenced their functionality. However, as the higher-order structure of a protein is a major determinant of its functionality, some conclusions can be drawn from the CD experiments. Changes in chirality and loss of the α -helix structure of protein lead to its denaturation. This is a common effect observed in protein-nanoparticle interaction^{34,35}. Circular dichroism spectra analysis and alteration in secondary structures help to understand how the functionality is changing and whether the process of denaturation can be reversible. The greatest loss of α -helix was observed in HSA after AuNP14a addition (Tables S1-S4). Transferrin was less susceptible to secondary structure loss upon AuNPs addition. In general, Tf was found to be less susceptible to spectral and structural changes. Increasing concentrations of gold nanoparticles increased the random coil fraction.

Quenching of intrinsic protein fluorescence by nanoparticles is usually exploited to determine the kinetics of binding but here we used it to show how AuNPs affected protein conformation. Tryptophan is present in HSA and Tf in different amounts and accessibility. HSA has one Trp in the hydrophobic pocket of the IIA domain, while Tf has eight Trp residues among which 3 are in the N-lobe and 5 in the C-lobe^{36,37}. Conformational changes can be evidenced by quenching spectrum shifts toward smaller wavelengths (blueshifts) or higher wavelengths

(redshift)³⁸. In our study, we observed a slight redshift for HSA with both AuNPs. Redshift indicates that Trp became more exposed during AuNPs titration and therefore HSA structure may become loose. Tf did not display any shift and strong fluorescence decline at the same time as presented in Table 1. The greater amount of Trp and its worse accessibility may be the reason for the smaller sensitivity of Tf to AuNPs³⁹. Tested nanoparticles do not display fluorescence in measured wavelengths. Isothermal titration calorimetry showed that all protein-AuNP interactions were endothermic, and the strongest endothermic effect was observed for AuNP14a with HSA. This result provides information about the high affinity of AuNP14a to albumin. The reaction of transferrin with AuNP14b showed “no end point” of titration and this outcome could be interpreted as the low affinity of nanoparticle to this protein³⁹.

Measurements of the zeta diameter and zeta potential of liposomes complexed with AuNPs showed that DMPC liposomes did not change their zeta size in the presence of AuNPs, but they changed their zeta potential from negative to positive. These results indicate that AuNPs interacted with lipid membranes, but they did not disrupt them. TEM images show that liposomes remained spherical after treatment with AuNPs and due to the density alterations, nanoparticles might penetrate liposomes through the lipid bilayer. The size of DMPC complexed with AuNPs differed between DLS measurements and TEM micrographs, but this phenomenon can be explained by differences in sample preparation, high vacuum effect causing sample collapsing into the desiccated layer in TEM or DLS property to hinder smaller particles by larger ones^{40–42}.

Membrane fluidity can be directly related to its permeability⁴³. Measurements of fluorescence anisotropy help to assess bilayer microviscosity that is inversely related to fluidity⁴⁴. Our data suggest that both nanoparticles increased the microviscosity of the inner and outer parts of the membrane, but AuNP14a caused significant changes at smaller concentrations than AuNP14b. These results lead to the conclusion that AuNP14a and AuNP14b interact with a hydrophilic head and can penetrate the hydrophobic tails of phospholipids. This statement is consistent with ζ -potential and TEM results showing that the nanoparticles change the charge of the outer part of the membrane and diffuse through the bilayer of the liposome. Electrostatic interactions of gold atoms with hydrophilic heads of the membrane were shown suggesting that they might be independent of the size of gold nanoparticles^{45,46}.

This work showed that the AuNP14a/b nanoparticles may penetrate a lipid membrane, suggesting that they may reach the cytoplasm of a live cell. Therefore, they may be considered a potential drug/nucleic acid carrier, but further studies are needed to determine binding constant and the number of binding sites for the drug or nucleic acid of interest⁴⁷.

It is a limitation of our work that we did not check whether the system reached equilibrium and we did not investigate the kinetics of the interactions and the influence of protein precipitation on fluorescence intensity.

We performed a series of in vitro experiments, but we intended to obtain some data that could be related to in vivo conditions. The general conclusion is that if the gold nanoparticles we used were applied as drug/nucleic acid carriers, they would interact with HSA and Tf. However, it is not possible to determine how strong such interactions would be as it is not possible to determine or even approximate the binding constants for complexes of the nanoparticles with other blood proteins.

Conclusions

Pegylated gold nanoparticles can interact with human serum albumin and transferrin changing their properties, including their secondary structure. Further studies are needed to determine whether these changes are associated with the changes in the functionality of HSA and Tf and if they can be harmful to the cell/organism. These nanoparticles may penetrate DMPC liposomes suggesting that they may also diffuse through natural membranes and consequently may be considered as drug/nucleic acid carriers in the therapy.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors: Elżbieta Okła, Tel.: +48 42 635 43 80, e-mail: elzbieta.okla@biol.uni.lodz.pl Maksim Ionov, Tel.: +48 42 635 43 80, e-mail: maksim.ionov@biol.uni.lodz.pl.

Received: 4 July 2024; Accepted: 30 September 2024

Published online: 18 October 2024

References

- Bailey, A. L. et al. In vivo evaluation of safety, biodistribution and pharmacokinetics of laser-synthesized gold nanoparticles. *Sci. Rep.* **9**, 12890 (2019).
- Lin, Q., Fathi, P. & Chen, X. Nanoparticle delivery in vivo: a fresh look from intravital imaging. *EBioMedicine* **59**, 102958 (2020).
- Xu, M. et al. How entanglement of different physicochemical properties complicates the prediction of in Vitro and in vivo interactions of gold nanoparticles. *ACS Nano*. **12**, 10104–10113 (2018).
- Peña-González, C. E. et al. Gold nanoparticles stabilized by cationic carboxylate dendrons: synthesis and biological properties. *Dalt Trans.* **46**, 8736–8745 (2017).
- Barrios-Gumiel, A. et al. Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carboxylate dendronized gold nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **573**, 118867 (2020).
- Pędziwiatr-Werbicka, E. et al. PEGylation of dendronized gold nanoparticles affects their interaction with thrombin and siRNA. *J. Phys. Chem. B*. **125**, 1196–1206 (2021).
- Okła, E. et al. Pegylated Gold nanoparticles conjugated with siRNA: complexes formation and cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 6638 (2023).
- Rieker, C. et al. Apolipoprotein E4 expression causes gain of toxic function in isogenic human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* **39**, e195–e207 (2019).
- Bolaños, K., Kogan, M. J. & Araya, E. Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties. *Int. J. Nanomed.* **14**, 6387–6406 (2019).

10. Kubczak, M. et al. The effect of novel tyrosine-modified polyethyleneimines on human albumin structure – thermodynamic and spectroscopic study. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **227**, 113359 (2023).
11. Grodzicka, M. et al. OPEN a new class of polyphenolic carboxilene dendrimers binds human serum albumin in a structure – dependent fashion. *Sci. Rep.* 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56509-0> (2024).
12. Saharia, J. et al. Molecular-level profiling of human serum transferrin protein through assessment of nanopore-based electrical and chemical responsiveness. *ACS Nano*. **13**, 4246–4254 (2019).
13. Ashraf, A., Jeandriens, J., Parkes, H. G. & So, P. W. Iron dyshomeostasis, lipid peroxidation and perturbed expression of cystine/ glutamate antiporter in Alzheimer's disease: evidence of ferroptosis. *Redox Biol.* **32**, 101494 (2020).
14. Saptarshi, S. R., Duschl, A. & Lopata, A. L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnol.* **11**, 26 (2013).
15. Park, S. J. Protein–nanoparticle interaction: corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **15**, 5783–5802 (2020).
16. Palmieri, V. & Caracciolo, G. Tuning the immune system by nanoparticle–biomolecular corona. *Nanoscale Adv.* **4**, 3300–3308 (2022).
17. Xiao, W. & Gao, H. The impact of protein corona on the behavior and targeting capability of nanoparticle-based delivery system. *Int. J. Pharm.* **552**, 328–339 (2018).
18. Neves, A. R., van der Putten, L., Queiroz, J. F., Pinheiro, M. & Reis, S. Transferrin-functionalized lipid nanoparticles for curcumin brain delivery. *J. Biotechnol.* **331**, 108–117 (2021).
19. Ramalho, M. J., Loureiro, J. A., Coelho, M. A. N. & Pereira, M. C. Transferrin receptor-targeted nanocarriers: overcoming barriers to treat glioblastoma. *Pharmaceutics* **14**, 279 (2022).
20. Gabold, B. et al. Transferrin-modified chitosan nanoparticles for targeted nose-to-brain delivery of proteins. *Drug Deliv Transl Res.* **13**, 822–838 (2023).
21. Michlewska, S. et al. Lipid-coated ruthenium dendrimer conjugated with doxorubicin in anti-cancer drug delivery: introducing protocols. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **227**, 113371 (2023).
22. Tatur, S., Maccarini, M., Barker, R., Nelson, A. & Fragneto, G. Effect of functionalized gold nanoparticles on floating lipid bilayers. *Langmuir*. **29**, 6606–6614 (2013).
23. Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A. & Dawson, K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 779–786 (2012).
24. Lesniak, A. et al. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1438–1444 (2013).
25. Meesaragandla, B. et al. Interaction of Polystyrene nanoparticles with supported lipid bilayers: impact of nanoparticle size and Protein Corona. *Macromol. Biosci.* **23**, 2200464 (2023).
26. Contini, C. et al. Size dependency of gold nanoparticles interacting with model membranes. *Commun. Chem.* **3**, 130 (2020).
27. Wang, G., Yan, C., Gao, S. & Liu, Y. Surface chemistry of gold nanoparticles determines interactions with bovine serum albumin. *Mater. Sci. Eng. C*. **103**, 109856 (2019).
28. Merlot, A. M., Kalinowski, D. S. & Richardson, D. R. Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. *Front. Physiol.* **5**, 299 (2014).
29. Steere, A. N., Byrne, S. L., Chasteen, N. D. & Mason, A. B. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**, 326–333 (2012).
30. Siddique, S. & Chow, J. C. L. Gold nanoparticles for drug delivery and cancer therapy. *Appl Sci.* **10**, 3824 (2020).
31. Wolf, M. et al. A functional corona around extracellular vesicles enhances angiogenesis, skin regeneration and immunomodulation. *J. Extracell. Vesicles*. **11**, e12207 (2022).
32. Shcharbin, D. et al. Nanoparticle corona for proteins: mechanisms of interaction between dendrimers and proteins. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **134**, 377–383 (2015).
33. Fernández, J. R. G., Pita, N. & Meléndez, X. Parés Matos, E. I. Interaction of metallocene dichlorides with apo-human transferrin: a spectroscopic study and cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Int. J. Mol. Biol. Open. Access.* **5**, 79–109 (2020).
34. Marques, C., Maroni, P., Maurizi, L., Jordan, O. & Borchard, G. Understanding protein–nanoparticle interactions leading to protein corona formation: in vitro - in vivo correlation study. *Int. J. Biol. Macromol.* **256**, 128339 (2024).
35. Vincent, M. P. et al. Surface chemistry-mediated modulation of adsorbed albumin folding state specifies nanocarrier clearance by distinct macrophage subsets. *Nat. Commun.* **12**, 648 (2021).
36. Rabbani, G. & Ahn, S. N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: a natural cargo. *Int. J. Biol. Macromol.* **123**, 979–990 (2019).
37. James, N. G. et al. Inequivalent Contribution of the five tryptophan residues in the C-Lobe of human serum transferrin to the fluorescence increase when Iron is released. *Biochemistry*. **48**, 2858–2867 (2009).
38. dos Santos Rodrigues, F. H., Delgado, G. G., Santana da Costa, T. & Tasic, L. Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts. *BBA Adv.* **3**, 100091 (2023).
39. Siddiq, A. M., Murugan, D., Srivastava, R. & Alam, M. S. Influence of pH on interaction of silver nanoparticles - protein: analyses by spectroscopic and thermodynamic ideology. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **184**, 110524 (2019).
40. Michlewska, S. et al. Ruthenium metallodendrimers with anticancer potential in an acute promyelocytic leukemia cell line (HL60). *Eur. Polym. J.* **87**, 39–47 (2017).
41. Kuznetsova, E. V. et al. The role of integrated approach in the determination of nanoparticle sizes in dispersions. *Colloid J.* **84**, 704–714 (2022).
42. Wilson, B. K. & Prud'homme, R. K. Nanoparticle size distribution quantification from transmission electron microscopy (TEM) of ruthenium tetroxide stained polymeric nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **604**, 208–220 (2021).
43. Ballweg, S. et al. Regulation of lipid saturation without sensing membrane fluidity. *Nat. Commun.* **11**, 756 (2020).
44. Ionov, M. et al. Effect of amyloid beta peptides Ab1–28 and Ab25–40 on model lipid membranes. *J. Therm. Anal. Calorim.* **99**, 741–747 (2010).
45. Mhashal, A. R. & Roy, S. Effect of gold nanoparticle on structure and fluidity of lipid membrane. *PLoS One*. **9**, e114152 (2014).
46. Bhat, A. et al. Effects of gold nanoparticles on lipid packing and membrane pore formation. *Appl. Phys. Lett.* **109**, 263106 (2016).
47. Mariam, J., Dongre, P. M. & Kothari, D. C. Study of Interaction of Silver nanoparticles with bovine serum albumin using fluorescence spectroscopy. *J. Fluoresc.* **21**, 2193–2199 (2011).

Author contributions

E.O. Investigation, Visualization, Methodology, Formal analysis, Software, Writing - original draft, S.M. Investigation, Visualization, Writing - review & editing, A.B. Investigation, Methodology, Writing - original draft, Software, S.Z. Investigation, Methodology, Software, K.M. Methodology, Writing - review & editing, J.S.N. Sources, Funding acquisition, Writing - review & editing, R. G. Sources, Funding acquisition, Writing - review & editing, F.J.M. Sources, Funding acquisition, Writing - review & editing, J.B. Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing, M.B. Funding acquisition, Writing - review & editing, M.I. Conceptualization, Data curation, Supervision, Writing - review & editing,

Funding

This work was supported by grant 2018/30/Z/NZ1/00911 of the Project “NanoTendo” financed by the National Science Centre, Poland under the M-ERA.NET 2, which has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme, co-financed by grant of the National Science Centre of Poland under “Beethoven Life 1” program, project “NP-HALE” no: 2018/ 31/F/NZ5/03454, and by grant PID2020-112924RBI00 (MINECO), CIBER-BBN and P2022/BMD7406 (Comunidad de Madrid).

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-74898-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.O. or M.I.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Suplementarny Information

Pegylated gold nanoparticles as potential drug/nucleic acid carriers: interaction with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin

Elżbieta Okła ^{1,2*}, Sylwia Michlewska ³, Adam Buczkowski ⁴, Serafin Zawadzki ^{1,5}, Katarzyna Miłowska ¹, Javier Sánchez-Nieves ^{6,7}, Rafael Gómez ^{6,7}, Francisco Javier de la Mata ^{6,7}, Maria Bryszewska ¹, Janusz Blasiak ⁸, Maksim Ionov ^{1,8*}

¹ University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of General Biophysics, Pomorska 141/143, 90–236 Lodz, Poland.

² University of Lodz Doctoral School of exact and natural sciences, 21/23 Matejki St., 90-237, Lodz, Poland.

³ University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Banacha 12/16, 90–237 Lodz, Poland.

⁴ University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Physical Chemistry, Division of Biophysical Chemistry, Pomorska 165, 90-236 Lodz, Poland.

⁵ BioMedChem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, 21/23 Matejki St., 90-237 Lodz, Poland.

⁶ Universidad de Alcalá Department of Organic and Inorganic Chemistry, and Research Institute in Chemistry "Andrés M. del Río" (IQAR), Spain and Instituto Ramon y Cajal de Investigacion Sanitaria, IRYCIS, Colmenar Viejo Road, Km 9, 100, 28034 Madrid, Spain.

⁷ Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain.

⁸ Mazovian Academy in Plock, Collegium Medicum, Faculty of Medicine, Pl. Dabrowskiego 2, 09-402 Plock, Poland.

Table S1. Changes in secondary structures of HSA upon AuNP14a administration. Data shows mean values \pm SD of three independent repeats.

AuNP14a [μ g/ml]	α -helix [%] \pm SD	β -strands [%] \pm SD	random coil [%] \pm SD
0	65.10 \pm 5.11	12.07 \pm 0.64	12.77 \pm 2.03
5	62.63 \pm 0.84	12.37 \pm 0.15	14.63 \pm 0.32
10	56.70 \pm 0.10	13.10 \pm 0.00	18.37 \pm 0.12
15	52.20 \pm 0.26	13.70 \pm 0.00	20.90 \pm 0.44
30	44.90 \pm 0.96	14.77 \pm 0.15	25.07 \pm 0.55
50	40.07 \pm 0.95	15.50 \pm 0.10	27.57 \pm 0.83
80	35.77 \pm 0.57	16.23 \pm 0.12	29.83 \pm 0.68
100	33.63 \pm 0.42	16.60 \pm 0.10	31.37 \pm 0.72
120	32.27 \pm 0.96	16.87 \pm 0.15	32.23 \pm 0.85
150	29.67 \pm 0.40	17.30 \pm 0.00	34.67 \pm 0.97
170	28.07 \pm 0.40	17.60 \pm 0.10	36.03 \pm 0.97

Table S2. Changes in secondary structures of HSA upon AuNP14b administration. Data shows mean values \pm SD of three independent repeats.

AuNP14b [$\mu\text{g/ml}$]	α -helix [%] \pm SD	β -strands [%] \pm SD	random coil [%] \pm SD
0	69.45 \pm 0.64	11.45 \pm 0.07	11.40 \pm 0.14
5	67.53 \pm 0.49	11.77 \pm 0.06	12.20 \pm 0.17
10	66.33 \pm 1.75	11.90 \pm 0.26	13.03 \pm 0.81
15	64.27 \pm 3.16	12.23 \pm 0.45	13.77 \pm 1.30
30	61.97 \pm 2.80	12.50 \pm 0.35	14.87 \pm 1.38
50	59.47 \pm 2.29	12.87 \pm 0.32	15.90 \pm 1.13
80	55.90 \pm 2.17	13.37 \pm 0.32	17.63 \pm 1.15
100	53.50 \pm 1.93	13.67 \pm 0.32	18.97 \pm 1.02
120	51.63 \pm 2.42	13.90 \pm 0.35	20.40 \pm 1.42
150	48.47 \pm 1.78	14.37 \pm 0.23	21.67 \pm 1.10
170	46.43 \pm 1.79	14.67 \pm 0.23	22.80 \pm 1.22

Table S3. Changes in secondary structures of Tf upon AuNP14a administration. Data shows mean values \pm SD of three independent repeats.

AuNP14a [$\mu\text{g/ml}$]	α -helix [%] \pm SD	β -strands [%] \pm SD	random coil [%] \pm SD
0	32.27 \pm 2.74	17.07 \pm 0.49	31.90 \pm 1.90
5	33.00 \pm 1.35	16.90 \pm 0.20	31.90 \pm 0.96
10	32.23 \pm 2.30	17.03 \pm 0.45	32.67 \pm 1.83
15	31.50 \pm 2.09	17.20 \pm 0.35	33.07 \pm 1.72
30	30.70 \pm 1.91	17.33 \pm 0.38	33.73 \pm 1.65
50	30.43 \pm 0.50	17.37 \pm 0.12	34.13 \pm 1.05
80	29.60 \pm 0.72	17.50 \pm 0.20	35.10 \pm 0.66
100	29.50 \pm 1.73	17.47 \pm 0.35	35.93 \pm 1.65
120	28.17 \pm 2.50	17.70 \pm 0.53	37.07 \pm 1.40
150	26.87 \pm 2.70	17.87 \pm 0.70	39.17 \pm 0.51
170	26.27 \pm 1.95	18.00 \pm 0.50	39.63 \pm 1.14

Table S4. Changes in secondary structures of **Tf** upon **AuNP14b** administration. Data shows mean values \pm SD of three independent repeats.

AuNP14b [μg/ml]	α-helix [%] \pm SD	β-strands [%] \pm SD	random coil [%] \pm SD
0	31.00 \pm 1.15	17.27 \pm 0.21	33.70 \pm 1.25
5	30.07 \pm 2.07	17.43 \pm 0.40	34.50 \pm 1.75
10	30.03 \pm 1.88	17.40 \pm 0.35	34.70 \pm 1.47
15	28.87 \pm 1.17	17.67 \pm 0.23	35.53 \pm 1.01
30	28.23 \pm 1.00	17.80 \pm 0.20	36.17 \pm 1.36
50	28.33 \pm 0.87	17.73 \pm 0.21	36.40 \pm 1.08
80	27.77 \pm 1.00	17.83 \pm 0.21	37.00 \pm 1.06
100	27.80 \pm 1.49	17.83 \pm 0.29	37.40 \pm 1.37
120	28.07 \pm 1.63	17.77 \pm 0.32	37.53 \pm 1.31
150	27.07 \pm 1.15	17.93 \pm 0.21	38.13 \pm 1.23
170	27.10 \pm 0.80	17.93 \pm 0.12	38.53 \pm 1.36



Article

Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease

Elżbieta Okła^{1,2,*}, Marcin Hołota³, Sylwia Michlewska⁴, Serafin Zawadzki^{1,5}, Katarzyna Miłowska¹, Javier Sánchez-Nieves^{6,7}, Rafael Gómez^{6,7}, Francisco Javier De la Mata^{6,7}, Maria Bryszewska¹ and Maksim Ionov^{1,8}

¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; katarzyna.milowska@biol.uni.lodz.pl (K.M.)

² Doctoral School of Exact and Natural Sciences, University of Lodz, 21/23 Matejki St., 90-237 Lodz, Poland

³ Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; marcin.holota@biol.uni.lodz.pl

⁴ Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

⁵ BioMedChem Doctoral School, University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, 21/23 Matejki St., 90-237 Lodz, Poland

⁶ Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Spain; javier.sancheznieves@uah.es (J.S.-N.); javier.delamata@uah.es (F.J.D.I.M.)

⁷ Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), 28029 Madrid, Spain

⁸ Faculty of Medicine, Collegium Medicum, Mazovian Academy in Plock, Pl. Dabrowskiego 2, 09-402 Plock, Poland

* Correspondence: elzbieta.okla@biol.uni.lodz.pl; Tel.: +48-42-635-41-47

Abstract

Background: The proportion of people suffering from neurodegenerative conditions, such as Alzheimer's disease (AD), is increasing in the population year on year. Despite the constant effort of researchers, these conditions remain incurable and can only be managed by alleviation or delaying of symptoms. The lack of suitable treatment is caused by constricted access to the brain, limited by the brain-blood barrier. The aim of this work was to investigate two pegylated gold nanoparticles as potential carriers of therapeutic siRNA and their impact on the cellular functions of Human Brain Endothelial Cells. **Methods and Results:** Nanoparticles AuNP14a and AuNP14b complexed with siRNA were internalized by HBEC-5i cells and located in the cytoplasm. The genotoxicity assay proved that the nucleus was not affected and complexed nanoparticles did not cause DNA damage. The reactive oxygen species formation and mitochondrial membrane potential changes were measured and showed an adaptive response of cells after compound administration. Results obtained in a cytotoxicity assay conducted on astrocytes and pericytes, which are components of the blood–brain barrier, confirmed the biosafety of tested nanoparticles. **Conclusions:** In summary, it was shown that AuNP14a and AuNP14b are promising candidates as nanocarriers for therapeutic nucleic acids through biological barriers.

Keywords: PEGylated gold nanoparticles; siRNA delivery; Human Brain Endothelial Cells



Academic Editor: Santosh Bashyal

Received: 23 July 2025

Revised: 20 August 2025

Accepted: 22 August 2025

Published: 29 August 2025

Citation: Okła, E.; Hołota, M.; Michlewska, S.; Zawadzki, S.; Miłowska, K.; Sánchez-Nieves, J.; Gómez, R.; De la Mata, F.J.; Bryszewska, M.; Ionov, M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. *Biomedicines* **2025**, *13*, 2108. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13092108>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Disorders affecting the nervous system include a wide range of conditions that can prominently impair life quality or preclude independent functioning. According to the 2021 global report, 43% of the world population is affected by neurological conditions [1]. The

treatment of neurodegenerative diseases is limited by a constricted access to the structures affected by these conditions. The blood–brain barrier (BBB) and blood–cerebrospinal fluid barrier (BCB) fulfill their functions by protecting the brain and spinal cord from toxins and microorganisms and securing a homeostatic environment by simultaneously hindering drug adsorption and metabolism [2]. All these limitations caused that, despite advanced biotechnology, Alzheimer’s disease (AD), a disorder of cognitive functions caused by nerve cell damage, is still incurable. Up to date, only seven drugs that delay or reduce its symptoms are available on the market. These include two monoclonal antibodies against specific forms of β -amyloid and five drugs with the activity of acetylcholinesterase inhibitors or NMDA receptor antagonists [2,3]. Moreover, limitation of drug–drug interactions in AD therapy, caused by patients frequent coexisting conditions such as hypertension, obesity, or type 2 diabetes mellitus, involves a continuous need for innovative therapeutic approaches [4]. Alzheimer’s disease onset is correlated to carrying at least one allele of the $\epsilon 4$ isoform of the apolipoprotein E coding gene [5]. *APOE4* is associated with the intraneuronal accumulation of β -amyloid and its constricted clearance, and it is also connected with weaker $A\beta$ phagocytosis, tau protein aggregate exacerbation, and impairment of lipid and glucose metabolism [6]. Therefore, targeting and modulating APOE has been considered in possible AD therapeutic strategies. This includes the use of the anti-*APOE4* short interfering RNA (siRNA) as a silencer of the defective gene. The major advantage of siRNA therapy is its high specificity, which makes it a promising alternative to small molecule drugs or proteins [7]. In the case of Alzheimer’s disease, a few molecular targets are aimed at as therapeutic options, e.g., $A\beta$ levels may be decreased by silencing the presenilin 1 or *BACE1* gene, and axonal regeneration may be induced by *ROCK2* silencing [8].

However, naked siRNA is not very efficient due to its instability, insufficient cell uptake, and off-target effects [9]. These limitations could be overcome by introducing formulation modifications based on viral and non-viral structures. The non-viral structures include a wide variety of liposomes, polymers, peptides, or inorganic compounds [10]. To date, six siRNA agents have been approved by the FDA. Five of them are conjugated with N-acetylgalactosamine (GalNAc), and one, Patisiran, used in polyneuropathy, is formulated as a lipid nanoparticle (LNP), proving the efficacy of the implemented modifications [11,12].

Among inorganic compounds that could be used as siRNA carriers are nanoparticles of gold (AuNPs). These cationic structures have a multitude of virtues, such as stability, low toxicity and size-to-volume ratio, which enable the binding and transporting of the desired molecules [13]. Their bioavailability, efficacy, and safety can be improved by various surface modifications, namely by cell-penetrating peptides (CPPs), poly(β -amino ester), or polyethylene glycol (PEG) [14].

Our previous research was focused on choosing optimal dendron generation and dendron/PEG ratio for PEG-modified AuNPs [15]. The aim was to obtain non-toxic and efficient nanocarriers, which are able to penetrate cells. Two gold nanoparticles, AuNP14a and AuNP14b with dendron/PEG ratios of 3:1 and 1:1, respectively, were marked as promising candidates. They were initially verified for their biosafety and ability to complex siRNA [16]. Their interactions with lipid membranes and selected serum proteins were also described [17]. In this work we focused on the properties of 14a and 14b as carriers for siRNA, testing uptake and the effects on internalized cells.

2. Materials and Methods

2.1. AuNPs and siRNA

Two pegylated gold nanoparticles, AuNP14a and AuNP14b, were synthesized and described in previous work [15]. Both AuNPs were decorated with a second generation of ammonium-terminated carbosilane dendrons and PEG fragments in different ratios.

AuNP14a contained a 3:1 ratio dendron/PEG while AuNP14b had a ratio of 1:1. AuNPs were synthesized in water by the reaction of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ with a mixture of two ligands containing a thiol moiety: (1) the cationic dendrons $\text{HSG}_2(\text{SNMe}^{3+})_4$ and (2) commercial PEG ligand $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, HS-PEG. NaBH_4 was used as a reducing agent. Their characteristics were described in Table 1.

Table 1. Characterization of tested AuNPs. ¹ Zeta potential (mV); ² diameter (nm) obtained by DLS; ³ Polydispersity index (PDI) obtained by DLS; ⁴ diameter obtained by TEM; ⁵ % organic matter obtained by TGA, corresponding with dendron and PEG.

AuNP	Solubility	Dendron/PEG Molar Ratio	¹ ZP [mV]	² d_z [nm]	³ PDI	⁴ d_n [nm]	⁵ %L
AuNP14a	water	3/1	+44.9	34.00	0.54	3.7	67.6
AuNP14b	water	1/1	+41.1	23.3	0.298	2.8	66.6

Gold nanoparticles were complexed with non-fluorescent or FITC-labeled siRNA coding ApoE (sense: 5'-GAUUACCUGCGCUGGGUGCUU-3'; antisense: 5'-PGCACCCAGCG CAGGUAUUCUU-3') purchased from Dharmacon Inc. (Lafayette, CO, USA). AuNPs/siRNA complexes were formed by mixing appropriate volumes of siRNA and AuNPs in PBS. The mixture was gently vortexed and incubated at room temperature for 20 min. Complex formation was proved by a series of biophysical experiments, including zeta potential and DLS measurements, agarose gel electrophoresis, and fluorescence polarization. Main characteristics are shown in Table 2.

Table 2. Characterization of tested AuNPs/siRNA. ¹ Concentration of siRNA; ² minimal concentration of AuNPs where complexed formation was observed; ³ zeta potential (mV); ⁴ diameter (nm) obtained by DLS; ⁵ polydispersity index (PDI) obtained by DLS.

Complex	¹ siRNA [μM]	² AuNP [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	³ ZP [mV]	⁴ d_z [nm]	⁵ PDI
AuNP14a/siRNA	1	40	+21.97	227.23	0.57
AuNP14b/siRNA	1	50	+7.97	161.53	0.219

Nanoparticle concentration selected for the complex formation was assessed in preliminary studies by biophysical experiments. A wide concentration range was checked to choose the optimal amount of AuNPs to form complexes and to see at which point they may be harmful.

2.2. Cell Lines

Human Brain Endothelial Cell (HBEC-5i) line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The cells were cultured on 1% gelatin-coated flasks in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12 (DMEM-F12) (Biowest, Nuaille, France) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin (P/S), Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hydrocortisone (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) at 37 °C, 5% CO_2 .

Human Brain Vascular Pericytes (HBVP) line was purchased from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA). The cells were cultured on flasks coated with 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Poly-L-Lysine (PLL) in a pericyte medium supplemented with FBS, pericyte growth supplement (PGS), and P/S (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C, 5% CO_2 .

Human astrocytes (HA) line was purchased from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA). The cells were cultured on flasks coated with 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Poly-L-Lysine

(PLL) in an astrocyte medium supplemented with FBS, astrocyte growth supplement (AGS), and P/S (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C, 5% CO₂.

2.3. Cytotoxicity

The cytotoxic effects of AuNPs and AuNP/siRNA complexes toward astrocytes and pericytes were assessed with an MTT assay. Cells were seeded on 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well and incubated under standard conditions. The following day, cells were treated with the tested compounds. After 24 h, 0.5 mg/mL MTT solution (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added to the cells and incubated for 3 h. Formazan crystals formed as a product of tetrazolium dye reduction were dissolved in DMSO (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) and measured for absorbance at the wavelengths $\lambda = 580$ nm and $\lambda = 720$ nm on a multiwell plate reader (BioTek PowerWave HT, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). The cell viability was calculated using the following formula:

$$\% \text{ viability} = (\text{As}/\text{Ac}) \times 100\%$$

where As—absorbance of treated cells, Ac—absorbance of control cells.

2.4. Genotoxicity

The DNA damage induced by the AuNPs/siRNA complexes in HBEC-5i cells was assessed using the comet assay. The HBEC-5i cell line was seeded on a 24-well plate at a density of 5×10^4 cells/well and collected after 24 h of incubation with nanoparticles and their complexes with siRNA. Next, the cells were collected, washed with PBS, and embedded in a 1% solution of low melting point (LMP) agarose (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). The suspension was set on the top of a microscope slide pre-coated with a normal melting point (NMP) agarose (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and left on ice to congeal. Prepared slides were immersed overnight at 4 °C in a lysis buffer (2.5 mol/L NaCl, 100 mm/L EDTA, 10 mmol/L Tris, and Triton X-100 1%). After 24 h, the slides were placed in a cold electrophoresis buffer (30 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA) for 20 min to allow DNA unwinding, then electrophoresis was conducted (17 V, 32 mA, 30 min). Slides were then washed 3× with distilled water and stained with 0.1% DAPI solution. Fluorescence imaging was conducted using a Zeiss Axio Scope A1 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany). A total of 50–75 randomly selected cell nuclei per slide were analyzed using the Lucia-Comet v. 7.6 software (Laboratory Imaging, Praha, Czech Republic).

2.5. Cellular Uptake

The internalization of AuNPs/siRNA complexes by HBEC-5i cells was evaluated using confocal microscopy and flow cytometry. The quantification of nanocomplexes was assessed by measuring fluorescence intensity via flow cytometry. Additionally, confocal microscopy was employed to verify the intracellular presence of the nanocomplexes.

For the confocal microscopy, cells were incubated with free siRNA and AuNP/siRNA complexes for 3 h or 24 h. HBEC-5i were seeded in a density of 1.5×10^4 cells/well on the glass bottom plates (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) and cultured under standard conditions. The next day, cells were treated with complexes. The cells were then fixed with 4% formaldehyde (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland). The samples were washed with PBS (Gibco™, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) and stained with Texas Red-X Phalloidin (40 diluted) (Invitrogen™, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) for 20 min and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Thermo Scientific™, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) at 0.5 µg/mL for

5 min. Samples were visualized using a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a 63×/1.40 objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany). The excitation and emission wavelengths were set as follows: 405 nm and 430–470 nm for DAPI, 489 nm and 500–530 nm for FITC™ 488, and 595 nm with 610–640 nm for Texas Red-X Phalloidin. Image analysis was performed using Leica LAS 2.0.215022 software.

Quantitative data was obtained by the flow cytometry technique. HBEC-5i cells were seeded on a 24-well plate at a density of 5×10^4 cells/well. The next day, cells were treated with complexes and incubated for 3 h or 24 h. The cells were then washed 2× with PBS and collected in round-bottom tubes. The fluorescence intensity of FITC-labeled siRNA was measured using a Becton Dickinson LSRII flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with excitation/emission wavelength set at 488/530 nm. Data was analyzed using FCSalyzer 0.9.22-alpha software.

2.6. Reactive Oxygen Species Formation

The level of reactive oxygen species (ROS) formed in HBEC-5i cells after AuNPs and AuNPs/siRNA treatment was measured using the fluorescence method. In this assay a 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) fluorescent probe was used (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). H2DCF-DA was internalized to cells by passive diffusion and degraded by membrane esterases to more polar DCFH. When ROS was present in the environment, DCFH was oxidated to fluorescent DCF.

HBEC-5i cells were seeded on black 96-well plates at a density of 1.5×10^4 cells/well and incubated under standard conditions. After 24 h, cells were treated with nanoparticles or complexes. ROS formation was assessed at 3 different incubation times, after 0.5 h, 3 h, and 24 h. Cells were then washed with PBS and incubated with an H2DCF-DA probe at the final concentration of 2 µmol/L for 15 min at 37 °C. Using the multiwell plate reader (BioTek PowerWave HT, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), fluorescence was measured at $\lambda_{ex} = 485$ nm and $\lambda_{em} = 530$ nm.

2.7. Mitochondrial Membrane Potential

The measurements of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were made using fluorescent probe JC-1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The dye can emit both green and red fluorescence depending on its form. When mitochondrial functions were impaired, the JC-1 stayed in the monomeric form, giving green fluorescence (filters 485/540 nm). Red fluorescence (filters 530/590 nm) was emitted by the JC-1 aggregates created by healthy cells. Thus, a high ratio of red to green fluorescence can be correlated to high polarization of the mitochondrial membrane.

HBEC-5i cells were seeded on black 96-well plates at a density of 1.5×10^4 cells/well and incubated under standard conditions. After 24 h, cells were treated with nanoparticles or complexes. The experiment was conducted at 3 different time points: after 0.5 h, 3 h, and 24 h. Cells were washed with PBS and incubated with the JC-1 solution at a final concentration of 5 µmol/L for 20 min at 37 °C. Fluorescence was measured on the multiwell plate reader (BioTek PowerWave HT, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at $\lambda_{ex} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm for monomers and $\lambda_{ex} = 528$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm for dimers.

2.8. Statistical Analysis

Statistical data and their graphical representations were prepared using GraphPad Prism 8.0.2 Software. The Shapiro–Wilk normality test was used to assess the Gaussian distribution for each experiment. Statistical significance was assumed as $\alpha = 0.05$, calcu-

lated with one-way ANOVA (cellular uptake), Kruskal–Wallis (comet assay), or Dunnett’s multiple comparison tests (ROS and mitochondrial activity assays, cytotoxicity tests).

3. Results

3.1. Complex Cellular Uptake

Complexes of both nanoparticles with siRNA were tested for their internalization abilities using quantitative flow cytometry. The uptake of AuNPs/siRNA was compared after 3 h and 24 h incubation with HBEC-5i cells. It was observed that in both time periods, siRNA was delivered to cells; however, longer incubation was conducive to more abundant internalization (Figure 1b,c). After 3 h, the uptake of complexes was already noticeable and fluctuated around 20%, and after 24 h, this value reached around 80%. These results corresponded to the qualitative confocal microscopy images, where fluorescently labeled siRNA was visible as a single form in short-time incubation slides and as thickset aggregates in 24 h slides (Figure 1a).

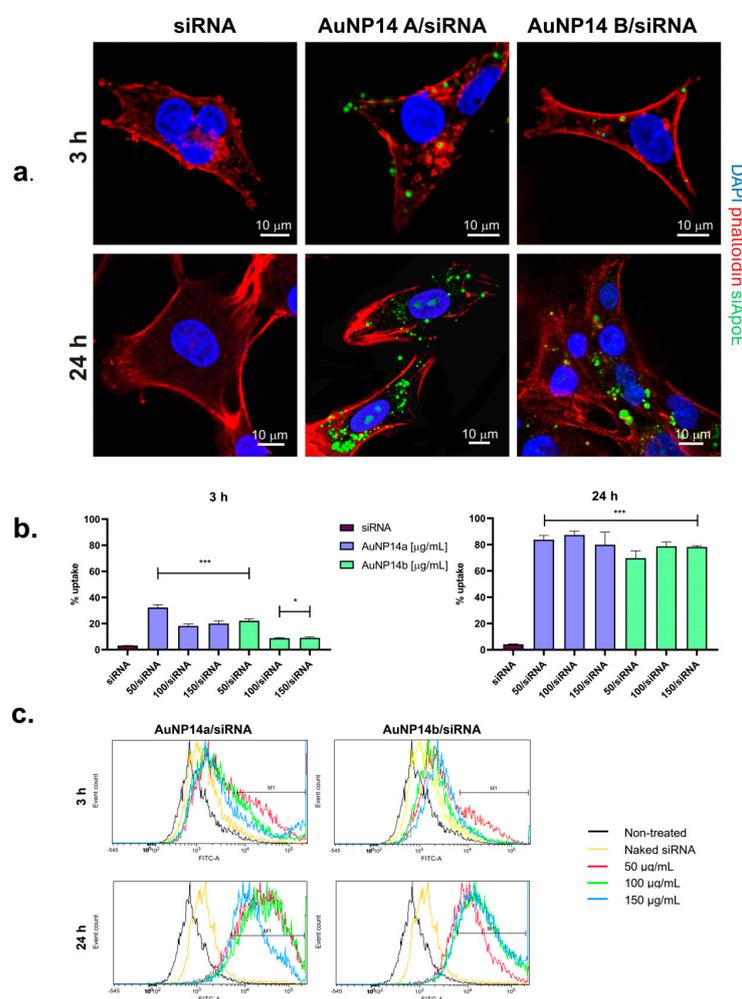


Figure 1. Cellular uptake of AuNPs/siRNA complexes. (a) Confocal microscopy images of HBEC-5i cells treated with tested complexes at 3 h and 24 h incubation times. Images represent one chosen concentration of nanoparticles (50 μg/mL). Complexes internalization was more visible after 24 h in case of both nanoparticles. (b) Graphs showing mean fluorescence values (MFI) of AuNPs/siRNA measured with flow cytometry. Results are compared with cells treated with naked siRNA. Obtained data is consistent with microscopy images. Values represent mean ± SD, * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$. (c) Flow cytometry histograms rendered using FCSalyzer software.

3.2. Genotoxicity

The alkaline comet assay was used to assess the cell nucleus damage after AuNPs and AuNPs/siRNA treatment. DNA disruption was shown as a percentage of the comet tail and corresponded to the leakage of genetic material outside the nucleus. Data was collected after 24 h incubation with tested compounds, and results were compared with the cells treated with 50 μM H_2O_2 that represented the positive control. Both tested nanoparticles proved to be less genotoxic when they were complexed with siRNA, showing a DNA disruption at levels below 10%, comparable with the negative control (Figure 2). AuNP14a, having more of a cationic load than AuNP14b (higher positively charged dendron to neutral PEG ratio), was more likely to cause DNA damage, particularly in higher concentrations. However, at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, where complexation and internalization both occur, both nanoparticles were safe for siRNA.

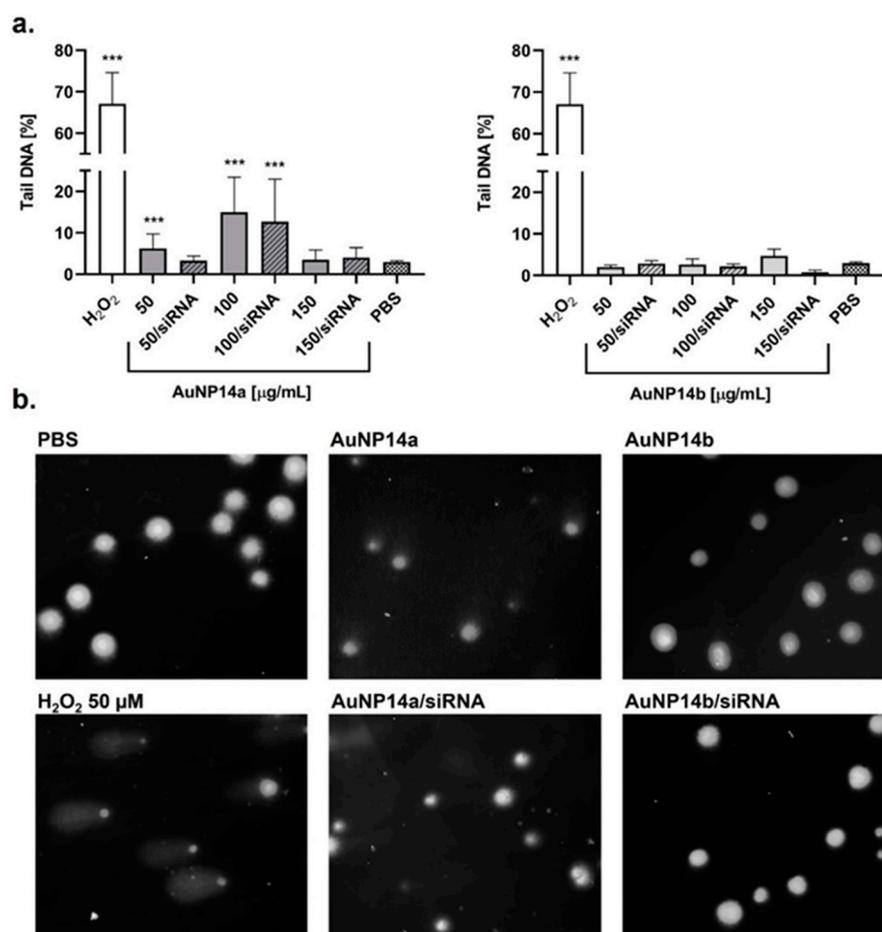


Figure 2. Genotoxic effect caused by AuNPs and AuNPs/siRNA in HBEC-5i cells. (a) Percentage of DNA damage in treated cells after 24 h incubation with tested compounds. Cells treated with 50 μM H_2O_2 for 15 min at 37 °C were a positive control. Results indicate that genotoxic effect was observed only when higher concentrations of AuNP14a were applied. Values shown as median \pm CI 95% from at least 50 nucleoloids per slide, *** $p < 0.01$. (b) Images taken with fluorescent microscope (20 \times magnification) showing nucleus of cells stained with DAPI after treatment with AuNPs and AuNPs/siRNA in chosen concentrations.

3.3. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membranes Potential Changes

Reactive oxygen species (ROS) are formed during normal metabolic processes, but their production is also linked with cell responses to different substances introduced to the organism. When this response is the excessive overproduction of ROS, it can lead to oxidative stress and cell disruption. High levels of ROS can alter the polarization of

mitochondrial membranes ($\Delta\Psi_m$), causing metabolic dysfunction, or apoptosis. Therefore, monitoring these two parameters could provide information about the cell response to a delivered compound.

For better understanding of these processes, ROS production and $\Delta\Psi_m$ at different time intervals (0.5 h, 3 h, and 24 h) were measured. In general, it was observed that the ROS level increased rapidly after the administration of tested compounds and stabilized in time (Figure 3). This dependency was notably visible in the case of the treatment with complexes, where any ROS formation caused by a lower dosage was re-established to basic levels after 3 h and was stable after 24 h (Figure 3b). A similar pattern applied to changes in the mitochondrial membrane potential. Alterations in membrane polarization were most evident after a 3 h incubation but only increased or decreased an insignificant amount after 24 h nanoparticle or complex treatment (Figure 3c,d).

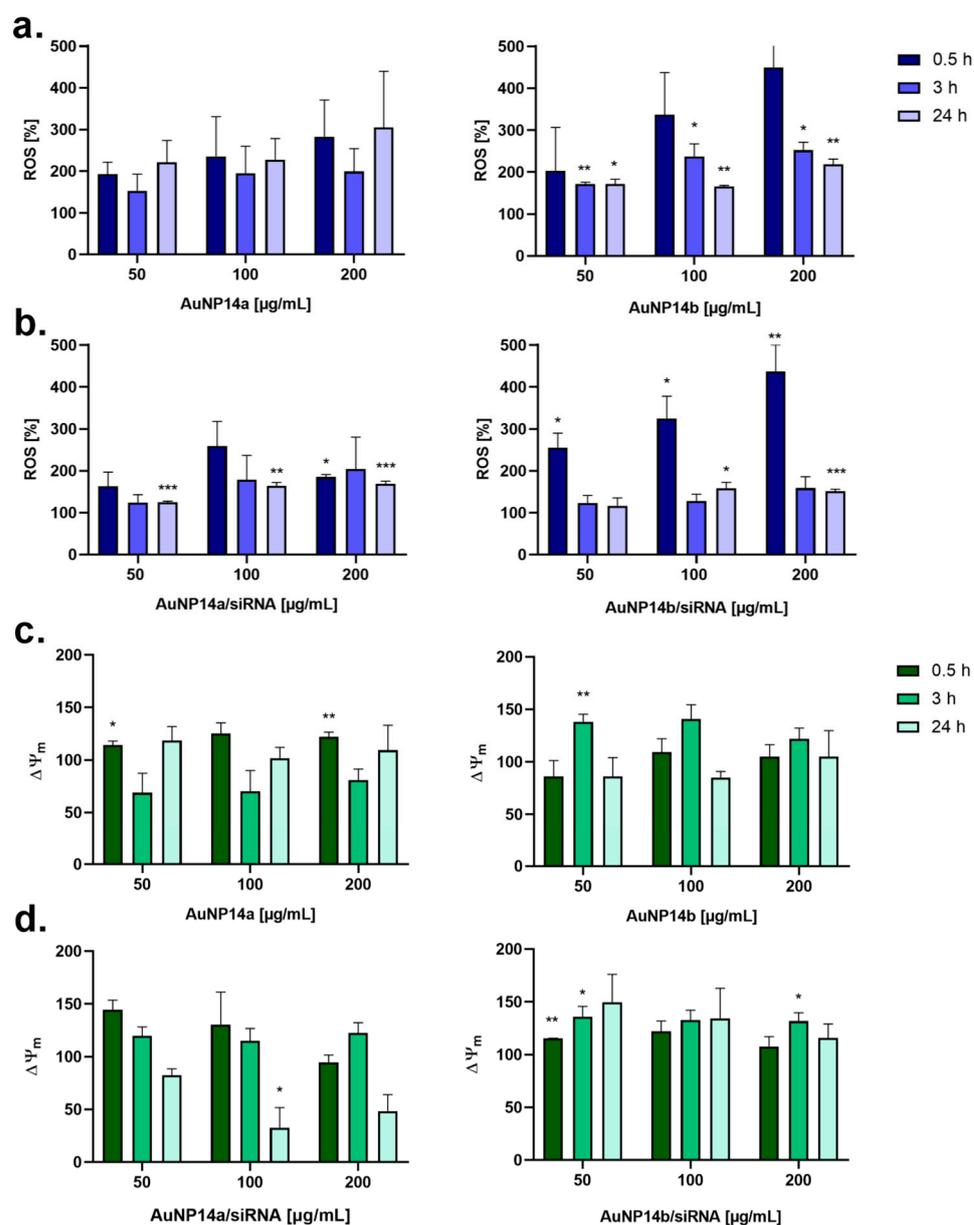


Figure 3. Changes in reactive oxygen species level (a,b) and mitochondrial membrane polarization (c,d) in HBEC-5i cells after AuNPs and AuNPs/siRNA administration. Graphs show mean \pm SD, $n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.01$. Untreated cells (control) are considered as 100% ROS production.

3.4. AuNPs Cytotoxicity Towards Human Brain Vascular Pericytes and Astrocytes

The cytotoxic effects of AuNPs and their complexes were previously described for HBEC-5i cells [13]. However, it was decided to extend the cytotoxicity analysis for further research concerning BBB interactions. The viability of human astrocytes (HA) and human brain vascular pericytes (HBVP) after 24 h incubation with AuNPs and AuNPs/siRNA using the MTT assay was tested (Figure 4). AuNP14a alone caused the most significant cytotoxic effect in both cell lines in a concentration-dependent manner, whereas complexation with siRNA moderated the effect, especially in lower concentrations. AuNP14b seemed to be more harmful in lower doses, particularly for HBVP cells. Contrastingly, the highest concentrations of both AuNP14b and its complex were safe for tested cell lines.

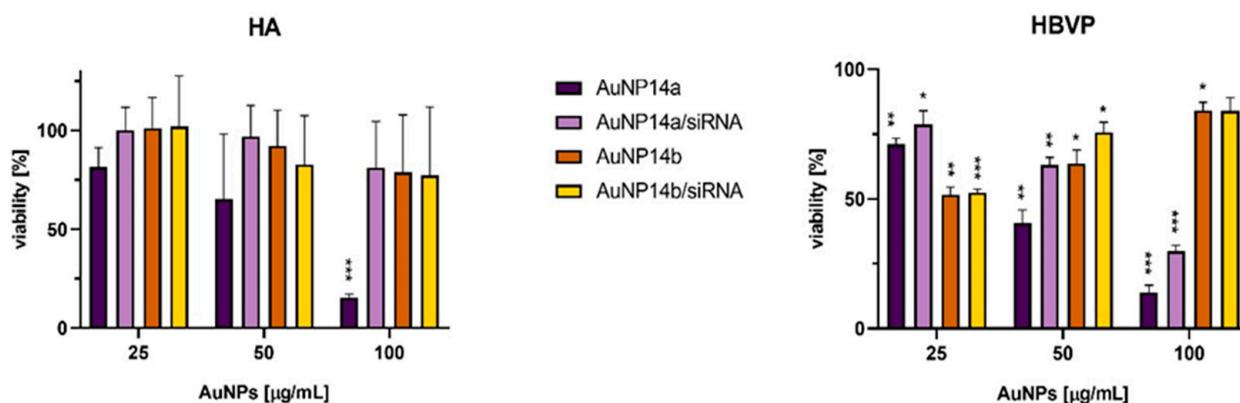


Figure 4. Viability of HA and HBVP after 24 h incubation with AuNPs and their complexes with siRNA. Non-treated cells were taken as a 100% viability control. Graphs show mean \pm SD, $n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.01$.

4. Discussion

The effective delivery of drugs in the management of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, still remains a big challenge for researchers and clinicians [18]. The scientists are examining different approaches for finding the safest and most beneficial solution by analyzing invasive (e.g., intracerebral injections) and non-invasive (e.g., carrier-drug conjugation) routes of administration [19]. This study focused on pegylated gold nanoparticles, which are non-invasive colloidal nanocarriers that could be used as delivery agents of short-interfering RNA targeted at silencing the apolipoprotein E ϵ 4 gene related to Alzheimer's disease onset.

In our previous research, complex formation and cytotoxic effects for epithelial cells were defined. It was proved that lower concentrations of tested AuNPs are safe and may be further analyzed [16]. In this article the ability of these structures to internalize cells was shown. Quantitative data obtained with flow cytometry and supported by the visualization with confocal laser scanning microscopy showed an uptake of AuNPs/siRNA by the HBEC-5i cell line. While internalization was noticeable after 3 h incubation, the biggest effect was seen after 24 h, when cells were full of fluorescently labeled siRNA and flow cytometry analysis indicated around an 80% uptake. Observation of the fluorescence peaks on flow cytometry diagrams (Figure 1c) supported the chosen complex concentrations, showing the highest FITC intensity for the lower dose of AuNP14a (50 μ g/mL) and the higher dose of AuNP14b (100 μ g/mL). Cationic nanoparticles, due to their biophysical properties, are, in general, excellent delivery systems and materials that complex negatively charged nucleic acids. Taschauer et al. compared the uptake of both positively and negatively charged auropolypexes, proving a significantly lower internalization of the latter [20]. Interestingly, nucleic acid delivery systems with a gold nanoparticle core underwent a

human phase 0 study with positive effects, where sufficient uptake levels and confirmed biosafety were fundamental [21]. Analyses of microscopy images suggest that complexes did not enter the nucleus but accumulated in the cytoplasm, where the actual gene silencing takes place [22]. Avoiding nucleus internalization is a desirable property of nanoparticles for their effectiveness but also for minimizing their genotoxic potential [23].

Genotoxicity testing of nanomaterials is highly recommended during uptake studies. It is important to correlate the obtained data with cytotoxicity results to identify any true exogenous DNA damage, apart from any low level of DNA disruption occurring in the early stages of apoptosis [24]. In order to confirm that the tested compounds have no adverse effects on genetic material and the cell nucleus, the alkaline comet assay was performed. This method not only allows us to visualize the level of DNA damage but also to present the data in figures by using dedicated software. After 24 h incubation of cells with AuNPs, we observed that AuNP14a created some genotoxic effect when not complexed with siRNA (Figure 2). At the highest concentrations, the level of DNA damage decreased, but that phenomenon was aligned with the cytotoxicity assay and, as mentioned above, could have been a sign of early apoptosis [16]. Fraga et al. presumed that the failure to induce genotoxicity by higher AuNPs concentration may also be the result of possible nanoparticle aggregation [25]. However, complexation with siRNA mitigated the genotoxic effect of AuNP14a, and the complex was proven to be safe for genetic material. AuNP14b caused no significant genotoxic effect when compared to the control, regardless of whether it was administrated as a complex or not. The genotoxicity of gold nanoparticles has been previously described as being strongly dependent on their biophysical properties, mainly size. The size of tested AuNP14a and AuNP14b is 34 nm and 23.3 nm, respectively. That may be an important advantage compared to other gold nanoparticles, due to the fact that some researchers have indicated that smaller NPs are prone to being more genotoxic [26–28]. Bigger AuNP14a particles appeared to cause more damage in the DNA strands than smaller AuNP14b; therefore, we confronted obtained results with reactive oxygen species formation. Any triggering of genotoxicity by nanoparticles could be described by primary and secondary mechanisms. While the primary mechanism is related to the direct interaction with DNA and ROS formation, the secondary is associated with evoking innate immunity cells and inflammatory reactions leading to free radical production [29].

ROS accumulation in HBEC-5i cells was measured using the H2DCF-DA probe at three different time points: after 0.5 h, 3 h, and 24 h. Since ROS production can cause mitochondrial damage, the obtained results were interpreted in juxtaposition to mitochondrial membrane polarization changes ($\Delta\Psi_m$) [30]. In general, both nanoparticles were less prone to induce reactive species production when complexed with siRNA, although according to the literature, AuNPs with PEG or PEI generated oxidative stress at lower levels than those without functionalization [31]. AuNP14a caused composite ROS formation, with the results equivocal and difficult to interpret (Figure 3). However, polarization oxidative stress conditions were verified after comparing the results to changes in mitochondrial membrane polarization, where AuNP14a prompted a hyperpolarization of mitochondrial membranes after 0.5 h of incubation and visible membrane depolarization within the next 3 h. The most rapid increase in ROS level was observed for AuNP14b/siRNA, where after 0.5 h the percentage of oxidative forms rose 3–4 \times , afterward stabilizing to a neutral level. Simultaneously, the mitochondrial membrane potential was the nearest to its natural state shortly after the complex administration and increased in time, suggesting an adaptive response at first, including SOD enzyme activation dealing with stress conditions, and subsequently enhanced mitochondrial activity [32]. The AuNP14a/siRNA generated ROS production in a similar manner as AuNP14b, but the mitochondrial membrane polarization

alterations were inverted and decreased over time, which could indicate mitochondrial damage. AuNPs can cause oxidative stress not only by triggering mitochondrial impairing or DNA disruption, but it has also been seen that gold nanoparticles are able to catalyze electron donors such as antioxidants, consequently leading to ROS formation [33]. This mechanism could be useful while testing AuNPs as antibacterial agents [34]. Taking everything into consideration, gold nanoparticles described in the literature could cause oxidative stress with insignificant changes in cell physiology or could be used as radiosensitization in tumors, where redox potential is crucial and the obtained effect is mainly dependent on the AuNPs coating and their size [35,36].

In our previous work, the cytotoxic effect of tested compounds toward the epithelial cell line HBEC-5i has been described. Here, we tested whether AuNPs and their complexes were safe for two other cell lines: human astrocytes (HA) and human brain vascular pericytes (HBVP), as these are used in the standard triculture BBB in vitro model [37,38]. It was observed that both nanoparticles were less cytotoxic when complexed with siRNA, which remains consistent with the HBEC-5i results and genotoxicity analysis. This correlation could have been the effect of surface charge equalization between cationic AuNPs and negatively charged siRNA [39]. Smaller AuNP14b particles decreased the viability of both cell lines more noticeably than larger AuNP14a particles when applied in smaller concentrations. However, this result agreed with the conclusions of other researchers and could be explained by the smaller particle aggregation in cytoplasm, leading to endosomal or lysosomal entrapment and pH alteration induced toxicity [40,41].

These results provided the foundation for further analysis of AuNPs as siRNA carriers. Firstly, they present new information about cells response to tested compounds. Moreover, oxidative stress, mitochondrial function loss, or impaired cellular uptake play a crucial role in the pathology of neurodegenerative diseases; thus, it is crucial to check whether tested nanocarriers will enhance or reduce these effects [42]. Gold nanoparticles are widely investigated as siRNA delivery vehicles by many researchers. It was proved that their multiple modification options, size variety, or synthesis techniques may provide new features of perfect nanocarriers. AuNP14a and AuNP14b described in this work meet the requirements of high quality gold nanoparticles, such as biocompatibility and effective cellular uptake, which makes them promising candidates for gene material delivery systems. However, it is crucial to emphasize that in vitro models, while valuable, cannot fully replicate the complexity of in vivo conditions. Therefore, any future prospect of research must include BBB triculture model experiments and in vivo tests, as these methods may help us to explain the lack of current knowledge.

5. Conclusions

Our studies showed that AuNP14a/siRNA and AuNP14b/siRNA were able to internalize HBEC-5i cells in a concentration- and time-dependent manner. Additionally, although an increase in the ROS level after AuNPs administration was observed in both complexes, there was no DNA damage seen. By correlating free radical production to changes in the mitochondrial membrane polarization, it was concluded that any stress condition was an adaptive reaction to the nanoparticles and stabilized within 24 h. Despite the fact that AuNPs/siRNA were found to be safe for endothelial cells, astrocytes, and pericytes (the cell lines forming the BBB), there is a necessity for more developed models for testing these complexes, such as triculture experiments and in vivo methods. Future perspectives of our studies include testing BBB model permeability and immunological response for AuNPs/siRNA, along with biodistribution in vivo tests, supported by behavior assessment. It is crucial considering many clinical challenges, such as PEG-induced rapid clearance or hypersensitivity reactions caused by anti-PEG antibody activation [43]. The questions of

gold hypothetical accumulation in the tissues or manufacturing reproducibility should also be addressed to provide high quality of the tested compounds [44]. Comprehensive data obtained from any next stage will show if AuNP14a and AuNP14b are the efficient and harmless perfect nanocarriers.

Author Contributions: E.O.: Investigation, visualization, methodology, formal analysis, software, and writing—original draft; M.H.: investigation and methodology; S.M.: investigation and visualization; S.Z.: investigation, methodology, and software; K.M.: methodology and writing—review and editing; J.S.-N.: sources, funding acquisition, and writing—review and editing; R.G.: sources, funding acquisition, and writing—review and editing; F.J.D.I.M.: sources, funding acquisition, writing—review and editing; M.B.: funding acquisition, and writing—review and editing; M.I.: conceptualization, data curation, supervision, and writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grant 2018/30/Z/NZ1/00911 of the Project “NanoTendo” financed by the National Science Centre, Poland under the M-ERA.NET 2, which has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program. Work was co-supported by UAH (ref. 2024/00300/001-GP2024-02) and by CIBER (Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine), Instituto de Salud Carlos III, MICIU European Regional Development Fund (ref. CIBER-BBN, CB06/01/1021).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: Graphical abstract was created in BioRender. Elżbieta Okła. (2025). <https://app.biorender.com/profile/template/details/t-68b08999c82e69cd3904108b-complex-internalization-in-human-brain-endothelial-cells-usi>.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AuNPs	Gold nanoparticles
BACE1	Beta-secretase 1
BBB	Blood–brain barrier
BCB	Blood–cerebrospinal fluid barrier
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FDA	Food and Drug Administration
GalNAc	N-acetylgalactosamine
HA	Human astrocytes
HBVP	Human brain vascular pericytes
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PEG	Polyethylene glycol
ROCK2	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2
ROS	Reactive oxygen species

References

- Steinmetz, J.D.; Seeher, K.M.; Schiess, N.; Nichols, E.; Cao, B.; Servili, C.; Cavallera, V.; Cousin, E.; Hagins, H.; E Moberg, M.; et al. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Neurol.* **2024**, *23*, 344–381. [CrossRef]

2. Guillama Barroso, G.; Narayan, M.; Alvarado, M.; Armendariz, I.; Bernal, J.; Carabaza, X.; Chavez, S.; Cruz, P.; Escalante, V.; Viel, S.; et al. Nanocarriers as Potential Drug Delivery Candidates for Overcoming the Blood-Brain Barrier: Challenges and Possibilities. *ACS Omega* **2020**, *5*, 12583–12595. [[CrossRef](#)]
3. Fattahi, F.; Asadi, M.R.; Abed, S.; Kouchakali, G.; Kazemi, M.; Mansoori Derakhshan, S.; Shekari Khaniani, M. Blood-based microRNAs as the potential biomarkers for Alzheimer's disease: Evidence from a systematic review. *Metab. Brain Dis.* **2024**, *40*, 44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cacabelos, R.; Naidoo, V.; Martínez-Iglesias, O.; Corzo, L.; Cacabelos, N.; Pego, R.; Carril, J.C. Personalized Management and Treatment of Alzheimer's Disease. *Life* **2022**, *12*, 460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Scheltens, P.; De Strooper, B.; Kivipelto, M.; Holstege, H.; Chételat, G.; Teunissen, C.E.; Cummings, J.; van der Flier, W.M. Alzheimer's disease. *Lancet* **2021**, *397*, 1577–1590. [[CrossRef](#)]
6. Yamazaki, Y.; Zhao, N.; Caulfield, T.R.; Liu, C.C.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Pathobiology and targeting strategies. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 501–518. [[CrossRef](#)]
7. Jin, J.; Zhang, H.; Lu, Q.; Tian, L.; Yao, S.; Lai, F.; Liang, Y.; Liu, C.; Lu, Y.; Ren, W.; et al. Nanocarrier-mediated siRNA delivery: A new approach for the treatment of traumatic brain injury-related Alzheimer's disease. *Neural Regen. Res.* **2025**, *20*, 2538–2555. [[CrossRef](#)]
8. Amiri, A.; Barreto, G.; Sathyapalan, T.; Sahebkar, A. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net siRNA Therapeutics: Future Promise for Neurodegenerative Diseases. *Curr. Neuropharmacol.* **2021**, *19*, 1896–1911. [[CrossRef](#)]
9. Cortez-Jugo, C.; Masoumi, S.; Chan, P.P.Y.; Friend, J.; Yeo, L. Nebulization of siRNA for inhalation therapy based on a microfluidic surface acoustic wave platform. *Ultrason. Sonochem.* **2022**, *88*, 106088. [[CrossRef](#)]
10. Ali Zaidi, S.S.; Fatima, F.; Ali Zaidi, S.A.; Zhou, D.; Deng, W.; Liu, S. Engineering siRNA therapeutics: Challenges and strategies. *J. Nanobiotechnol.* **2023**, *21*, 381. [[CrossRef](#)]
11. Pérez-Carrión, M.D.; Posadas, I.; Ceña, V. Nanoparticles and siRNA: A new era in therapeutics? *Pharmacol. Res.* **2024**, *201*, 107102. [[CrossRef](#)]
12. Anthony, K. RNA-based therapeutics for neurological diseases. *RNA Biol.* **2022**, *19*, 176–190. [[CrossRef](#)]
13. Graczyk, A.; Pawlowska, R.; Chworos, A. Gold Nanoparticles as Carriers for Functional RNA Nanostructures. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32*, 1667–1674. [[CrossRef](#)]
14. Moazzam, M.; Zhang, M.; Hussain, A.; Yu, X.; Huang, J.; Huang, Y. The landscape of nanoparticle-based siRNA delivery and therapeutic development. *Mol. Ther.* **2024**, *32*, 284–312. [[CrossRef](#)]
15. Barrios-Gumiel, A.; Sánchez-Nieves, J.; Pedziwiatr-Werbicka, E.; Abashkin, V.; Shcharbina, N.; Shcharbin, D.; Glińska, S.; Ciepluch, K.; Kuc-Ciepluch, D.; de la Mata, F.J.; et al. Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2020**, *573*, 118867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Okła, E.; Białecki, P.; Kędzierska, M.; Pedziwiatr-Werbicka, E.; Miłowska, K.; Takvor, S.; Gómez, R.; de la Mata, F.J.; Bryszewska, M.; Ionov, M. Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6638. [[CrossRef](#)]
17. Okła, E.; Michlewska, S.; Buczkowski, A.; Zawadzki, S.; Miłowska, K.; Sánchez-Nieves, J.; Gómez, R.; de la Mata, F.J.; Bryszewska, M.; Blasiak, J.; et al. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 24408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Almutary, A.G.; Chauhan, P.; Baldaniya, L.; Menon, S.V.; Kumar, M.R.; Chaturvedi, B.; Sharma, N.; Chauhan, A.S.; Abomughaid, M.M.; Kumar Jha, N.; et al. Overcoming challenges in the design of drug delivery systems targeting the central nervous system. *Nanomedicine* **2024**, *20*, 5–8. [[CrossRef](#)]
19. Markowicz-Piasecka, M.; Darlak, P.; Markiewicz, A.; Sikora, J.; Adla, S.K.; Bagina, S.; Huttunen, K.M. Current approaches to facilitate improved drug delivery to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2022**, *181*, 249–262. [[CrossRef](#)]
20. Taschauer, A.; Polzer, W.; Pöschl, S.; Metz, S.; Tepe, N.; Decker, S.; Cyran, N.; Scholda, J.; Maier, J.; Bloß, H.; et al. Combined Chemisorption and Complexation Generate siRNA Nanocarriers with Biophysics Optimized for Efficient Gene Knockdown and Air–Blood Barrier Crossing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 30095–30111. [[CrossRef](#)]
21. Kumthekar, P.; Ko, C.H.; Paunesku, T.; Dixit, K.; Sonabend, A.M.; Bloch, O.; Tate, M.; Schwartz, M.; Zuckerman, L.; Lezon, R.; et al. A first-in-human phase 0 clinical study of RNA interference-based Spherical Nucleic Acids in patients with recurrent Glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabb3945. [[CrossRef](#)]
22. Artiga, Á.; Serrano-Sevilla, I.; De Matteis, L.; Mitchell, S.G.; De La Fuente, J.M. Current status and future perspectives of gold nanoparticle vectors for siRNA delivery. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 876–896. [[CrossRef](#)]
23. Rodríguez-León, E.; Rodríguez-Vázquez, B.E.; Martínez-Higuera, A.; Rodríguez-Beas, C.; Larios-Rodríguez, E.; Navarro, R.E.; López-Esparza, R.; Iñiguez-Palomares, R.A. Synthesis of Gold Nanoparticles Using Mimosa tenuiflora Extract, Assessments of Cytotoxicity, Cellular Uptake, and Catalysis. *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, *14*, 334. [[CrossRef](#)]

24. El Yamani, N.; Rundén-Pran, E.; Collins, A.R.; Longhin, E.M.; Elje, E.; Hoet, P.; Vrček, I.V.; Doak, S.H.; Fessard, V.; Dusinska, M. The miniaturized enzyme-modified comet assay for genotoxicity testing of nanomaterials. *Front. Toxicol.* **2022**, *4*, 986318. [[CrossRef](#)]
25. Fraga, S.; Faria, H.; Soares, M.E.; Duarte, J.A.; Soares, L.; Pereira, E.; Costa-Pereira, C.; Teixeira, J.P.; de Lourdes Bastos, M.; Carmo, H. Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. *J. Appl. Toxicol.* **2013**, *33*, 1111–1119. [[CrossRef](#)]
26. Ávalos, A.; Haza, A.I.; Mateo, D.; Morales, P. In vitro and in vivo genotoxicity assessment of gold nanoparticles of different sizes by comet and SMART assays. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *120*, 81–88. [[CrossRef](#)]
27. Xia, Q.; Li, H.; Liu, Y.; Zhang, S.; Feng, Q.; Xiao, K. The effect of particle size on the genotoxicity of gold nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2017**, *105*, 710–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lebedová, J.; Hedberg, Y.S.; Odnevall Wallinder, I.; Karlsson, H.L. Size-dependent genotoxicity of silver, gold and platinum nanoparticles studied using the mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis* **2018**, *33*, 77–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Shukla, R.K.; Badiye, A.; Vajpayee, K.; Kapoor, N. Genotoxic Potential of Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 728250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lo, C.-Y.; Tsai, S.-W.; Niu, H.; Chen, F.-H.; Hwang, H.-C.; Chao, T.-C.; Hsiao, I.-T.; Liaw, J.-W. Gold-Nanoparticles-Enhanced Production of Reactive Oxygen Species in Cells at Spread-Out Bragg Peak under Proton Beam Radiation. *ACS Omega* **2023**, *8*, 17922–17931. [[CrossRef](#)]
31. Ozcicek, I.; Aysit, N.; Cakici, C.; Aydeger, A. The effects of surface functionality and size of gold nanoparticles on neuronal toxicity, apoptosis, ROS production and cellular/suborgan biodistribution. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *128*, 112308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Juan, C.A.; de la Lastra, J.M.P.; Plou, F.J.; Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4642. [[CrossRef](#)]
33. Shcherbakov, V.; Denisov, S.A.; Mostafavi, M. A mechanistic study of gold nanoparticles catalysis of O₂ reduction by ascorbate and hydroethidine, investigating reactive oxygen species reactivity. *RSC Adv.* **2023**, *13*, 8557–8563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhao, S.; Wang, D.; Zhou, Q.; Wang, B.; Tong, Z.; Tian, H.; Li, J.; Zhang, Y. Nanozyme-based inulin@nanogold for adhesive and antibacterial agent with enhanced biosafety. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *262*, 129207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. May, S.; Hirsch, C.; Rippl, A.; Bohmer, N.; Kaiser, J.-P.; Diener, L.; Wichser, A.; Bürkle, A.; Wick, P. Transient DNA damage following exposure to gold nanoparticles. *Nanoscale* **2018**, *10*, 15723–15735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Meesaragandla, B.; Komaragiri, Y.; Schlüter, R.; Otto, O.; Delcea, M. The impact of cell culture media on the interaction of biopolymer-functionalized gold nanoparticles with cells: Mechanical and toxicological properties. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 16643. [[CrossRef](#)]
37. Knipp, G.T.; E Lubin, K. Design of experiment based optimization of an in vitro direct contact triculture blood brain barrier model for permeability screening. *Pharm. Pharmacol. Int. J.* **2021**, *9*, 143–158. [[CrossRef](#)]
38. Stone, N.L.; England, T.J.; O’Sullivan, S.E. A Novel Transwell Blood Brain Barrier Model Using Primary Human Cells. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 230. [[CrossRef](#)]
39. Kus-Liśkiewicz, M.; Fickers, P.; Ben Tahar, I. Biocompatibility and cytotoxicity of gold nanoparticles: Recent advances in methodologies and regulations. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10952. [[CrossRef](#)]
40. Gran, E.R.; Bertorelle, F.; Fakhouri, H.; Antoine, R.; Bakulić, M.P.; Maršić, Ž.S.; Bonačić-Koutecký, V.; Blain, M.; Antel, J.; Maysinger, D. Size and ligand effects of gold nanoclusters in alteration of organellar state and translocation of transcription factors in human primary astrocytes. *Nanoscale* **2021**, *13*, 3173–3183. [[CrossRef](#)]
41. Xia, Q.; Huang, J.; Feng, Q.; Chen, X.; Liu, X.; Li, X.; Zhang, T.; Xiao, S.; Li, H.; Zhong, Z.; et al. Size- and cell type-dependent cellular uptake, cytotoxicity and in vivo distribution of gold nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 6957–6970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Rekatsina, M.; Paladini, A.; Piroli, A.; Zis, P.; Pergolizzi, J.V.; Varrassi, G. Pathophysiology and Therapeutic Perspectives of Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review. *Adv. Ther.* **2020**, *37*, 113–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chen, B.-M.; Cheng, T.-L.; Roffler, S.R. Polyethylene Glycol Immunogenicity: Theoretical, Clinical, and Practical Aspects of Anti-Polyethylene Glycol Antibodies. *ACS Nano* **2021**, *15*, 14022–14048. [[CrossRef](#)]
44. Zhang, R.; Kiessling, F.; Lammers, T.; Pallares, R.M. Clinical translation of gold nanoparticles. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2023**, *13*, 378–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

AKADEMIA MAZOWIECKA W PŁOCKU
Collegium Medicum, Wydział Lekarski
Pl. Dąbrowskiego 2, 09-402 Płock
e-mail.: janusz.blasiak@mazowiecka.edu.pl

Prof. dr Janusz Błasiak

Łódź, dnia 29.09.25

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

Okła E., Michlewska S., Buczkowski A., Zawadzki S., Mitowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., **Błasiak J.**, Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, obejmował:

- pomoc w analizie otrzymanych danych
- współtworzenie i korekta manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 6%.



.....

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica
Facultad de Farmacia
Alcalá de Henares, Spain
e-mail.: samuel.takvor@uah.es

Samuel Takvor Mena

Alcalá de Henares, September 22nd, 2025

Statement of contribution

I am co-author of following publication:

Okła E., Biátecki P., Kędzierska M., Pędziwiatr-Werbicka E., Miłowska K., **Takvor S.**, Gómez R., de la Mata FJ., Bryszewska M., Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, I participated in:

- Synthesis of Gold nanoparticles

I declare my overall contribution for 5%.

Firmado por TAKVOR MENA SAMUEL -
***0388** el día 22/09/2025 con
un certificado emitido por AC
FNMT Usuarios

.....

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica
Facultad de Farmacia
Alcalá de Henares, Spain
e-mail.: javier.sancheznieves@uah.es

Prof. Javier Sánchez-Nieves

Alcalá de Henares, date september 22nd 2025

Statement of contribution

I am co-author of following publications:

1. Okła E., Michlewska S., Buczkowski A., Zawadzki S., Miłowska K., **Sánchez-Nieves J.**, Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, I participated in:

- supervision of nanoparticles synthesis
- substantive consultation

I declare my overall contribution for 5%.

2. Okła E., Hotota M., Michlewska S., Zawadzki S., Miłowska K., **Sánchez-Nieves J.**, Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. Biomedicines 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108, I participated in:

- supervision of nanoparticles synthesis
- substantive consultation

I declare my overall contribution for 5%.

Javier Sánchez-
Nieves
Fernández

Firmado digitalmente
por Javier Sánchez-
Nieves Fernández
Fecha: 2025.09.22
14:42:40 +02'00'

.....



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica
Facultad de Farmacia
Alcalá de Henares, Spain
e-mail.: rafael.gomez@uah.es

Prof. Rafael Gómez Ramírez

Alcalá de Henares, September 23th, 2025

Statement of contribution

I am co-author of following publications:

1. Okła E., Biatecki P., Kędzińska M., Pędziwiatr-Werbicka, E., Miłowska, K., Takvor S., **Gómez R.**, de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, I participated in:

- supervision of the nanoparticles synthesis
- substantive consultation and manuscript edition

I declare my overall contribution for 5%.

2. Okła E., Michlewska S., Buczkowski A., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., **Gómez R.**, de la Mata F. J., Bryszewska M., Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, I participated in:

- supervision of the nanoparticles synthesis
- substantive consultation

I declare my overall contribution for 5%.

3. Okła E., Hołota M., Michlewska S., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., **Gómez R.**, de la Mata F. J., Bryszewska M., Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. Biomedicines 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108, I participated in:

- supervision of the nanoparticles synthesis
- substantive consultation

I declare my overall contribution for 5%.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica
Facultad de Farmacia
Alcalá de Henares, Spain
e-mail.: javier.delamata@uah.es

Prof. Francisco Javier de la Mata

Alcalá de Henares, Sept, 22, 2025.

Statement of contribution

I am co-author of following publications:

1. Okła E., Biłatecki, P., Kędzierska, M., Pędziwiatr-Werbicka, E., Miłowska, K., Takvor, S., Gómez R., **de la Mata F.J.**, Bryszewska M., Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, I participated in:

- founding acquisition
- substantive consultation and manuscript edition

I declare my overall contribution for 5%.

2. Okła E., Michlewska S., Buczkowski A., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., **de la Mata F. J.**, Bryszewska M., Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, I participated in:

- founding acquisition
- substantive consultation and manuscript edition

I declare my overall contribution for 5%.

3. Okła E., Hołota M., Michlewska S., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., **de la Mata F. J.**, Bryszewska M., Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. Biomedicine 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicine13092108, I participated in:

- founding acquisition
- substantive consultation and manuscript edition

I declare my overall contribution for 5%.

DE LA MATA DE LA
MATA FRANCISCO
JAVIER - DNI
08969382A

Firmado digitalmente por DE LA
MATA DE LA MATA FRANCISCO
JAVIER - DNI 08969382A
Fecha: 2025.09.22 15:26:58 +02'00'

Dr Marta Kędzierska

Łódź, dnia 22/09/2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

Okta E., Białecki P., Kędzierska M., Pędziwiatr-Werbicka E., Miłowska K., Takvor S., Gómez R., de la Mata FJ., Bryszewska M., Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, obejmował:

- wykonanie części badań komórkowych
- wykonanie pomiarów polaryzacji fluorescencji
- analizę otrzymanych danych

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%.

dr Marta Kędzierska

UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail.: maria.bryszewska@biol.uni.lodz.pl

Prof. dr hab. Maria Bryszewska

Łódź, dnia 23.09.2025r.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Okła E., Biatecki P., Kędzierska M., Pędziwiatr-Werbicka E., Miłowska K., Takvor S., Gómez R., de la Mata F.J., **Bryszewska M.**, Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, obejmował:

- pozyskanie finansowania do badań uwzględnionych w pracy,
- korektę ostatecznej wersji manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 3%.

2. Okła E., Michlewska S., Buczkowski A., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., **Bryszewska M.**, Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, obejmował:

- pozyskanie finansowania do badań uwzględnionych w pracy,
- korektę ostatecznej wersji manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 3%.

3. Okła E., Hołota M., Michlewska S., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., **Bryszewska M.**, Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. Biomedicines 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108, obejmował:

- pozyskanie finansowania do badań uwzględnionych w pracy,
- korektę ostatecznej wersji manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 3%.



UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail.: katarzyna.milowska@biol.uni.lodz.pl

dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ

Łódź, dnia 23.09.2025v

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Okła E., Białecki P., Kędzierska M., Pędziwiatr-Werbicka E., **Miłowska K.**, Takvor S., Gómez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, obejmował:

- opracowanie części eksperymentów,
- współtworzenie i edycję ostatecznej wersji manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%.

2. Okła E., Michlewska S., Buczkowski A., Zawadzki S., **Miłowska K.**, Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, obejmował:

- opracowanie części eksperymentów,
- współtworzenie i edycję ostatecznej wersji manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 3%.

3. Okła E., Hołota M., Michlewska S., Zawadzki S., **Miłowska K.**, Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. Biomedicines 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108, obejmował:

- opracowanie części eksperymentów,
- współtworzenie i edycję ostatecznej wersji manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 3%.

.....
K. Miłowska



WYDZIAŁ
CHEMII

Uniwersytet Łódzki



UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Chemii, Katedra Chemii Fizycznej
ul. Pomorska 163/165, 90-236 Łódź
e-mail.: adam.buczowski@chemia.uni.lodz.pl

Dr hab. Adam Buczkowski, prof. UŁ

Łódź, dnia 23.09.2025 r.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

Okła E., Michlewska S., **Buczowski A.**, Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, obejmował:

- przygotowanie i wykonanie pomiarów na izotermicznym kalorymetrze miareczkującym
- przygotowanie i analizę wyników
- współtworzenie i edycję manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%.

A. Buczkowski

UNIwersytet ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Pracownia Obrazowania Mikroskopowego
i Specjalistycznych Technik Biologicznych,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail.: sylwia.michlewska@biol.uni.lodz.pl

Dr hab. Sylwia Michlewska

Łódź, dnia 23 09 2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Okła E., **Michlewska S.**, Buczkowski A., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, polegał na:

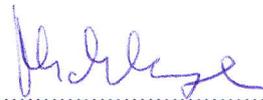
- wykonaniu analiz z wykorzystaniem techniki Transmisyjnej Mikroskopii Elektronowej,
- pomocy w analizie i opisanu wyników

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%.

2. Okła E., Hołota M., **Michlewska S.**, Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. Biomedicines 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108, polegał na:

- obrazowania za pomocą techniki mikroskopii konfokalnej
- pomocy w analizie wyników,

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 4%.



UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Ekofizjologii Roślin,
Instytut Biologii Eksperymentalnej
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
e-mail.: marcin.holota@biol.uni.lodz.pl

dr Marcin Hołota

Łódź, dnia 24.09.2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

Okła E., **Hołota M.**, Michlewska S., Zawadzki S., Mitowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. *Biomedicines* 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108, obejmował:

- wykonanie testów badających poziom reaktywnych form tlenu w komórkach i zmiany potencjału mitochondrialnego
- analizę otrzymanych danych

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 6%.


.....

UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail.: elzbieta.pedziwiatr@biol.uni.lodz.pl

dr Elżbieta Pędziwiatr-Werbicka

Łódź, dnia 23.09.25

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

Okła E., Biatecki P., Kędzierska M., **Pędziwiatr-Werbicka E.**, Miłowska K., Takvor S., Gómez R., de la Mata FJ., Bryszewska M., Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, obejmował:

- analizę części wyników
- współudział w przygotowaniu manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%.

E. Pędziwiatr-Werbicka

UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail.: piotr.bialecki@edu.uni.lodz.pl

mgr Piotr Białecki

Łódź, dnia 22.09.2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

Okła E., **Białecki P.**, Kędzińska M., Pędziwiatr-Werbicka E., Miłowska K., Takvor S., Gómez R., de la Mata FJ., Bryszewska M., Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, obejmował:

- wykonanie testu LDH na przeżywalność komórek
- analizę otrzymanych danych

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%.



UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail.: serafin.zawadzki@edu.uni.lodz.pl

mgr Serafin Zawadzki

Łódź, dnia 22.09.2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Okła E., Michlewska S., Buczkowski A., **Zawadzki S.**, Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. *Scientific Reports*; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, obejmował:

- pomoc w analizie części wyników
- współtworzenie manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%.

2. Okła E., Hołota M., Michlewska S., **Zawadzki S.**, Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. *Biomedicines* 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108, obejmował:

- opracowanie oraz pomoc w części eksperymentów komórkowych
- współtworzenie manuskryptu

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 4%.

.....

UNIwersytet ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail.: maksim.ionov@biol.uni.lodz.pl

Prof. dr hab. Maksim Ionov

Łódź, dnia 24.09.2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Okła E., Biatecki P., Kędzierska M., Pędziwiatr-Werbicka E., Miłowska K., Takvor S., Gómez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., **Ionov M.** (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, obejmował:

- zaprojektowanie badań i koncepcji pracy
- korekta ostatecznej wersji manuskryptu
- współuczestnictwo w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%

2. Okła E., Michlewska S., Buczkowski A., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Błasiak J., **Ionov M.** Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, obejmował:

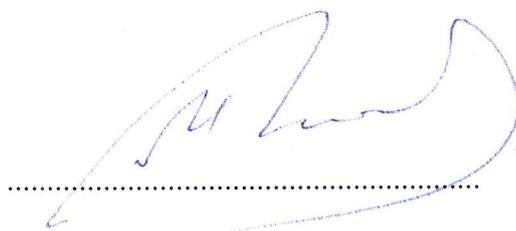
- zaprojektowanie badań i koncepcji pracy
- korekta ostatecznej wersji manuskryptu
- współuczestnictwo w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%

3. Okła E., Hotota M., Michlewska S., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., **Ionov M.** Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. Biomedicines 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108, obejmował:

- zaprojektowanie badań i koncepcji pracy
- korekta ostatecznej wersji manuskryptu
- współuczestnictwo w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 5%



UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail.: elzbieta.okla@biol.uni.lodz.pl

mgr Elżbieta Okła

Łódź, dnia 26/09/2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. **Okła E.**, Biatecki P., Kędzierska M., Pędziwiatr-Werbicka E., Miłowska K., Takvor S., Gómez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. (2023). Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(7), doi: 10.3390/ijms24076638, obejmował:

- biofizyczną charakterystykę kompleksów AuNP/siRNA (wykonanie pomiarów z wykorzystaniem technik: potencjał zeta, średnica hydrodynamiczna, elektroforeza w żelu agarozowym, dichroizm kołowy)
- wykonanie testów cytotoksyczności (test MTT)
- opracowanie otrzymanych wyników i analizę statystyczną
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu
- współuczestniczenie w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 57%

2. **Okła E.**, Michlewska S., Buczkowski A., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Błasiak J., Ionov M. Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin. Scientific Reports; 2024, 14:24408, doi: 10.1038/s41598-024-74898-0, obejmował:

- biofizyczną charakterystykę białek osocza i błon lipidowych skompleksowanych z nanocząstkami złota (wykonanie pomiarów z wykorzystaniem technik: potencjał zeta, średnica hydrodynamiczna, dichroizm kołowy, spektrofluorymetria)
- otrzymywanie liposomów za pomocą techniki ekstruzji
- przygotowanie próbek do analiz mikroskopowych i chemicznych
- opracowanie otrzymanych wyników i analizę statystyczną
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu
- współuczestniczenie w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 53%

3. **Okta E.**, Hołota M., Michlewska S., Zawadzki S., Miłowska K., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F. J., Bryszewska M., Ionov M. Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer's Disease. *Biomedicines* 2025, 13, 2108, doi: 10.3390/biomedicines13092108, obejmował:

- wykonanie eksperymentów *in vitro* (test kometowy, żywotność komórek)
- przygotowanie próbek do analiz mikroskopowych i cytometrycznych
- opracowanie otrzymanych wyników i analizę statystyczną
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu
- przygotowanie odpowiedzi na recenzje

Wkład włożony w przygotowanie publikacji wynosił 61%

.....
Elzbieta Okta