

Streszczenie w języku polskim

Korzystne właściwości biologiczne ksantonów wykazane w wielu badaniach *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzają ich potencjał do zastosowania w terapii między innymi chorób nowotworowych, pasożytniczych, czy zakażeń bakteryjnych. Jednakże częstym ograniczeniem tego typu związków są ich słabe parametry farmakokinetyczne, które uniemożliwiają wprowadzenie ksantonów do zastosowań klinicznych. Rozwiązaniem tego problemu może być użycie nośników leków, na przykład dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM), z którymi można z wiązać cząsteczkę leku na drodze enkapsulacji bądź kowalencyjnie. Dendrymery PAMAM, będące super-rozgałęzionymi polimerami o wysokiej biokompatybilności, pozwalają usprawnić transport trudno rozpuszczalnych leków, zmniejszyć ich toksyczność oraz uzyskać efekt celowania w konkretne komórki, organella bądź szlaki metaboliczne. Dużym atutem dendrymerów jest ich poliwalentność, pozwalająca na równoczesne przyłączenie cząsteczek leku, cząsteczki adresującej, znacznika umożliwiającego obrazowanie lokalizacji tych nanocząstek oraz innych ligandów.

W niniejszej pracy po raz pierwszy opracowano koniugaty dendrymeru PAMAM generacji trzeciej (G3) z kowalencyjnie przyłączoną α -mangostyną lub vadimezanem. Wyboru tych dwóch związków dokonano na podstawie badań toksyczności grupy ośmiu ksantonów przeprowadzonych na dwóch liniach ludzkich komórek nowotworowych: komórkach raka płaskonabłonkowego z języka (SCC-15) i komórkach glejaka wielopostaciowego IV stopnia (U-118 MG) oraz porównawczo na komórkach prawidłowych fibroblastów skórnych linii BJ. Zsyntezowano szereg koniugatów dendrymerowych, w których reszty α -mangostyny (M) lub vadimezanu (V) przyłączono za pomocą wiązań amidowych lub estrowych. Dodatkowo, jako czynnik zwiększający wychwyty i kierujący do wybranych komórek nowotworowych zastosowano biotynę (B), a pozostałe wolne grupy aminowe na powierzchni nośnika zmodyfikowano resztami α -D-glukoheptono-1,4-laktonu (gh) w celu zmniejszenia natywnej cytotoxyczności dendrymeru. Otrzymano koniugaty amidowe o różnym stopniu postawienia resztami α -mangostyny: $G3^{2B12gh5M}$ oraz $G3^{2B10gh17M}$, a także koniugat estrowy $G3^{gh2B5M}$. Zsyntezowano analogiczne koniugaty z vadimezanem: $G3^{2B12gh5V}$ oraz $G3^{gh4B5V}$. Związki $G3^{2B12gh}$ oraz $G3^{gh}$ stanowiły kontrolę w postaci nośnika, odpowiednio dla koniugatów amidowych oraz estrowych. Badania *in vitro* oraz *in vivo* na organizmie modelowym *C. elegans* wykazały brak toksyczności i działania antyproliferacyjnego tych nośników. Przyłączenie reszt α -mangostyny do dendrymeru $G3^{2B12gh}$ istotnie zwiększyło aktywność biologiczną związku w zależności od stopnia

podstawienia, osiągając nawet 25-krotne wzmocnienie działania cytotoksycznego w przypadku koniugatu **G3^{2B10gh17M}**. Efekt wzmocnienia obserwowany był w przypadku każdego z badanych parametrów komórkowych (poziom ATP, aktywność kaspaz wykonawczych, stopień proliferacji i adhezji komórek) a także był widoczny w postaci spadku poziomu żywotności nicienia *C. elegans*. Koniugaty dendrymeru z amidowo przyłączoną α -mangostyną dodatkowo wyznakowano fluorescencyjnie, co pozwoliło wykazać, że związki te wnikały do badanych komórek i były zlokalizowane w pęcherzykach endocytarnych oraz częściowo w mitochondriach. Porównując aktywność amidowych oraz estrowych koniugatów α -mangostyny, zastosowanie obu typów wiązań zwiększyło aktywność związku, jednak silniejsze działanie wobec każdego z badanych parametrów uzyskano stosując wiązania amidowe. W przypadku vadimezanu, który nie wykazał toksyczności wobec badanych komórek i nicienia, przyłączenie związku do dendrymeru za pomocą wiązania estrowego nie zwiększyło jego aktywności. Natomiast uzyskano słabe, selektywne działanie antyproliferacyjne vadimezanu wobec komórek raka płaskonabłonkowego, które zostało zwielokrotnione poprzez przyłączenie związku wiązaniem amidowym do nośnika **G3^{2B12gh}**.

W prezentowanej pracy przedstawiono również wpływ wielkości oraz potencjału zeta koniugatów na badane parametry biologiczne. Na podstawie analizy pomiarów DLS oraz testów *in vitro* i *in vivo* można sformułować wniosek, że zastosowanie wiązań amidowych, częściowe zablokowanie powierzchniowych grup aminowych oraz zwiększona średnica i dodatni potencjał zeta, może stanowić zestaw modyfikacji dendrymeru PAMAM G3 niezbędny do zastosowania związku jako efektywnego nośnika leków.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska dostarczyła informacji na temat działania przeciwnowotworowego i przeciwnicieniowego α -mangostyny, które może zostać wzmocnione poprzez zastosowanie nośnika w postaci odpowiednio zmodyfikowanego dendrymeru PAMAM G3. Opracowane nośniki pozostawały nietoksyczne wobec badanych komórek i nicieni, a aktywność przeciwnowotworowa oraz przeciwnicieniowa koniugatów była wynikiem działania transportowanego związku. Przedstawione badania na komórkach oraz *C. elegans* pozwalają stwierdzić, że otrzymane koniugaty α -mangostyny z nośnikiem dendrymerowym mogą stanowić nowe potencjalne terapeutyki do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych oraz zakażeń nicieniowych.

Streszczenie w języku angielskim

The favourable biological properties of xanthenes demonstrated in many *in vitro* and *in vivo* studies confirm their potential for use in cancer therapy and bacterial or parasitic diseases. However, a common limitation of these types of compounds is their poor pharmacokinetic parameters, which prevent xanthenes from being introduced into clinical use. The solution to this problem may be the use of drug carriers, for example poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers, to which the drug molecule can be covalently attached or encapsulated. The PAMAM dendrimers, which are hyper-branched polymers with high biocompatibility, allow to improve the transport of sparingly soluble drugs, reduce their toxicity and achieve the effect of targeting specific cells, organelles or metabolic pathways. A great advantage of dendrimers is their polyvalence allowing for the simultaneous attachment of drug molecules, a targeting molecules, a marker enabling the imaging of the location of these nanoparticles, and other ligands.

In this study, the third generation PAMAM dendrimer (G3) conjugates with covalently attached α -mangostin (M) or vadimezan (V) were developed for the first time. These two compounds were selected on the basis of toxicity studies of a group of eight xanthenes performed on two human cancer cell lines: squamous cell carcinoma cells from the tongue (SCC-15) and grade IV glioblastoma multiforme cells (U-118 MG), and comparatively on normal skin fibroblast cells (line BJ). A number of dendrimer conjugates were synthesized with α -mangostin or vadimezan attached by amide or ester bonds. Additionally, biotin (B) was used as a targeting molecule to cancer cells, and the remaining free amine groups on the carrier surface were modified with α -D-glucoheptono-1,4-lactone (gh) to reduce the native dendrimer cytotoxicity. The amide conjugates with different amount of α -mangostin **G3^{2B12gh5M}** and **G3^{2B10gh17M}**, as well as the ester conjugate **G3^{gh2B5M}** were obtained. The equivalent conjugates were synthesized also with vadimezan: **G3^{2B12gh5V}** and **G3^{gh4B5V}**. The **G3^{2B12gh}** and **G3^{gh}** compounds were vehicle control for amide and ester conjugates, respectively. *In vitro* and *in vivo* studies on the *C. elegans* model organism revealed the lack of toxicity and antiproliferative effect of these vehicles. The attachment of α -mangostin to **G3^{2B12gh}** dendrimer significantly increased the biological activity of this compound depending on the degree of the dendrimer substitution by xanthone, with a 25-fold enhancement of the cytotoxic effect obtained in the case of the **G3^{2B10gh17M}** conjugate. The boost effect was observed for all studied cellular parameters (ATP level, activity of executioner caspases, degree of cells proliferation and adhesion) and was also visible as a decrease in the level of

C. elegans viability. The dendrimer conjugates with amide-bonded α -mangostin were additionally fluorescently labeled, which allowed to show that this compounds penetrate into the tested cells and accumulate in endocytic vesicles and partially in the mitochondria. Comparing the activity of the amide and ester α -mangostin conjugates, the use of both types of bonds increased the activity of the compound, but a stronger effect on each of the tested parameters was obtained in case of using amide bonds. In the case of vadimezan, which showed no toxicity against the tested cells and nematodes, the attachment to the dendrimer *via* an ester bond did not improve its activity. However, a weak selective antiproliferative activity of vadimezan against squamous carcinoma cells was obtained, which was multiplied by attaching the compound to the **G3^{2B12gh}** vehicle by amide bond.

The presented study also indicated the influence of the size and zeta potential of the synthesized conjugates on the tested biological parameters. Based on the analysis of DLS measurements and performed *in vitro* and *in vivo* studies, it can be concluded that the use of amide bonds, partial blockade of surface amine groups, and increased diameter and positive zeta potential may constitute a set of PAMAM G3 dendrimer modifications necessary for the use of the compound as an effective drug carrier.

To sum up, this PhD thesis provided information on the anticancer and antinematode activity of α -mangostin that can be strengthened using an appropriately modified PAMAM G3 dendrimer vehicle. The developed carriers remained non-toxic for studied cells and nematodes, and the anticancer and nematocidal activity of conjugates was the result of the mechanism of action of the transported compound. The presented studies allow to state that the obtained α -mangostin conjugates with a dendrimer carrier may be the new potential drugs for the treatment of cancer and nematode diseases.