



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu **SK-BY-RD-19-0019**

Analýza interakcie medzi amfifilnými dendrónmi a biologickými systémami

Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Iveta Waczulíková, PhD.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Fakulta matematiky, fyziky a informatiky**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Komenského v Bratislave, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Katedra jadrovej fyziky a biofyziky

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
The State Scientific Institution "Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus"

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Nie sú.

Poznámka: držiteľom viacerých patentov je spolupracujúci tím, konkrétne prof. J.M. Majoral, ktorý nášmu a partnerskému tímu dodal študované amfifilné fosforové dendróny.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Veliskova, M.; Zvarik, M.; Suty, S.; Jacko, J.; Mydla, P.; Cechova, K.; Dzubinska, D.; Morvova, M.; Ionov, M.; Terehova, M.; Majoral, J.-P.; Bryszewska, M.; Waczulikova, I.
In Vitro Interactions of Amphiphilic Phosphorous Dendrons with Liposomes and Exosomes—Implications for Blood Viscosity Changes

Pharmaceutics 2022, 14, 1596. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081596>
Forma: originálny článok, SCIE (Web of Science Core Collection), JCR 2021 Q1 (Pharmaceutical Science), IF 6.525

Klbik Ivan, Čechová Katarína, Matko Igor, Lakota Ján, Šauša Ondrej

On crystallization of water confined in liposomes and cryoprotective action of DMSO
RSC Advances [elektronický dokument]. - Roč. 12, č. 4 (2022), s. 2300-2309,
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2022/ra/d1ra08935h>

Forma: originálny článok, Current Contents Physical, Chemical & Earth Sciences | Essential Science Indicators, JCR (2021: Q1 (Chemical Engineering), IF 2021 4.036

Terehova M. M., Abashkin V. M., Zhogla V. A., Halets-Bui I. V., Loznikova S. Zh.,
Bryszewska M., Ionov M., Waczulikova I., Majoral J.-P., Shcharbin Dz. G.

Взаимодействие полиамидоаминных дендримеров и амфифильных дендронов с липидными мембранами (Interaction of polyamidoamine dendrimers and amphiphilic dendrons with lipid membranes)

Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings

of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 497–512 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-4-497-512>
 Indexovaný v: <https://vestibio.belnauka.by/jour/about/editorialPolicies#custom-1>
 Šutý Šimon, Oravczová, Garaiová Zuzana, Šubjaková Veronika, Ionov Maksim, Shcharbin Dzmitry, Šimoníková Zuzana, Bartek Peter, Zvarík Milan, Shi Xiangyang, Mignani Serge, Majoral Jean Pierre, Bryszewska Maria, Hianik Tibor, Waczulíková Iveta
 Blood Compatibility of Amphiphilic Phosphorous Dendrons-Prospective Drug Nanocarriers Biomedicines 2021, 9(11), s. 1-13. <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/11/1672>
 Forma: originálny článok, Current Contents Life Sciences, JCR 2021 - Q1 (Medicine), IF 2020 6.081
 Katarzyna Milowska, Aleksandra Rodacka, Sophie Melikishvili, Adam Buczkowski, Bartłomiej Palecz, Iveta Waczulikova, Tibor Hianik, Jean Pierre Majoral, Maksim Ionov, & Maria Bryszewska
 Dendrimeric HIV- peptide delivery nanosystem affects lipid membranes structure Scientific Reports. - Roč. 11, č. 1 (2021), s. [1-13], art. no. 16810
<https://www.nature.com/articles/s41598-021-96194-x>
 Forma: originálny článok, Current Contents Physical, Chemical & Earth Sciences, JCR 2020 - Q1 (Multidisciplinary sciences), IF - JCR: 2020 - 4.380
 Poznámka: táto spoločná práca nebola zahrnutá do priamych výstupov projektu, koncepčne však patrí do skúmanej problematiky.
 Veronika Oravczová, Zuzana Garaiová, Tibor Hianik
 Nanoparticles and Nanomotors Modified by Nucleic Acids Aptamers for Targeted Drug Delivery (review)
 Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2021, 47(2), s.344-366,
<https://link.springer.com/article/10.1134%2FS1068162021020187>
 wos-jcr - Q4 [Biochemistry & molecular biology], Q4 [Chemistry, organic] - 2020, IF (2020) 0.796
 Zuzana Garaiova, Sopio Melikishvili, Sylwia Michlewska, Maksim Ionov, Elzbieta Pedziwiatr-Werbicka, Iveta Waczulikova, Tibor Hianik, Rafael Gomez-Ramirez, Francisco Javier de la Mata, and Maria Bryszewska
 Dendronized Gold Nanoparticles as Carriers for gp160 (HIV-1) Peptides: Biophysical Insight into Complex Formation
 Langmuir 2021, 37(4), s. 1542-1550, <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.0c03159>
 Forma: originálny článok, Current Contents Physical, Chemical & Earth Sciences, JCR Q1 all fields, IF (2020) 4.331
 Veronika Subjakova, Veronika Oravczova and Tibor Hianik
 Polymer Nanoparticles and Nanomotors Modified by DNA/RNA Aptamers and Antibodies in Targeted Therapy of Cancer
 Polymers 2021, 13(3), 341; doi.org/10.3390/polym13030341
 Forma: review, Current Contents Physical, Chemical & Earth Sciences | Essential Science Indicators, SCIE (Web of Science), JCR 2021 - Q1,), IF (2020) 4.757
 Mara Beltrán-Gastélum, Berta Esteban-Fernández de Ávila, Hua Gong, Pooyath Lekshmy Venugopalan, Tibor Hianik, Joseph Wang, and Veronika Subjakova
 Rapid Detection of AIB1 in Breast Cancer Cells Based on Aptamer-Functionalized Nanomotors
 ChemPhysChem 2019, 20, 3177– 3180, <https://doi.org/10.1002/cphc.201900844>
 Pdf: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cphc.201900844>
 Forma: review, Current Contents Physical, Chemical & Earth Sciences | Essential Science Indicators SCIE (Web of Science), JCR (Journal Citation Reports (Clarivate)), 2018 Q1, (Chemistry, Physical) and (Physics, Atomic, Molecular & Chemical), IF (2019) 3.177

Uplatnenie výsledkov projektu

1. Hlavný príspevok predstavujú výsledky in vitro testovania krvnej kompatibility nanočastíc na báze amfifilných fosforových dendrimérov (t.j. interakcií s biologickým systémom) podporené experimentami na modelových systémoch, ako sú lipozómy, zameranými na identifikovanie a charakterizovanie elektrostatickej povahy interakcií a tendencie k tvorbe agregátov.

Naše výsledky dosiahnuté s pomocou vhodne zvolených protokolov (viď. bod 2) majú využitie v základnom biomedicínskom výskume a potenciálne využitie v klinickej praxi pre

monitorovanie vplyvu teranostík (nanočastíc na báze dendrimérov) na tokové vlastnosti krvi a jej viskozity a diagnostikovanie mikroagregátov vzniknutých v súvislosti s aplikáciou týchto nanočastíc. Ukazuje sa, že mužské pohlavie je z dôvodu naturálne vyššieho počtu krvných buniek rizikovejšie, pretože je viac ohrozené vznikom mikrotrombov - vplyv pohlavia je pravdepodobne vyšší v mladšom dospelom veku a so starnutím sa znižuje, ale rozdiel zotrva. To má aj ďalšie implikácie v tom, že pohlavie je potrebné zohľadniť pri určovaní bezpečných dávok nanoterapeutík - kandidátov na klinické skúšanie, pretože šírka terapeutického okna u mužov môže byť menšia ako u žien. Naše výsledky a širšie štúdium tiež ukazujú, že okrem pohlavia, (proxy ukazovateľ hematokritu), protrombínu, fibrinogénu a albumínu (ktorý širšie skúmal partnerský tím) je dôležité preskúmať aj príspevok lipidov a zmeny v lipidovom profile. Pre ďalšie skúmanie tejto hypotézy sme sa rozhodli rozšíriť počet experimentov, v ktorých je možné spojiť výsledky našich meraní so štandardnými výstupmi hematologického laboratória na klinike. Na základe doterajších výsledkov odporúčame pre výskum účinkov a biokompatibility amfifilných nanočastíc na báze dendrónov (alebo akýchkoľvek umelých nanoštruktúr) využiť okrem štandardných laboratórnych testov a analytických metód aj fyzikálne metódy, najmä reometriu, pretože viskozita a reologické správanie krvi môžu poskytnúť cenné informácie o interakciách medzi zložkami krvi a aplikovanými nanočasticami testovanými pre využitie v humánnej medicíne. Takéto včasné informácie môžu pomôcť posúdiť, ktoré štruktúry a v akých fyziologicko-patologických stavoch môžu s najväčšou pravdepodobnosťou narušiť perfúziu orgánov a tkanív a vyselektovať tie, ktoré sú z hľadiska hemoreológie bezpečné. Opodstatnenosť dokladuje aj výskum a vývoj mikroeologických čipov na diagnostikovanie trombotických stavov rôznej etiológie a monitorovanie antitrombotickej liečby (<https://doi.org/10.1007/s12195-020-00644-x>). Analýza rôznych scenárov vo fáze základného výskumu tak môže zlepšiť skríning a optimalizáciu liekových vlastností (drug-like properties) série štruktúrnych analógov zlúčenín a výber kandidátov vhodných pre ďalšie testovanie.

2. Výstupy týkajúce sa koncepčných a metodických aspektov výskumu v oblasti dendritických nanočastíc.

A) Optimalizovanie experimentov s lipozómami - sférickými dvojvrstvami, ktoré slúžia nielen ako jednoduché modely biologickej membrány, ale majú aj klinické využitie ako nosiče liečiv. Praktické výstupy z problematiky enkapsulácie - metódy, ktorá kombinuje lipozomálnu a dendrimerickú technológiu. V tíme sme rozpracovali metodiku enkapsulácie cestou pasívneho loadingu počas samoorganizácie vezikúl. Výsledky môžu byť využité pre ďalší výskum a vývoj nanosystémov na dopravu cytostatík, alebo v situácii, keď by dendriméry s liečivom alebo nukleovou kyselinou mohli byť v cirkulácii degradované.

B) Metodické aspekty uskladnenia lipozómov a buniek, kryoprezervácia. Preverenie vplyvu podmienok uskladnenia a výber optimálnej koncentrácie vybraného kryoprotektantu DMSO. Využitie v situácii, keď je potrebné vykonať viacero typov experimentov z jednej "šarže" (vzorky spracovanej v jednom procese). Skúmanie vplyvu kryoprezervácie na stabilitu a morfológiu lipozómov sme využili pri práci s bunkovými kultúrami (v našich experimentoch sme pracovali s keratinocytmi).

C) Metodika merania viskozity a šmykového napätia v závislosti od šmykovej rýchlosti pre simuláciu podmienok cirkulácie v artériách a vénach spolu s analýzou konštitučných modelov používaných na fitovanie reologických dát. Reometriu odporúčame zaradiť medzi štandardné "prvolíniové" metódy pre hodnotenie vzťahu medzi chemickou štruktúrou molekuly (dendrónu) a jej biologickou aktivitou.

D) Zavedenie protokolu pre využitie exozómov ako komplexnejšieho modelu biologického systému, nový postup izolácie exozómov z telových tekutín pomocou ultrafiltrácie a vylučovacej chromatografie a jeho optimalizácia. Výsledky rozširujú znalostnú bázu pre charakterizáciu exozómov a ich využitia ako nosičov terapeutík, o ktorých sa predpokladá, že budú (ako telu vlastné) organizmom lepšie tolerované.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

V projekte sme sa zamerali na analýzu interakcií amfifilných fosforových dendrónov (AFD) rôznych objemových koncentrácií (dávky) a generácií (veľkosti) s krvou a modelovými membránami, ktoré predstavovali planárne membrány, sférické vezikuly – lipozómy a novátorským prístupom bolo použitie exozómov ako komplexnejšieho modelu biologickej membrány. Naše výsledky dosiahnuté rôznymi fyzikálnymi technikami a nastavenými

protokolmi boli v súlade s cieľmi a poukazujú na agregáciu membránových štruktúr, s najväčším príspevkom elektrostatických síl medzi AFD a membránami. Narušenie disperzných vlastností koloidných roztokov štruktúrnych analógov AFD bolo závislé hlavne od ich objemovej koncentrácie – s rastúcou koncentráciou sa očakávané zvyšovala tendencia k vzniku agregátov rôznej povahy, od spontánne vytvorených micel, cez ich zhluky a nimi sprostredkovanú adhéziu krvných buniek. Agregáty vznikajúce v modelových experimentoch a v plnej krvi sme identifikovali a charakterizovali. Pozorovali sme koncentračne závislý efekt AFD na membrány a bunky. Efekt generácie AFD bol významne nižší, ale prítomný. Experimenty na modelových membránach a vezikulách (lipozómoch a exozómoch) potvrdili, že vyššie koncentrácie amfifilných fosforových dendrónov (nad 15-20 $\mu\text{mol/l}$) začínajú pôsobiť rušivo a môžu negatívne ovplyvniť integritu membrány. To by limitovalo použitie AFD ako nosičov. Avšak, v prípade preukázania selektívne deštruktívneho účinku AFD samotných, alebo s naviazaným terapeutikom, na membrány nádorových buniek, by šlo o žiaduci efekt a systémová toxicita by mohla byť znížená enkapsuláciou AFD do lipozómov alebo exozómov.

Náš hlavný príspevok sa týka krvnej kompatibility AFD. Dendróny indukovali vznik malých zhlukov trombocytov a ovplyvnili niektoré hemokoagulačné parametre. Pozorovali sme skrátenie trombinového času a predĺženie aktivovaného parciálneho tromboplastínového času. Zmeny viskozity krvi spojené s generáciou a koncentráciou AFD sa riadia rovnakým vzorom ako na modelových membránach lipozómov a exozómov, avšak dôležitým zistením z in vitro štúdie na krvi odobratej dobrovoľníkom bola výrazná závislosť meranej viskozity na pohlaví. Signifikantné zvýšenie viskozity indukované aplikáciou AFD v rozsahu 2-10 $\mu\text{mol/l}$ u žien ale neprevýšilo pri nízkych šmykových rýchlostiach krvi východiskové hodnoty viskozity u mužov. Vysvetlenie spočíva v prirodzených pohlavných rozdieloch - muži majú v priemere vyšší počet červených krviniek. Pozorovaný účinok AFD na viskozitu bol preto v daných experimentálnych podmienkach bez fyziologického významu, čo poukazuje na dobrú hemokompatibilitu amfifilných dendrónov v testovanom rozsahu koncentrácií. Náš výsledok však upozorňuje, že je potrebné zohľadniť pohlavie pri určovaní bezpečných dávok nanoterapeutík - kandidátov na klinické skúšanie, pretože šírka terapeutického okna u mužov môže byť menšia ako u žien. Na základe našich zistení odporúčame pre výskum účinkov a biokompatibilitu amfifilných nanočastíc na báze dendrónov (alebo akýchkoľvek umelých nanoštruktúr) využiť okrem štandardných laboratórnych testov a analytických metód aj vyšetrovanie hemoreologických parametrov. Včasné informácie pomôžu posúdiť, ktoré nanoštruktúry sú z hľadiska hemoreológie bezpečné a môžu byť ďalej testované a optimalizované.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

In the project we focused on the analysis of interactions of amphiphilic phosphorus dendrons (AFD) at different bulk concentration (dose) and generation (size) with blood and model membranes, such as planar membranes, spherical vesicles - liposomes, and an innovative approach was the use of exosomes as a more complex model of a biological membrane. Our results obtained with the use of different physical techniques and fine-tuned protocols, in accordance with the project objectives, point to the aggregation of membrane structures, with the largest contribution of electrostatic forces between AFDs and membranes. Disruption of the dispersion properties of colloidal solutions of structural analogues of AFD was mainly dependent on their volume concentration – increase in concentration enhanced the tendency to the formation of aggregates of different nature, from spontaneously formed micelles, through their clusters and the adhesion of blood cells mediated by AFD. We identified and characterized the aggregates formed in model experiments and in whole blood. We observed a concentration-dependent effect of AFD on membranes and cells. The AFD generation effect was significantly lower, but present. Experiments on model membranes, liposomes and exosomes confirmed that higher concentrations of AFD (above 15-20 $\mu\text{mol/l}$) start to have a disruptive effect and can negatively affect the integrity of the membrane. This would limit the use of AFD as carriers. However, in the case of proving a selective destructive effect of AFD on tumor cell membranes, this would be a desirable effect and systemic toxicity could be reduced by encapsulating AFD into liposomes or exosomes. Our main contribution concerns AFD blood compatibility. Dendrons induced the formation of small clumps of platelets and influenced

some hemocoagulation parameters. We observed a shortening of the thrombin time and a prolongation of the activated partial thromboplastin time. Changes in blood viscosity associated with AFD generation and concentration follow the same pattern as those on liposome and exosome model membranes, however, an important finding from our in vitro study on volunteer blood was a significant sex dependence of measured viscosity. However, the significant increase in viscosity induced by the application of AFD in the range of 2-10 $\mu\text{mol/l}$ in women did not exceed the baseline viscosity values in men at low shear rates of blood. The explanation lies in natural sex differences - men have, on average, a higher number of red blood cells. The observed effect of AFD on viscosity was therefore without physiological significance under the given experimental conditions, which points to the good hemocompatibility of the amphiphilic dendrons in the tested concentration range. However, our results point out that it is necessary to take sex differences into account when determining safe doses of nanotherapeutics - candidates for clinical trials, because the width of the therapeutic window in men may be smaller than in women. On the basis of our findings, we recommend that research on the effects and biocompatibility of amphiphilic nanoparticles based on dendrons (or any artificial nanostructures) ought to use, in addition to standard laboratory tests and analytical methods, rheometry for examination of hemorheological parameters. Early information will help select haemorheologically safe nanostructures that can be further tested and optimized.