

Streszczenie pracy doktorskiej

W ramach rozprawy doktorskiej zbadano oddziaływania polielektrolitów, pochodnych poli(chlorowodoru alliloaminy) (PAH), z błonami lipidowymi oraz komórkowymi. Oddziaływania pomiędzy polikationami, a błonami komórkowymi odgrywają istotną rolę w wielu zastosowaniach biofizycznych. Do najbardziej istotnych należy zaliczyć: dostarczanie materiału genetycznego do komórek w celowany i bezpieczny sposób, użycie polikationów jako czynników biobójczych, czy uzyskiwanie układów liposomowych stabilizowanych wielowarstwami polimerowymi.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono modyfikacje chemiczne PAH celem uzyskania pochodnych o pożądanych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. W tym celu wykonano syntezy pochodnych polikationowych, które różniły się: gęstością ładunku, pozycją naładowanych grup amoniowych w stosunku do głównego łańcucha polimerowego, brakiem lub obecnością ugrupowań hydrofobowych oraz długością łańcucha alkilowego obecnego w podstawniku hydrofobowym. Ponadto zsyntetyzowano pochodną polianionową – *N*-sulfonowany PAH (PASulf). Otrzymane pochodne, jako mocne polielektrolity charakteryzowały się stabilnymi właściwościami w roztworach o różnym pH oraz sile jonowej. Dowiedziono, że biologiczna aktywność badanych polimerów (bakteriostatyczność, bakteriobójczość, cytotoksyczność) jest silnie zależna od struktury przestrzennej łańcucha polimerowego, głównie od lokalizacji naładowanych dodatnio grup amoniowych w stosunku do łańcucha głównego, a także od obecności ugrupowań hydrofobowych. Gęstość ładunku w strukturze polimeru jest jednak mniej istotnym czynnikiem. Różnice w toksyczności pochodnych PAH względem bakterii (*E. coli* i *S. aureus*) i fibroblastów skóry ludzkiej (HSF) są silnie związane z naturą ich oddziaływań ze ścianą bakterii i błoną komórek.

Następnie przeprowadzono charakterystykę uzyskanych pochodnych PAH w postaci sporządzonych z nich filmów wielowarstwowych. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że grubość filmów polimerowych otrzymywanych metodą warstwa po warstwie silnie zależy od gęstości ładunków polimerowych oraz od ich lokalizacji w stosunku do głównego łańcucha polimerowego. Wielowarstwy o parzystych liczbach warstw, czyli te zakończone PASulf charakteryzowały się większą hydrofilowością, w porównaniu z układami gdy warstwę terminalną tworzył polikation. Zbadano proliferację i ruchliwość komórek HSF na powierzchniach filmów. Z badań wynika, że gęstość ładunku w łańcuchu

polimerowym jest mniej istotna z punktu widzenia ruchliwości komórek. Ma ona jednak duży wpływ na proliferację komórek na warstwach polimerowych, gdzie korzystniejsze jest zmniejszenie zawartości 4^o grup amoniowych. Na podstawie parametrów fizykochemicznych można stwierdzić, iż najistotniejszy wpływ na zdolność adhezji komórek miał potencjał zeta warstwy terminalnej filmów, a także struktura chemiczna użytego polikationu, mająca zasadniczy wpływ na organizację kolejnych warstw. Komórki chętnie adherowały i proliferowały na warstwach o ujemnym ładunku powierzchniowym filmu tworzącego najbardziej zewnętrzną, hydrofilową powierzchnię.

Celem zbadania oddziaływań polielektrolitów z dwuwarstwą liposomową (obojętną i ujemnie naładowaną), przeprowadzono szereg eksperymentów pokrywania błony lipidowej przez badane polimery. Przeprowadzono badania optymalizacji liczby warstw polielektrolitów optymalnych do pokrycia liposomów. Ponadto, zbadano stabilności oraz przepuszczalność błon poddanych działaniu polimerów i surowicy krwi. Stwierdzono, iż bardziej stabilne układy otrzymuje się po pokryciu tylko jedną warstwą polimeru. Wykazano, że polimery amfifilowe mają zdolność szybkiego i łatwego wbudowywania się w błony lipidowe przy zachowaniu ich morfologii. Badania te znajdują swoje potwierdzenie w wykonanych symulacjach dynamiki molekularnej. Badania wykazały, że pojedyncza warstwa polikationów osadzona na anionowych liposomach powoduje w pewnym stopniu stabilizację pęcherzyków przed niszczącym działaniem surowicy. Jednocześnie, wyniki pokazały, że struktura chemiczna polimeru ma kluczowy wpływ na zmniejszenie oddziaływań między anionowymi liposomami, a składnikami surowicy. Istotnym zdaje się być optymalne rozmieszczenie ładunku dodatniego w stosunku do szkieletu polimeru.

Ostatnim krokiem było zbadanie użyteczności pochodnych PAH (ogólnie określonych PAG) jako nośników materiału genetycznego. Przy pomocy niezbyt skomplikowanych modyfikacji chemicznych otrzymano nowe pochodne PAH o różnym stopniu zmetylowania i podstawienia chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym (GTMAC). Polimery PAG wykazały różną pojemność buforową, ściśle zależną od obecności różnorodnych grup aminowych. Ponadto, PAG efektywnie kompleksowały DNA, co prowadziło do otrzymania stabilnych polipleksów. Polimery te wykazały bardzo dobrą efektywność transfekcji komórek przy całkowitym braku toksyczności. Dodatkowo stwierdzono, że otrzymane polipleksy wnikają do komórek poprzez endosomy. Otrzymane wyniki mogą posłużyć do rozwijania nowych nośników dla wydajnej i bezpiecznej transfekcji.

Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim

The main objective of the dissertation was to examine the interactions of new derivatives of poly(allylamine hydrochloride) (PAH) polymer with lipid membranes of model systems such as liposomes and with the native plasma membrane of cells. The interaction between polycations and cell membrane is a fundamental issue in cell biophysics and plays an important role in different biological applications in particular: delivery of genetic material into cells in a targeted and safe manner, the use of polycations as biocidal agents, or obtaining stabilized vesicles by covering liposome surface with multilayer films.

In the first stage of the study, chemical modifications of PAH were carried out to obtain derivatives with desired physicochemical and biological properties. The performed synthesis of new polycations, resulted in products, which differed in: charge density, position of the ammonium groups in relation to the polymer chain, presence or absence in the polymer structure hydrophobic groups and length of the alkyl groups of the hydrophobic substituents. In addition, one polyanionic derivative was synthesized – *N*-sulfonated PAH (PASulf). All of the obtained derivatives, as strong polyelectrolytes, were characterized by stable properties in solutions at different pH and ionic strength. Furthermore, biological activity of the tested polymers i.e. antibacterial, bactericidal and cytotoxicity strongly depended on the spatial structure of the polymer, especially on the location of the positively charged ammonium groups in relation to the polymer backbone, as well as the presence of hydrophobic moieties. On the other hand, charge density in the polymer structure turned out to be a less important factor. The obtained differences in toxicity of PAH derivatives against two pathogenic bacteria (*E. coli* and *S. aureus*) and human skin fibroblasts (HSF) were strongly related to the nature of their interactions with the bacteria wall and cells membrane.

In the next stage of the work characteristics of multilayer films composed from all of the polymer derivatives were carried out. It was found that the thickness of polymer films strongly depended on the charge density of the polymer and its location in relation to the main polymer chain. Multilayers with even number of layers, namely these with PASulf as a terminal layer, were characterized by higher hydrophilicity, when compared to systems in which the terminal was formed by polycations. Subsequently, cell proliferation and motility were examined on the film surfaces. The obtained results demonstrate that the charge density

in the polymer chain did not have a significant impact on cell motility. On the other hand, it had a major impact on cell. Based on physico-chemical characteristic of the polymers it was concluded that the zeta potential of the terminal film layer played a key role in the cells adhesive abilities. Moreover, chemical structure of the polycations had a significant impact on the organization of the subsequent layers. The cultured cells were more adherent and revealed higher levels of proliferation on hydrophilic polymeric films with negative charge of the terminal layer.

To explore the interactions of polyelectrolytes with the liposome bilayer (neutral and negatively charged), a number of experiments by the lipid membrane coating with polymers were carried out. Optimization studies were performed to cover the liposomes with appropriate amount of polyelectrolytes. Furthermore, the stability and permeability of the polymer-coated membranes in the presence of blood serum were examined. It was found that only one polymer layer is required to obtain the most stable systems. It has been shown that the amphiphilic polymers were capable of quick and easy incorporation into lipid membranes, while maintaining their morphology. These studies were confirmed by molecular dynamics simulations. Results showed that polycation single layer deposited on the anionic liposomes causing a certain degree of stabilization of the vesicles against the destructive effects of the serum. Simultaneously, the results indicated that the chemical structure of the polymer had a significant impact on the reduction of interactions between the anionic liposomes and serum components. It seems that the most important was the optimal location in relation to the main polymer chain.

The final step was to examine transfection abilities of the new PAH derivatives (generally named as PAGs) as carriers of genetic material. Using relatively simple chemical modifications, novel PAH derivatives, obtained with varying degrees of methylation, and substitution by glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC). PAG polymers showed different buffering capacity, strictly dependent on the balanced of the order of amino groups. All the derivatives showed the ability to complex pDNA into stable polyplexes. These polymers had very good transfection efficiency, while showing no toxicity against the examined cells. The polyplexes were routed via early and late endosomes. The obtained results can be used to develop new carriers for efficient and safe transfection.