

Magdalena Szuster

## **Wpływ dendrymerów PAMAM oraz ich biokoniugatów z biotyną i pirydoksałem na właściwości biologiczne różnych typów komórek *in vitro***

### **Streszczenie:**

Dendrymery znajdują coraz szersze zastosowanie zarówno w dziedzinie nauk medycznych (diagnostyka, terapia) jak i w przemyśle farmaceutycznym, głównie jako nośniki leków, genów i innych substancji biologicznie aktywnych. Wśród różnych typów dendrymerów wiele badań dotyczy kationowych dendrymerów typu poli(amidoaminowego) (PAMAM), których zastosowanie w biologii i medycynie związane jest z ich relatywnie niską cytotoksycznością oraz zdolnością do przenikania przez błony biologiczne. Wyzwaniem dla badaczy pozostaje ciągle optymalizacja układu wielofunkcyjnego nośnika w odniesieniu do różnego rodzaju komórek i tkanek. Taki cel wymaga interdyscyplinarnych badań na specyficznych modelach komórkowych.

Wstęp zawiera informacje dotyczące właściwości i syntezy dendrymerów oraz przykłady zastosowania w różnych dziedzinach nauk biomedycznych, a także ich oddziaływanie z układem immunologicznym człowieka. Omówione zostały również właściwości witamin z grupy B (biotyny i pirydoksalu) oraz budowa i funkcje skóry ze szczególnym uwzględnieniem trzech badanych fenotypów komórek: fibroblastów, keratynocytów oraz raka płaskonabłonkowego.

Przedmiotem rozprawy było zbadanie i porównanie wpływu natywnych kationowych dendrymerów PAMAM generacji 3 zawierających 32 terminalne grupy aminowe oraz ich biokoniugatu BC-PAMAM zmodyfikowanego witaminami grupy B (9 cząsteczkami biotyny i 10 cząsteczkami pirydoksalu) na trzech fenotypach ludzkich linii komórkowych skóry: normalnych fibroblastach BJ, komórkach raka płaskonabłonkowego SCC-15 oraz unieśmiertnionych keratynocytach HaCaT.

Zbadano cytotoksyczność dendrymerów po 24 godzinach inkubacji (test z czerwienią neutralną NR i solami tetrazolowymi XTT), ich wpływ na indukcję apoptozy (PARP-1) oraz migrację komórek (test gojenia ran). Przeprowadzone testy wykazały, że podstawienie dendrymerów dwiema różnymi biologicznie czynnymi substancjami: biotyną i pirydoksałem zmniejsza ich cytotoksyczność 5-10 razy (5-10  $\mu\text{M}$  wobec 50  $\mu\text{M}$ ) we wszystkich badanych liniach. Normalne ludzkie fibroblasty są najbardziej wrażliwe na proapoptyczne działanie dendrymerów zarówno PAMAM, jak i BC-PAMAM, natomiast linia keratynocytów HaCaT wykazuje największą odporność na ich działanie. Oba rodzaje dendrymerów hamują

ruchliwość komórek w stężeniach cytotoksycznych. Godna uwagi jest zaś stymulacja ruchliwości fibroblastów w niskim ( $1\mu\text{M}$ ) stężeniu BC-PAMAM.

Przeprowadzono również ocenę wewnątrzkomórkowej akumulacji obu typów dendrymerów oraz ich kolokalizację w jądrach komórkowych i mitochondriach z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego. Wewnątrzkomórkowa akumulacja obu dendrymerów zwiększała się wraz ze wzrostem ich stężenia, przy czym w przypadku linii BJ oraz SCC-15 szybszy wzrost akumulacji zanotowano do nietoksycznego  $2,5\mu\text{M}$  stężenia. Ponadto komórki fibroblastów i raka płaskonabłonkowego wykazywały w sposób istotny większą internalizację PAMAM niż BC-PAMAM. Biokoniugaty były nagromadzane w dużo mniejszej ilości we wszystkich liniach komórkowych w porównaniu do natywnego dendrymeru. Nagromadzenie dendrymerów w jądrach komórek było bardzo zróżnicowane. Największy sygnał obserwowano dla PAMAM w jądrach komórek fibroblastów, a stopień nagromadzenia był wprost proporcjonalny do stężenia. Mniejszą akumulację wykazywały komórki SCC-15 przy braku zależności od stężenia, a najmniejszą HaCaT za wyjątkiem cytotoksycznego stężenia PAMAM. We wszystkich liniach komórkowych akumulacja BC-PAMAM w jądrze była istotnie niższa od natywnego dendrymeru. Kolokalizacja sygnału obu typów dendrymerów z mitochondriami wykazała interesujące ilościowe i jakościowe różnice. Najwyższy sygnał pochodził od PAMAM w fibroblastach, w sposób proporcjonalny do stężenia, podczas gdy najniższy obserwowano w HaCaT. Natomiast w komórkach rakowych obserwowano pośrednią wartość akumulacji sygnału, ale w sposób niezależny od stężenia. We wszystkich badanych przypadkach akumulacja BC-PAMAM była znacząco mniejsza.

Badania wpływu dendrymerów PAMAM i BC-PAMAM na prozapalną odpowiedź komórek linii HaCaT potwierdziły ogólnie ich przeciwzapalne właściwości. Wykazano hamowanie endogennej produkcji IL- $1\alpha$  przez PAMAM i BC-PAMAM w niecytotoksycznych stężeniach ( $1\mu\text{M}$ ), oraz obniżenie produkcji tej cytokiny w komórkach HaCaT stymulowanych bakteryjnymi czynnikami LPS i GroEL.

Podsumowując, wykazano zróżnicowaną odpowiedź trzech fenotypów linii komórkowych ludzkiej skóry na działanie zarówno natywnych dendrymerów PAMAM G3 jak i ich koniugatu z biotyną i pirydoksałem, przy znacznie mniejszej cytotoksyczności biokoniugatu. Potwierdzono przeciwzapalne działanie obu typów dendrymerów w ich niecytotoksycznych stężeniach w keratynocytach HaCaT. Uzyskane wyniki nie potwierdzają obserwacji innych autorów, że biotyna zwiększa wejście dendrymerów do wszystkich typów komórek nowotworowych, wskazując na znaczenie dokładnego badania poszczególnych linii komórkowych.