

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Wydział Chemiczny

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Rafał Jerzy Kopiasz

**Synteza nowych przeciwdrobnoustrojowych
polikationów oraz badania ich aktywności z
wykorzystaniem mikroorganizmów i liposomów**

Promotor

dr hab. inż. Dominik Jańczewski, prof. PW

Warszawa, 2021

Praca doktorska została wykonana w ramach projektu pt. „Kontrolowana degradacja membrany komórkowej przy użyciu polimerów amfifilowych: aktywacja przy użyciu bodźców, aktywność przeciwko Mycobacterium” o akronimie PoCoDi finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), nr grantu 2015/18/E/ST5/00222.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

dr hab. inż. Dominikowi Jańczewskiemu, prof. PW za możliwość realizacji pracy doktorskiej w niezwykle interesującej tematyce, opiekę promotorską, wsparcie merytoryczne oraz nieocenioną pomoc w rozwiązywaniu problemów naukowych;

wszystkim członkom zespołu BioMat z którymi miałem okazję pracować za stworzenie milej i sympatycznej atmosfery pracy, a w szczególności mgr inż. Dominice Kozon i mgr inż. Julicie Pachli za kilka lat owocnej współpracy, wszystkie wspólne dyskusje naukowe oraz wsparcie w chwilach zwątpienia;

dr hab. Jolancie Mierzejewskiej, prof. PW oraz dr inż. Karolinie Drężek za nieocenione wsparcie i pomoc podczas prowadzenia badań mikrobiologicznych, a także niezwykle sympatyczną atmosferę pracy w ich laboratorium;

mgr inż. Rafałowi Podgórskiemu za współpracę w ramach oznaczeń cytotoksyczności oraz obserwacji z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego;

dr hab. Waldemarowi Tomaszewskiemu, prof. PW za współpracę w analizie SEC;

mgr inż. Aleksandrze Kuźmińskiej i dr inż. Ilonie Łojczyk za oznaczenia aktywności hemolitycznej;

dr n. med. Annie Zabost za oznaczenia aktywności moich materiałów wobec klinicznych szczepów bakterii, w tym Mycobacterium;

prof. dr hab. inż. Tomaszowi Ciachowi za możliwość wykonania oznaczeń aktywności hemolitycznej oraz cytotoksyczności, a także prof. dr hab. n. med. Ewie Augustynowicz-Kopeć za możliwość wykonania oznaczeń z użyciem klinicznych szczepów bakterii.

Chciałbym również podziękować wszystkim studentom z którymi miałem okazję współpracować w ramach dyplomów inżynierskich, magisterskich i wolontariatu naukowego za ich wkład w powstanie części wyników eksperymentalnych, a także wszystkim pozostałym osobom, które pomagały mi w trakcie studiów doktoranckich.

Streszczenie

Wprowadzenie na rynek antybiotyków zrewolucjonizowało współczesną medycynę ratując życie milionów ludzi. Jednakże nadużywanie ich w leczeniu chorych oraz rolnictwie doprowadziło do rozprzestrzenienia się antybiotykooporności wśród bakterii. Zjawisko to może doprowadzić do poważnego, globalnego kryzysu zdrowotnego. Obecnie na całym świecie prowadzone są badania nad nowymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi, do których należą między innymi cząsteczki zaburzające strukturę błony komórkowej. Grupy te obejmuje między innymi peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs) oraz ich syntetyczne analogi (SMAMPs). W swojej rozprawie skupiłem się na SMAMPs głównie ze względu na obiecujące właściwości biologiczne oraz łatwość ich syntezy. Związki te są amfifilowymi polikationami, które oddziałują z anionową dwuwarstwą fosfolipidową bakterii poprzez oddziaływania elektrostatyczne oraz hydrofobowe. Prowadzi to do zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej i w konsekwencji do śmierci komórki. Mechanizm ten, oparty na wielu niespecyficznych oddziaływaniach, jest mniej podatny na wykształcenie przez bakterie oporności. Niestety, wiąże się on ze stosunkowo niską selektywnością działania tych związków, dlatego też potrzebne są dalsze badania w celu znalezienia SMAMPs mogących stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych antybiotyków. Na podstawie przeglądu literatury zidentyfikowałem jony, polikationy o ładunku dodatnim wbudowanym w łańcuch główny, będące czwartorzędowymi solami amoniowymi jako szczególnie interesujące ze względu na ich silną aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz niską hemolityczność. Aby lepiej poznać zależność struktura-aktywność tych związków, zaprojektowałem oraz zsyntetyzowałem bibliotekę 27 różnych jonenów. Różnice strukturalne w obrębie biblioteki miały pozwolić mi na systematyczne zbadanie wpływu hydrofobowości i dodatkowego silnie hydrofilowego fragmentu PEG, a także sztywności i izomerii łańcucha głównego (w znaczeniu izomerii *meta/para* pierścienia benzenowego) na aktywność. Otrzymane polikationy scharakteryzowałem z użyciem spektroskopii ^1H NMR, chromatografii wykluczenia (SEC), analizy elementarnej, a także poprzez wyznaczenie krytycznego stężenia agregacji (CAC) oraz zeta-potencjału agregatów.

Wyniki oznaczeń minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC), oraz bakteriobójczego (MBC) i grzybobójczego (MFC) wobec modelowym organizmom wyraźnie wskazują na spadek aktywności wraz ze wzrostem hydrofobowości i sztywności jonenów. Izomeria natomiast wywarła pomijalnie mały efekt. Badania nad kinetyką zabijania bakterii wykazały, że otrzymane polimery zabijają 99,9% bakterii w ciągu godzinnych już w stężeniach

równych 1 x MIC lub 2 x MIC. Rozszerzenie badań o izolowane szczepy szpitalne, w tym *Mycobacterium*, udowodniły wysoką aktywność wobec patogennych bakterii. Intrygującą obserwacją jest niska aktywność hemolityczna hydrofilowych jonenów w połączeniu z wysoką aktywnością wobec bakterii. Większość z badanych związków okazała się być silnie cytotoksyczna, jednakże wbudowanie do struktury fragmentu PEG wyraźnie ją obniża i w niewielkim stopniu wpływa na aktywność wobec *Staphylococcus aureus*, w tym MRSA, prowadząc do poprawy selektywności działania. Struktura niektórych z otrzymanych polikationów jest dogodnym punktem wyjścia do dalszych badań.

Wyniki badań nad mechanizmem działania z wykorzystaniem całych komórek bakterii wykazały zdolność jonenów do depolaryzacji błony komórkowej, a także zwiększenia przepuszczalności dla dekstranu. Dzięki mikroskopii zauważyłem agregację komórek *Escherichia coli* pod wpływem hydrofilowych jonenów, co nie nastąpiło po inkubacji z hydrofobowymi pochodnymi. Ponadto, hydrofilowe efektywniej neutralizują zeta-potencjał powierzchni bakterii. Obserwacje te mogą służyć jako wyjaśnienie silniejszej aktywności hydrofilowych jonenów. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem dwuskładnikowych liposomów, jako modelowej dwuwarstwy, doprowadziły do wniosku, że kardiolipina (CL) oraz fosfolipidy o ujemnej krzywiznie (np. PE) są składnikami dwuwarstwy warunkującymi jej podatność na destruktywne działanie hydrofilowych jonenów. Jako wytłumaczenie tego faktu zaproponowałem formowanie się kompleksu CL-jonen, który charakteryzuje się silnie ujemną krzywizną. Natomiast hydrofobowe jony są aktywne wobec wszystkich testowanych liposomów, nawet tych złożonych tylko ze zwitterjonowych lipidów. Jednakże są one w stanie uszczelnić dwuwarstwę zawierającą lipidy o ujemnej krzywiznie (np. PE) w warunkach wysokiego stosunku polimeru do lipidów (P/L). Proponowanym przeze mnie wyjaśnieniem tego zjawiska jest kompensacja ujemnej krzywizny lipidów przez hydrofobowe jony o silnie dodatniej wewnętrznej krzywiznie. Może ono tłumaczyć słabszą aktywność hydrofobowych jonenów w porównaniu z hydrofilowymi.

Wyniki przedstawione w ramach niniejszej rozprawy pozwalają na lepsze poznanie i zrozumienie aktywności jonenów, w szczególności pod kątem zależności struktura-aktywność tych związków oraz wpływu składu lipidowego dwuwarstwy na jej podatność wobec polikationowych czynników przeciwdrobnoustrojowych.

Słowa kluczowe: polikation, jonen, przeciwdrobnoustrojowe, błona komórkowa, dwuwarstwa fosfolipidowa, liposomy, kardiolipina

Summary

Antibiotics have revolutionized modern medicine saving lives of millions worldwide. However, an overuse of these compounds in health care and agriculture caused a spread of antibiotic resistance, which may lead to serious global health crisis. Therefore, substantial research efforts are devoted worldwide to search for new antimicrobial agents. Promising molecules are membrane lytic compounds, e.g. antimicrobial peptides (AMPs) and synthetic mimics of AMPs (SMAMPs). In my thesis I focused on the SMAMPs due to their attractive biological activity and easy synthetic access to variety of molecular structures. Those are amphiphilic polycations which may interact with an anionic bacterial lipid bilayer by both electrostatic and hydrophobic interactions. It leads to a bilayer permeabilization and, in consequence, to a cell death. Such mechanism of action, based on many unspecific interactions, is less susceptible to resistance development. Unfortunately, it has also a serious drawback - most of studied membrane lytic compounds are highly hemolytic and cytotoxic. Therefore, further studies are still needed to find a polycationic structure showing selective activity toward microbes. Ionenenes based on quaternary ammonium salts, a class of polycations containing a cationic moiety incorporated to a polymeric mainchain, are especially interesting due to their high antimicrobial activity coupled with low hemolytic activity. To get better insight into a structure-activity relationship of the ionenes I have designed and synthesized a library of 27 different structures. The library contains five series of ionenes which differ among each other in term of mainchain flexibility and isomerism (as benzene isomerism *meta* and *para*), and a presence of strongly hydrophilic short oligomer of poly(ethylene glycol) (PEG). Ionenenes within each series differ in their hydrophobicity modulated by length of an alkyl side chain. Synthesized compounds were characterized by means of NMR spectroscopy, size-exclusion chromatography (SEC), elemental analysis, critical aggregation concentration and zeta-potential.

Antibacterial activity of ionenes toward model microorganisms (*E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*) were determined in terms of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC and MFC) and a kinetic of killing. The most important conclusions are a drop of the activity along with a hydrophobicity increase, higher activity of more flexible polycations and negligible impact of a main-chain isomerism. Most of compounds kill more than 99.9% of bacteria at concentration of 1 x MIC or 2 x MIC within 1 hour. The studies were extended to clinically isolated strains, including *Mycobacterium* species, which have revealed a high activity of investigated ionenes toward pathogenic bacteria.

Interestingly, the most potent ionenes display low hemolytic activity accompanied with very high cytotoxicity. Incorporation of short PEG moiety strongly reduces cytotoxicity and shows low impact on activity toward gram-positive *S. aureus*, including MRSA, improving an overall selectivity. Hence, structures of some presented herein polycations seem to be an excellent starting molecules for further optimization toward new antibiotics.

To understand a mechanism of action of ionenes, especially an activity toward phospholipid bilayer, I have performed mechanistic studies using both whole bacterial cells and liposomes. Obtained data indicate that ionenes induce depolarization of a bacterial membrane and allow dextran molecules to pass through it. A microscopic observation has revealed an aggregation of *E. coli* cells after treatment with a relatively hydrophilic ionene, in contrast to hydrophobic one. Moreover, the hydrophilic ionene neutralizes zeta-potential of bacterial cells more efficiently. The aggregation ability may be used as an explanation of higher antibacterial potency of hydrophilic ionenes in comparison with the hydrophobic molecules. Studies on liposomes comprising well-defined binary phospholipid mixtures have revealed that cardiolipin (CL) accompanied by other phospholipids with negative intrinsic curvature (e.g. PE) are important components of a lipid bilayer for membrane lytic activity of strongly hydrophilic ionenes. I explained it by formation of CL-ionenes complex characterized by a strong negative intrinsic curvature. In turn, hydrophobic ionenes are active toward all studied lipid compositions, including also zwitterionic bilayers. However, those can seal liposomes containing lipids with negative curvature, like PE, at high polymer to lipid ratio (P/L). The phenomena was explained by compensation of lipids negative curvature with hydrophobic ionenes characterized by a strongly positive intrinsic curvature. The sealing at high P/L ratio by hydrophobic ionenes, and lack of such effect in case of hydrophilic ones, may serve as a next potential explanation of their higher activity.

Results presented in my thesis contribute to understanding of ionenes antimicrobial activity, especially in terms of the structure-activity relationship and bilayer lipid composition.

Keywords: polycation, ionene, antimicrobial, cell membrane, phospholipid bilayer, liposome, cardiolipin

Spis treści

Streszczenie	5
Summary	7
Wykaz użytych skrótów i symboli	12
I. Wstęp i cel pracy	15
II. Przegląd literatury	18
1. Błona komórkowa.....	18
1.1. Budowa otoczki komórkowej.....	18
1.2. Dwuwarstwy fosfolipidowa	20
1.2.1. Struktura fosfolipidów	20
1.2.2. Skład fosfolipidowy dwuwarstwy różnych mikroorganizmów.....	23
2. Wielkocząsteczkowe MTAC	24
2.1. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs)	25
2.2. Syntetyczne polikationy naśladujące AMPs (SMAMPs).....	26
2.3. Mechanizm działania AMPs i SMAMPs	28
3. Skład lipidowy, a selektywność działania AMPs i SMAMPs.....	30
4. Wielkości charakteryzujące właściwości biologiczne AMPs i SMAMPs.....	32
5. Metodyka badań mechanizmu działania MTAC.....	34
5.1. Wybrane metody z wykorzystaniem całych komórek.....	34
5.1.1. Depolaryzacja błony komórkowej.....	35
5.1.2. Iodek propidyny.....	36
5.1.3. Znakowane fluoresceiną dekstrany o różnej masie molowej	37
5.1.4. Obecność makrocząsteczek z cytoplazmy w supernatancie.....	38
5.1.5. Mikroskopia elektronowa	38
5.1.6. Zeta-potencjał komórek bakteryjnych.....	39
5.2. Wybrane metody z wykorzystaniem liposomów.....	39
5.2.1. Liposomy wypełnione barwnikiem fluorescencyjnym.....	40
5.2.2. Badania techniką DLS	41
5.2.3. Mikroskopia elektronowa	42
6. Struktura polikationów, a ich aktywność biologiczna.	43
6.1. Architektura (położenie grupy hydrofobowej względem kationowej).....	44
6.2. Równowaga lipofilo-hydrofilowa	46
6.3. Grupa końcowa, polikationy telecheliczne.....	48
6.4. Dodatek nienaładowanej hydrofilowej grupy bocznej	50
6.5. Średnia masa molowa.....	50
6.6. Rodzaj i gęstość grup kationowych.....	52
6.7. Struktura łańcucha głównego SMAMPs	54
6.7.1. Sztywność.....	54
6.7.2. Izomeria położenia	55
7. Aktywność biobójcza jonenów	56

III. Wnioski z badań literatury i założenia pracy	60
IV. Badania własne i analiza wyników	62
8. Struktura, synteza oraz charakterystyka polikationów	62
8.1. Plan biblioteki polikationów opartej na strukturze L-PEI (badania nad stabilnością jonenów o dużej gęstości ładunku dodatniego).....	62
8.1.1. Koncepcja biblioteki jonenów, będących pochodnymi L-PEI	62
8.1.2. Badania nad stabilnością Me ₂ -L-PEI i jej niskocząsteczkowych analogów.....	64
8.1.3. Podsumowanie podrozdziału 8.1	72
8.2. Plan biblioteki polikationów zawierającej pierścień aromatyczny oraz koncepcja syntezy ..	73
8.3. Synteza monomerów	76
8.3.1. Bromki 15-Cn	76
8.3.2. Aminy 16 - 19.....	77
8.2.3. Amina 20 z grupą PEG	78
8.4. Synteza i charakterystyka polimerów	79
8.4.1. Badania nad reakcją poliaddycji - synteza głównej biblioteki jonenów.....	79
8.4.2. Badania nad reakcją poliaddycji - synteza jonenów p-T-p-T i p-D-p-D	84
8.4.3. Synteza i charakterystyka jonenów wykorzystanych w dalszych badaniach	85
8.4.4. Krytyczne stężenie agregacji oraz zeta potencjał otrzymanych jonenów.....	88
9. Badania biologiczne otrzymanych jonenów	91
9.1. Oznaczenia mikrobiologiczne	91
9.1.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wobec mikroorganizmów z ATCC	91
9.1.2. Aktywność przeciwko szczepom klinicznym bakterii, w tym Mycobacterium	101
9.1.3. Kinetyka zabijania bakterii S. aureus i E. coli z ATCC	104
9.2. Badania biokompatybilności	107
9.2.1. Właściwości hemolityczne	107
9.2.2. Cytotoksyczność.....	109
10. Badania nad mechanizmem działania	112
10.1. Badania na komórkach bakterii	112
10.1.1. Depolaryzacja błony komórkowej S. aureus	112
10.1.2. Badania z wykorzystaniem FITC-dekstranu oraz fluorescencyjnego mikroskopu skaningowego	114
10.1.3. Zmiana zeta-potencjału bakterii pod wpływem jonenów	116
10.2. Badania na liposomach.....	117
10.2.1. Metodyka badań na liposomach.	117
10.2.2. Wpływ hydrofobowości jonenów na oddziaływanie z liposomami	121
10.2.3. Wpływ elastyczności łańcucha głównego jonenów na oddziaływanie z liposomami.	133
10.2.4. Wpływ dodatkowej hydrofilowej grupy bocznej (oPEG) na oddziaływanie jonenów z liposomami.	134
11. Podsumowanie	136
V. Część eksperymentalna	139
12. Wykaz użytych materiałów	139
13. Synteza chemiczna.....	141

13.1. Analiza otrzymanych związków.....	141
13.2. Synteza związków niskocząsteczkowych.....	143
13.3. Synteza polimerów	153
14. Badania nad kinetyką reakcji eliminacji Hofmanna soli amoniowych	160
15. Badania nad wpływem jonenów na fluorescencję kalceiny	161
16. Badania na liposomach	161
16.1. Przygotowanie liposomów	161
16.2. Badania na LUV	162
17. Badania biologiczne.....	164
17.1. Oznaczenia MIC, MBC, MFC i kinetyki zabijania	164
17.2. Badania nad cytotoksycznością	166
17.3. Badania nad mechanizmem działania	167
Bibliografia	169
Spis rysunków	183
Spis schematów	187
Artykuły własne i samodzielność pracy	189
Artykuły włączone w rozprawę doktorską	189
Opublikowane	189
W recenzji.....	190
W przygotowaniu	190
Artykuł nie włączony w rozprawę doktorską	190
Samodzielność pracy	191
Załącznik 1. Widma ^1H NMR wykorzystane w badaniach nad kinetyką eliminacji Hofmanna.....	192
Załącznik 2. Reprezentatywne widma ^1H NMR otrzymanych jonenów	201
Załącznik 3. Przykład surowych danych DLS dotyczących oddziaływania jonenów z LUVs	204

Wykaz użytych skrótów i symboli

AMPs	- peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. <i>antimicrobial peptides</i>)
AROMP	- naprzemienna metatyczna polimeryzacja cykloolefin (ang. <i>alternating ring opening metathesis polymerization</i>)
ATCC	- Amerykańska Kolekcja Linii Komórkowych (ang. <i>American Type Culture Collection</i>)
B-PEI	- rozgałęziona polietylenoimina (ang. <i>branched polyethylenimine</i>)
Bzl	- grupa benzyłowa
C ₀	- spontaniczna wewnętrzna krzywizna
CFU	- liczba jednostek tworzących kolonię (ang. <i>colony-forming unit</i>)
CL	- kariolipina
C _n	- C _n H _{2n+1}
DABCO	- 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DCM	- dichlorometan
DiSC ₃ (5)	- jodek 3,3'-di-propylo-tiakarboocyanianu (ang. <i>3,3-dipropylthiadicarbocyanine iodide</i>)
DLS	- dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>dynamic light scattering</i>)
D _M	- dyspersyjność
DMEM	- pożywka Eagle'a z modyfikacją Dulbecco (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMF	- dimetyloformamid
DMSO	- dimetylosulfotlenek
DP	- stopień polimeryzacji (ang. <i>degree of polymerization</i>)
EcLE	- ekstrakt lipidowy z <i>E. coli</i> (ang. <i>E. coli total lipid extract</i>)
ED ₅₀	- dawka efektywna (ang. <i>effective dose</i>)
EWG	- grupa odciągająca elektrony (ang. <i>electron withdrawing group</i>)
FBS	- płodowa surowica bydlęcia (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
FITC-dekstran	- dekstran znakowany izotiocyjanianem fluoresceiny
GUV	- olbrzymie jednowarstwowe liposomy (ang. <i>giant unilamellar vesicles</i>)
HC ₅₀	- stężenie powodujące lizę 50% RBCs (ang. <i>hemolytic concentration</i>)
HDPs	- peptydy ochronne gospodarza (ang. <i>host-defense peptides</i>)
H _{II}	- odwrócona faza heksagonalna
H _I	- normalna faza heksagonalna
HLB	- równowaga hydrofilo-lipofilowa (ang. <i>hydrophilic-lipophilic balance</i>)
IC ₅₀	- stężenie hamujące wzrost komórek o 50% (ang. <i>inhibitory concentration</i>)
IP	- jodek propidyny
J _s	- krzywizna wewnętrzna

L	- faza lamelarna fosfolipidów (dwuwarstwa)
LAH	- glinowodorek litu
LD ₅₀	- dawka śmiertelna (ang. <i>lethal dose</i>)
LDH	- dehydrogenaza mleczanowa (ang. <i>lactate dehydrogenase</i>)
L-PEI	- liniowa polietylenoimina
LPS	- lipopolisacharyd
LUVs	- duże jednowarstwowe liposomy (ang. <i>large unilamellar vesicles</i>)
lysyl-PG	- PG modyfikowany resztą lizyny
MBC	- minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. <i>minimum bactericidal concnetration</i>)
MBC _{MHB}	- MBC oznaczone w MHB
MBC _{PBS}	- MBC oznaczone w PBS
Me ₂ -L-PEI	- wyczerpująco metylowana L-PEI
Me ₂ -L-PEI _{ru}	- jednostka powtarzalna Me ₂ -L-PEI (ang. <i>Me₂-L-PEI repeating unit</i>)
MeCN	- acetonitrylu
Me-L-PEI	- monometylowana L-PEI w postaci aminy trzeciorzędowej
MFC	- minimalne stężenie grzybobójcze (ang. <i>minimum fungicidal concnetration</i>)
MFC _{PBS}	- MFC oznaczone w PBS
MFC _{SAB}	- MFC oznaczone w SAB
MHB	- podłoże ciekłe Mueller-Hinton (ang. <i>Mueller-Hinton Broth</i>)
MIC	- minimalne stężenie hamujące wzrost (ang. <i>minimum inhibitory concentration</i>)
M _n , NMR	- Średnia liczbowo masa molekularna oznaczona poprzez ¹ H NMR
M _n , SEC	- Średnia liczbowo masa molekularna oznaczona poprzez SEC
MRSA	- oporny na metycylinę <i>S. aureus</i> (ang. <i>methicillin-resistant S. aureus</i>)
MTAC	- związki przeciwdrobnoustrojowe atakujące błonę (ang. <i>membrane-targeting antimicrobial compounds</i>)
OD ₆₀₀	- gęstość optyczna/absorbancja dla 600 nm (ang. <i>optical density</i>)
oPEG	- oligomer PEG'u w postaci eteru trój(tlenku etylenu)
P/L	- stosunek polimeru lub peptydu do lipidów
PA	- kwas fosfatydylowy
PBS	- bufor fosforanowy z dodatkiem 130 mM NaCl (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PC	- fosfatydylocholiny
PE	- fosfatydyloetanoloamina
PEG	- poli(tlenek etylenu) (ang. <i>polyethylene glycol</i>)
PEI	- polietylenoimina
PG	- fosfatydyloglicerol
PGMB	- poli(heksametyleno-bi-guanidyna); poliheksanid
PHMG	- poli(heksametyleno-guanidyna)

PI	- fosfatydyloinozytol
PMOX	- polioksazolina metylowa (ang. <i>poly(methyl oxazoline)</i>)
POPC	- PC z resztą kwasu kwasu palmitynowego oraz oleinowego (ang. <i>1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine</i>)
POPE	- PE z resztą kwasu kwasu palmitynowego oraz oleinowego (ang. <i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i>)
POPG	- PG z resztą kwasu kwasu palmitynowego oraz oleinowego (ang. <i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)</i>)
PS	- foafatydyloseryna
r.u.	- jednostka powtarzalna polimeru (ang. <i>repeating unit</i>)
RBCs	- czerwone krwinki, erytrocyty (ang. <i>red blood cells</i>)
ROMP	- metatyczna polimeryzacja cykloolefin (ang. <i>ring opening methathesis polymerization</i>)
SAB	- podłoże ciekłe Sabouraud (ang. <i>Sabouraud broth</i>)
SEC	- chromatografia wykluczenia (ang. <i>size-exclusion chromatography</i>)
SEM	- skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>scanning electron microscopy</i>)
SM	- sfingomielina
SMAMPs	- syntetyczne związki imitujące peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. <i>synthetic mimic of antimicrobial peptides</i>)
SUV	- małe jednowarstwowe liposomy (ang. <i>small unilamellar vesicles</i>)
TEM	- transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>transmission electron microscopy</i>)
THF	- tetrahydrofuran
TMA	- trimetyloamina
TMEDA	- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloetylenodiamina
TOCL	- CL z czterema resztami kwasu oleinowego (ang. <i>1',3'-bis[1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho]-glycerol</i>)
ζ	- potencjał zeta (potencjał elektrokinetyczny)

I. Wstęp i cel pracy

Antybioza, antagonizm pomiędzy mikroorganizmami, jest zjawiskiem powszechnie występującym w przyrodzie. Istnieją doniesienia literaturowe, że zjawisko to w sposób nieświadomy było wykorzystywane już w antycznych Chinach, Egipcie i Grecji do zwalczania infekcji. Dopiero w XIX wieku stopniowo zaczęto uświadamiać sobie istnienie mikroorganizmów jako czynników odpowiedzialnych za wiele chorób, a naukowcem, który ostatecznie udowodnił, że choroby przenoszone są przez bakterie był Robert Koch. Odkrywając obecność bakterii zaczęto obserwować również, że ich wzrost jest zatrzymywany w obecności niektórych pleśni. W 1877 roku Pasteur razem z Joubertem wykazali, że bakterie *Bacillus anthracis* nie przeżywają, gdy są hodowane razem z pleśnią *Penicillium glaucum*. Możliwość zastosowania tego zjawiska w zwalczaniu infekcji bakteryjnych została opisana po raz pierwszy w 1897 roku w rozprawie doktorskiej Ernsta Duchesne,¹ który wykazał, że świnki morskie zainfekowane *Escherichia coli* lub *Salmonella typhi* przeżywają po podaniu zawiesiny pleśni *P. glaucum*. Niestety praca ta bez odpowiedniego rozgłosu została zapomniana na wiele lat. W 1928 roku Aleksander Fleming, według legendy w sposób przypadkowy, zaobserwował brak wzrostu gronkowców w obrębie kolonii pleśni *Penicillium rubens* oraz wykazał, że ekstrakt z tych mikroorganizmów ma działania przeciwbakteryjne. Po 10 latach od tego wydarzenia określono strukturę czynnika przeciwbakteryjnego - penicyliny - oraz opracowano metodę jego produkcji na masową skalę.²

Pierwszym komercyjnie dostępnym antybiotykiem był Salvarsan opracowany w 1909 roku przez Ehrlich'a, który stosowano w leczeniu kiły. Jego twórca wprowadził koncepcję „magicznego pocisku” (ang. *magic bullet*) ze względu na wysoką, jak na ówczesne standardy, selektywność działania.^{2,3} Kolejnym syntetycznym antybiotykiem była wprowadzona na rynek w 1935 roku pochodna sulfamidu o handlowej nazwie Prontosil, który jest aktywny przeciwko wielu bakteriom gram-dodatnim.² Jednakże największym przełomem okazało się wprowadzenie do sprzedaży w 1940 roku odkrytej przez Fleminga penicyliny, pierwszego niezwykle skutecznego antybiotyku o szerokim spektrum działania, który ratował życie milionów ludzi rocznie.^{4,5} Moment ten zrewolucjonizował ówczesną medycynę i zapoczątkował „złotą erę antybiotyków”. W tym okresie prowadzono intensywne badania nad poszukiwaniem nowych antybiotyków, zarówno syntetycznych jak i tych produkowanych przez pleśnie, poznaniem mechanizmu ich działania, a także chemicznymi modyfikacjami w celu poprawy aktywności.

Antybiotyki zawdzięczają swój spektakularny sukces bardzo wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej przy jednoczesnym bardzo rzadkim występowaniu poważnych skutków ubocznych. Cecha ta wiąże się ze specyficznym mechanizmem działania, tzn. związki te oddziałują selektywnie z celem molekularnym w komórce bakteryjnej, który nie jest obecny w komórkach eukariotycznych lub budowa tego celu znacząco różni się pomiędzy organizmami. Jednakże jest ona również powodem łatwości nabycia oporności populacji bakterii na dany antybiotyk. Może się to odbywać poprzez niewielkie zmiany strukturalne w cząsteczce enzymu, będącego celem ataku antybiotyku, uniemożliwiające ich wzajemne oddziaływanie lub obejście zablokowanego enzymu innym szlakiem metabolicznym. Pozostałymi możliwymi mechanizmami antybiotykooporności są m. in. produkcja enzymów rozkładających antybiotyków, obecność pomp usuwających antybiotyki z wnętrza komórki oraz modyfikacje struktur, przez które antybiotyk wnika do komórki. Stosowanie antybiotyków w sposób, który nie skutkuje uśmierceniem całej populacji bakterii prowadzi do selekcji osobników posiadających cechę, która obniża ich podatność na dany czynnik przeciwbakteryjny. Taka presja ewolucyjna istnieje w przyrodzie od setek milionów lat, jednakże wprowadzenie antybiotyków do masowego użytku znacząco zwiększyło intensywność i powszechność występowania tego zjawiska na całym świecie. Biorąc pod uwagę niezwykle krótki czas generacji bakterii, w przybliżeniu 30 minut, w ciągu 5-dniowej infekcji w organizmie człowieka powstanie 240 pokoleń. Jeżeli antybiotykoterapia będzie prowadzona w sposób niewłaściwy, każde kolejne pokolenie będzie wykazywać wyższą oporność na dany antybiotyk.^{6,7}

Już w 1945 roku sam A. Fleming ostrzegał, że niekontrolowane i nieodpowiednie używanie antybiotyków szybko doprowadzi do spadku ich skuteczności. Jednakże bardzo wysoka skuteczność oraz dostępność antybiotyków spowodowała eksplozję ich zastosowań. Zaczęto używać ich głównie w medycynie, gdzie były przepisywane przez lekarzy nawet bez upewniania się, że pacjent przechodzi infekcję bakteryjną. Bardzo szybko wprowadzono je także do przemysłu w celu poprawy wzrostu zwierząt hodowlanych poprzez zapobieganie ich chorobom, co wiąże się z niekontrolowanym przedostawaniem się dużych ilości antybiotyków do środowiska naturalnego. W efekcie coraz częściej spotykane są infekcje wywołane przez patogeny odporne na najczęściej stosowane antybiotyki.⁵

Szacuje się, że z powodu tych infekcji każdego roku umiera na całym świecie ok. 700 tysięcy ludzi i liczba ta rośnie z roku na rok. W raporcie opublikowanym przez J. O'Neill w 2016 roku stwierdzono, że do 2050 roku może osiągnąć nawet 10 milionów, jeżeli nie zostaną podjęte stosowne działania.⁸ Autorzy raportu podejrzewają, że liczba ta prawdopodobnie jest

zanizowana, ponieważ nie uwzględnia wtórnych efektów utraty skuteczności antybiotyków. Należą do nich m. in. zwiększone ryzyko powikłań po rutynowych zabiegach chirurgicznych, takich jak cesarskie cięcie, wstawianie implantów czy usunięcie wyrostka robaczkowego. W momencie w którym piszę ten fragment mojej rozprawy, tj. październik 2021, liczba zgonów spowodowanych wirusem COVID-19 na świecie osiągnęła 4,8 mln w ciągu około półtora roku jego rozprzestrzeniania się.⁹ Uświadamia nam to, jak duże zagrożenie niesie ze sobą pojawienie się nowych, zjadliwych czynników chorobotwórczych, na które nie mamy jeszcze opracowanego skutecznego leku. Jednym z wielu możliwych działań mających na celu zapobiegnięcie takiej sytuacji z antybiotykoodpornymi bakteriami jest poszukiwanie nowych czynników przeciwdrobnoustrojowych, ze szczególnym naciskiem na badania nad substancjami, które wykazują mechanizm działania odmienny od obecnie używanych.^{4,10}

Niestety, po początkowych sukcesach w odkrywaniu nowych antybiotyków, poszukiwanie kolejnych skutecznych klas czynników przeciwbakteryjnych okazało się być znacznie trudniejsze, co podnosi koszty prowadzenia nad nimi badań. Ponadto krótki czas trwania antybiotykoterapii, poniżej dwóch tygodni, sprawia, że zysk z ich sprzedaży jest stosunkowo niewielki. Jest to jedną z głównych przyczyn dla których firmy farmaceutyczne zmniejszyły intensywność prac w tym kierunku i skupiają się głównie na lekach związanych z chorobami chronicznymi oraz nowotworowymi.^{7,11,12} Tendencja ta jest doskonale odzwierciedlona w ilości nowych antybiotyków zatwierdzonych do użytku przez Amerykańską Agencję do Spraw Ochrony Leków i Żywności (FDA, ang. *US Food and Drugs Administration*) w ciągu ostatnich 30 lat. W latach 1983-1987 było to 16 związków, 1993-1997 było 10 związków, natomiast w latach 2003-2007 już tylko 6 związków.⁷ Według raportu WHO z 2017 roku, w ciągu kolejnych 5 lat FDA miało zaakceptować ok. 10 nowych czynników przeciwbakteryjnych, jednakże ich użyteczność w walce z lekoopornymi bakteriami została oszacowana jako niewielka, głównie ze względu na brak innowacyjnego mechanizmu działania.⁴

Obecnie, główną siłą napędową badań nad innowacyjnymi metodami walki z infekcjami bakteryjnymi są akademickie ośrodki badawcze finansowane ze źródeł publicznych.¹⁰ Prowadzone badania dotyczą między innymi terapii fagowych, wykorzystania przeciwciał, nowych probiotyków, przeszczepu mikroflory jelitowej, przeciwbakteryjnych oligonukleotydów oraz związków przeciwdrobnoustrojowych atakujących błonę komórkową (MTAC, ang. *membrane-targeting antimicrobial compounds*).¹³ Każde z tych podejść jest już w pewnym stopniu testowane w leczeniu lekoopornych infekcji, jednakże opracowanie terapii

o równej łatwości i bezpieczeństwie stosowania, a także szerokim spektrum działania porównywalnym do dotychczas używanych antybiotyków, wymaga jeszcze znacznego wysiłku badawczego. Ostatnia grupa, tj. MTAC, w mojej opinii wydaje się mieć duży potencjał, aby w przyszłości spełnić te wymagania.

W ramach mojej rozprawy doktorskiej skupiłem się na polikationach jako przeciwdrobnoustrojowych czynnikach zaburzających strukturę błony komórkowej. Celem moich badań było lepsze poznanie tej grupy związków pod kątem wpływu struktury na ich aktywność biologiczną oraz mechanizm działania. Realizacja tak postawionego celu wymagała przeprowadzenia badań literaturowych, mających na celu zidentyfikowanie luk w wiedzy dotyczącej tej tematyki, a następnie syntezę nowych polikationów i badania nad ich aktywnością biologiczną oraz mechanizmem tej aktywności.

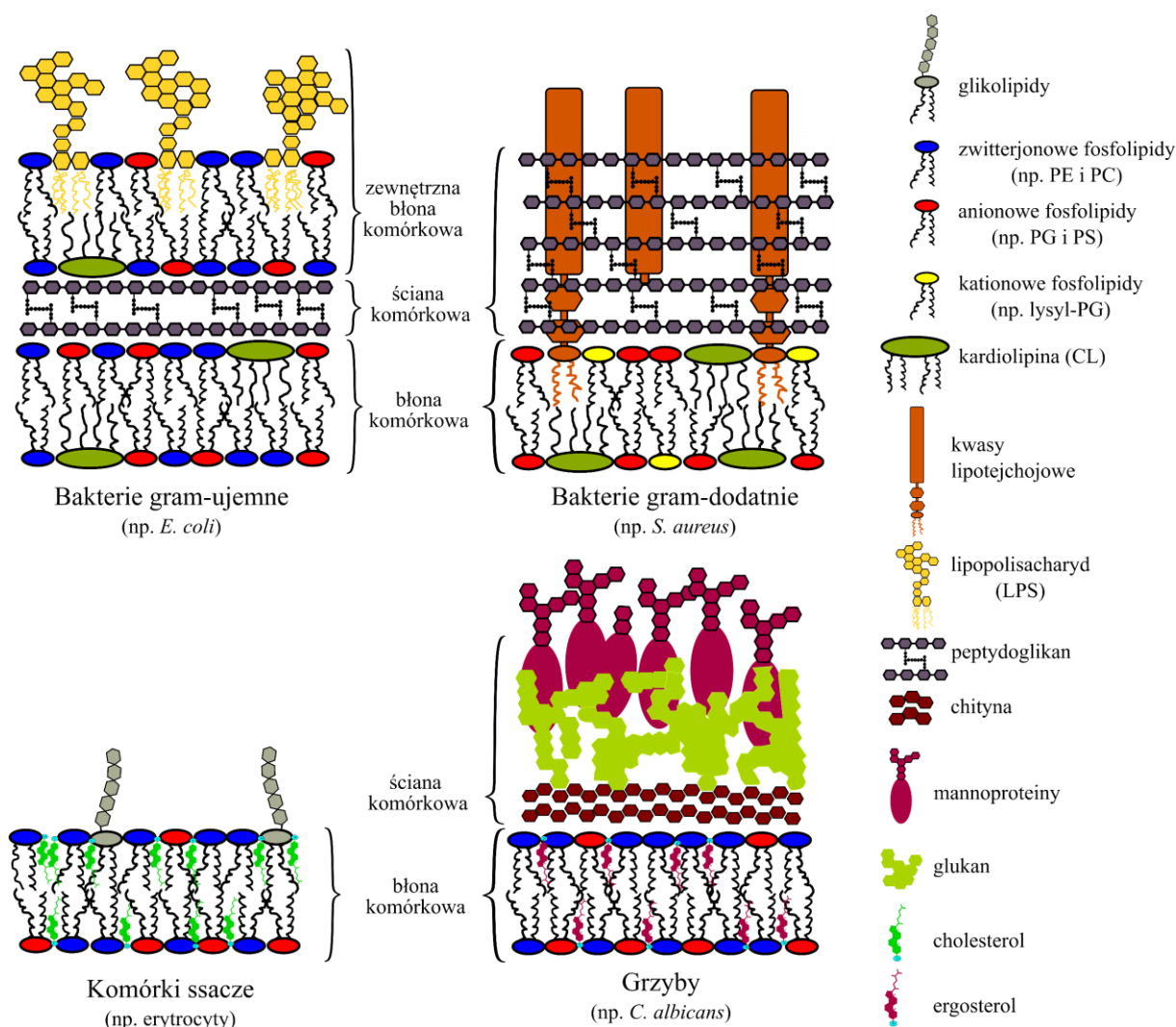
II. Przegląd literatury

1. Błona komórkowa

Postulowanym podstawowym celem dla MTAC jest dwuwarstwa fosfolipidowa, stanowiąca najważniejszy element błony komórkowej odpowiedzialny za jej spójność i integralność.¹⁴ Zanim jednak cząsteczka czynnika przeciwdrobnoustrojowego dotrze do niej musi pokonać przeszkody w postaci pozostałych struktur otaczających komórkę, których budowa różni się znacząco pomiędzy różnymi organizmami. Struktury te mogą oddziaływać z MTAC wpływając tym samym na selektywność i skuteczność działania.¹⁵ Dlatego prowadzenie rozważań na temat aktywności tych związków wymaga znajomości zarówno składu lipidowego dwuwarstwy jak i najważniejszych różnic w budowie otoczki komórkowej różnych organizmów.

1.1. Budowa otoczki komórkowej

Najważniejszą cechą odróżniającą komórki ssaków od bakteryjnych oraz grzybów (tutaj głównie drożdżaków) jest brak ściany komórkowej (Rysunek 1). Najbardziej zewnętrznymi strukturami są reszty cukrowe będące fragmentami glikolipidów oraz glikoprotein.¹⁶



Rysunek 1. Schemat struktur otaczających komórki różnych organizmów sporządzony na podstawie literatury;^{15,17-19} dla przejrzystości pominąłem białka błonowe.

Komórki bakteryjne otoczone są sztywną i porowatą ścianą komórkową zbudowaną z usieciowanego peptydoglikanu, której grubość wynosi 40 - 80 nm dla bakterii gram-dodatnich i 7 - 8 nm dla bakterii gram-ujemnych (Rysunek 1).¹⁵ Odpowiada ona za utrzymanie kształtu bakterii i zapewnia odporność mechaniczną. Średnicę porów w ścianie komórkowej pozbawionej naprężenia oszacowano przy pomocy znakowanego fluorescencyjnie dekstranu, otrzymując odpowiednio 2,12 nm i 2,50 nm dla gram-ujemnej *E. coli* i gram-dodatniej *B. subtilis*. Rozmiar ten zapewnia możliwość swobodnej migracji globularnych nienaładowanych cząsteczek o masie 22-24 kDa. Natomiast przez peptydoglikan poddany naprężeniu poprzez szok osmotyczny *E. coli* migrować mogą cząsteczki o masach aż do 100 kDa.²⁰ W grubą ścianę komórkową bakterii gram-dodatnich wbudowane są kwasy tejchojowe, przytwierdzone do samego peptydoglikanu, oraz lipotejchojowe zakotwiczone w błonie komórkowej. Ze względu

na ich anionowy charakter nadają one powierzchni komórki silnie anionowy charakter.^{15,20} Bakterie gram-ujemne charakteryzują się obecnością dodatkowej, zewnętrznej błony komórkowej o asymetrycznej budowie. Jej wewnętrzny listek stanowią fosfolipidy, natomiast zewnętrzny składa się głównie z lipopolisacharydu (LPS) posiadającego, podobnie jak kwasy tejchojowe, silnie anionowy charakter.^{15,17} Dodatkowa błona komórkowa stanowi trudną do pokonania barierę dla hydrofilowych czynników przeciwbakteryjnych, przez co bakterie gram-ujemne są ogólnie mniej podatne na substancje przeciwbakteryjne.^{6,21}

Komórki grzybów chronione są grubą, podwójną ścianą komórkową, której wewnętrzna warstwa zbudowana jest z chityny oraz glukanu, a zewnętrzną stanowią głównie mannoproteiny. Warstwa wewnętrzna pełni funkcje strukturalne, natomiast zewnętrzna charakteryzuje się niską porowatością i przepuszczalnością zabezpieczając komórkę przed czynnikami chemicznymi (np. lekami).¹⁸ Obecność znacznych ilości wiązań fosfodiesterowych, odpowiedzialnych za usieciowanie ściany, nadaje powierzchni komórek grzybów wypadkowy ładunek ujemny.¹⁷

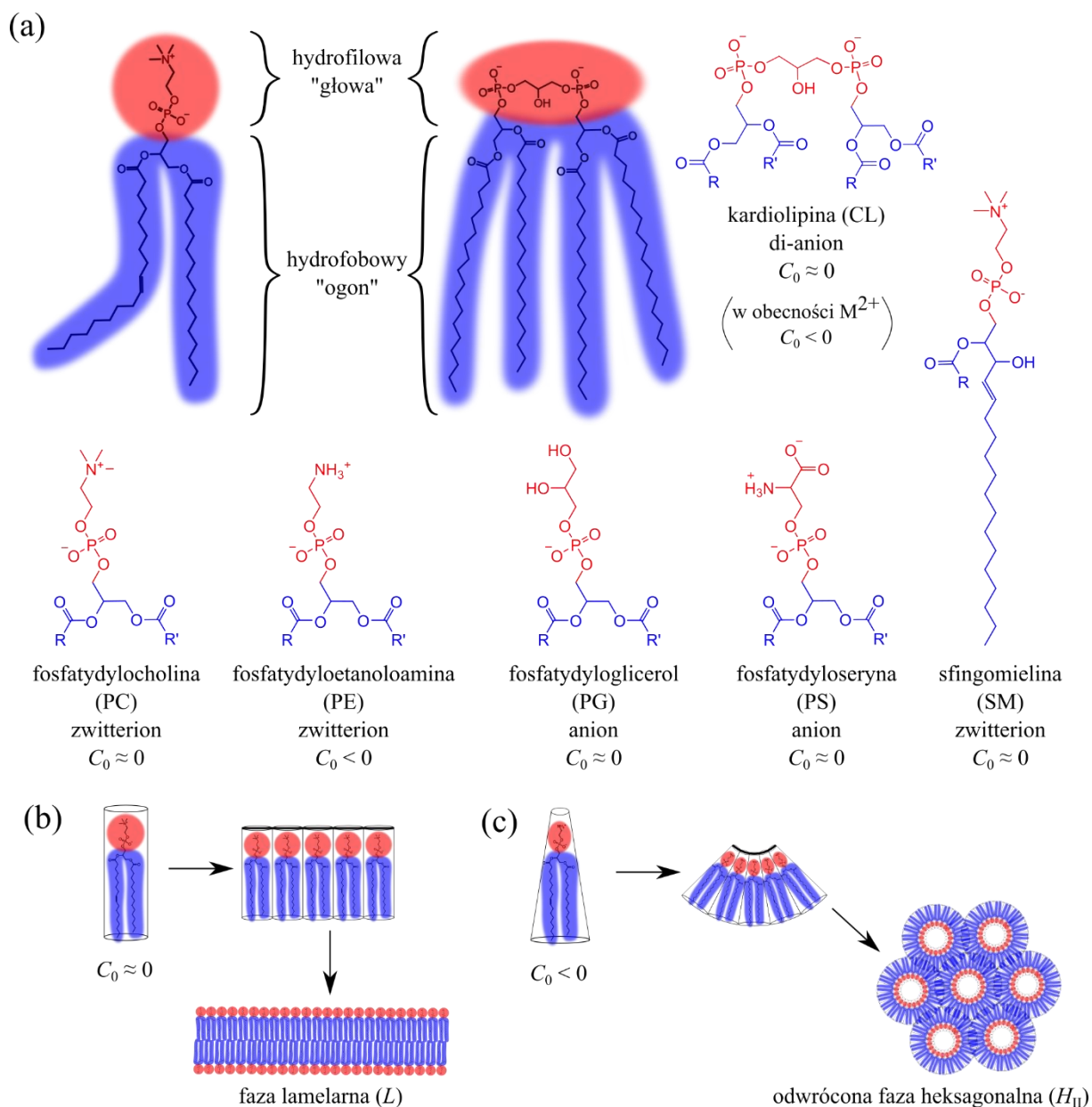
1.2. Dwuwarstwy fosfolipidowa

Wszystkie żywe komórki otoczone są błoną komórkową, która jest podstawową fizyczną barierą oddzielającą życie od otaczającego je świata. Błona komórkowa składa się z dwuwarstwy fosfolipidowej, będącej swoistą półprzepuszczalną membraną zapewniającą jej integralność i spójność, oraz zanurzonych w niej białkach pełniących wiele funkcji niezbędnych dla życia komórki (np. wymiana substancji ze środowiskiem, wytwarzanie energii, reakcje na bodźce). W związku z tym szczelna struktura błony komórkowej jest niezbędna dla zachowania homeostazy komórki i poprawnego przebiegu jej funkcji życiowych.²²

1.2.1. Struktura fosfolipidów

Dwuwarstwę tworzą fosfolipidy w których budowie można wyróżnić część hydrofobową, nazywaną „ogonem” oraz część hydrofilową nazywaną „głową”. Ogon hydrofobowy stanowią cząsteczki kwasów tłuszczowych połączone wiązaniem estrowym z gliceryną, natomiast głowę hydrofilową tworzy przyłączona wiązaniem fosfoestrowym do gliceryny reszta kwasu ortofosforowego, do której z kolei przyłączona jest cząsteczka alkoholu (Rysunek 2a). Wyjątek stanowi kardiolipina zawierająca w swojej cząsteczce cztery grupy kwasów tłuszczowych i dwie grupy fosforanowe, oraz sfingomielina zawierająca sfingozynę zamiast glicerolu. Obecność niewielkiej grupy hydrofilowej i rozbudowanej grupy hydrofobowej nadaje fosfolipidom amfifilowy charakter oraz sprawia, że są nierozpuszczalne w wodzie. Związki te

podczas uwadniania samoczynnie organizują się w dwuwarstwę, jako strukturę pozwalającą na zminimalizowanie ilości oddziaływań ogonów hydrofobowych z wodą, oraz osiągnięcia maksymalnej możliwej powierzchni oddziaływania głów hydrofilowych ze środowiskiem wodnym. Struktura ta jest układem o najniższej możliwej energii.²²



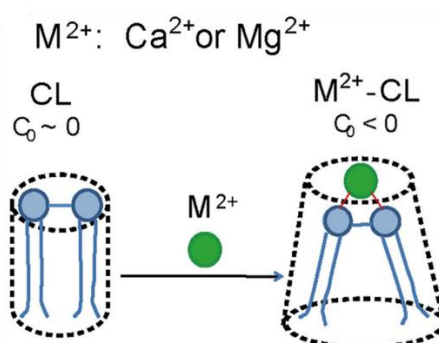
Rysunek 2. (a) Fosfolipidy występujące najczęściej w błonie komórkowej; (b) fosfolipidy o zerowej krzywiznie wewnętrznej tworzą stabilną fazę lamelarną (dwuwarstwę) natomiast o (c) ujemnej odwróconą fazę heksagonalną.

W przyrodzie występuje wiele różnych fosfolipidów różniących się między sobą alkoholem połączonym z grupą fosforanową oraz długością i stopniem nienasycenia kwasów

tłuszczowych. Najczęściej występują kwasy tłuszczowe o 14-18 atomach węgla nie zawierające lub zawierające jedno wiązanie podwójne. Jednakże rodzaj głowy hydrofilowej jest najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za właściwości fosfolipidów. Dzieląc fosfolipidy na podstawie tej struktury można wyróżnić fosfolipidy anionowe, których wypadkowy ładunek fragmentu hydrofilowego jest ujemny. Należą do nich między innymi fosfatydyloglicerol (PG), fosfatydyloseryna (PS) i kardiolipina (CL) (Rysunek 2a). Drugą grupą są fosfolipidy zwitterionowe, których wypadkowy ładunek wynosi zero. Należą do nich np. fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloetanolamine (PE) i sfingomielina (SM). Trzecią grupą są fosfolipidy kationowe, do których należy między innymi PG modyfikowane lizyną (lysyl-PG).²²

Innym ważnym kryterium podziału fosfolipidów jest ich geometria. Fosfolipidy których średnica fragmentu hydrofilowego (razem z otoczką hydratacyjną) jest zbliżona do średnicy fragmentu hydrofobowego mają kształt zbliżony do cylindra (Rysunek 2b). Lipidy te spontanicznie tworzą fazę lamelarną (*L*), której granica międzyfazowa z wodą (ang. *water-lipid interface*) tworzy płaską powierzchnię. O takiej powierzchni mówi się, że jej krzywizna jest zerowa ($C_0 = 0$), w związku z czym spontaniczna krzywizna fosfolipidów, które ją tworzą, jest również bliska zeru ($C_0 \approx 0$). Natomiast ze względu na fakt, że wbudowanie takiego cylindrycznego lipidu w płaską dwuwarstwę nie generuje napięć prowadzących do odgięcia granicy międzyfazowej, krzywizna wewnętrzna tych lipidów również jest bliska zeru ($J_s \approx 0$). Lipidy o znacznie mniejszej średnicy fragmentu hydrofilowego w porównaniu od części hydrofobowej mają w przybliżeniu kształt stożka, dzięki czemu w środowisku wodnym organizują się spontanicznie w odwróconą fazę heksagonalną (*H_{II}*), której granica międzyfazowa odgięta jest w kierunku fazy wodnej (Rysunek 2c). Tworzona powierzchnia charakteryzuje się ujemną krzywizną, w związku z czym fosfolipidy te posiadają ujemną spontaniczną krzywiznę ($C_0 < 0$). Wbudowanie takiego lipidu do płaskiej dwuwarstwy wygeneruje większe ciśnienie w części hydrofobowej niż hydrofilowej, co prowadzi do napięcia wewnątrz dwuwarstwy odginającego powierzchnię granicy faz w kierunku fazy wodnej. Dlatego krzywizna wewnętrzna takich lipidów jest ujemna ($J_s < 0$). Analogiczna sytuacja ma miejsce dla fosfolipidów o dodatniej krzywiznie ($C_0 > 0$, $J_s > 0$), które w wodzie tworzą micelle i normalną fazę heksagonalną (*H_I*).^{23,24} Ze względu na jakościowy charakter prowadzonych przeze mnie rozważań nad strukturą systemów lipidowych, w dalszej części mojej rozprawy używam tylko koncepcji krzywizny spontanicznej (C_0).

Do fosfolipidów o zerowej krzywiznie należą między innymi PC, PG, PS, SM i CL, o krzywiznie ujemnej PE oraz kwas fosfatydylowy (PA),²⁵ a o krzywiznie dodatniej lysyl-PG.¹⁹ Zerowa krzywizna CL wydaje się być intrygująca ze względu na sterycznie duży fragment hydrofobowy złożony z czterech łańcuchów kwasów tłuszczowych i stosunkowo niewielki fragment hydrofilowy. Zaproponowanym w literaturze wyjaśnieniem tej właściwości CL jest silnie anionowy charakter głowy hydrofilowej, który generuje odpychanie elektrostatyczne zwiększając tym samym efektywną objętość głowy, a także jej silna hydratacja.²⁶ Kolejną interesującą właściwością CL jest zmiana krzywizny z zerowej na ujemną pod wpływem oddziaływania z kationami dwuwartościowych metali (M^{2+}), jak na przykład Mg^{2+} i Ca^{2+} (Rysunek 3).²⁶⁻²⁸ Tłumaczone jest to utworzeniem stabilnej pary jonowej $M^{2+} - CL^{2-}$ w obrębie której anionowy charakter CL jest zneutralizowany, co prowadzi do zmniejszenia odpychania elektrostatycznego z anionowymi lipidami i w efekcie zmniejszenia efektywnego rozmiaru głowy hydrofilowej.²⁶



Rysunek 3. Oddziaływania CL z M^{2+} prowadzące do zmiany krzywizny CL z zerowej na ujemną. Schemat zaczerpnięty z literatury.²⁸

1.2.2. Skład fosfolipidowy dwuwarstwy różnych mikroorganizmów

Bakterie gram-ujemne, na przykładzie *E. coli*, posiadają dwie błony komórkowe, zewnętrzną i wewnętrzną, które różnią się między sobą składem lipidowym (Rysunek 1). Wewnętrzna błona komórkowa jest symetryczna i składa się głównie z zwitterionowego PE (75 - 90%), oraz mniejszych ilości anionowych PG (6 - 25%) i CL (5 - 12%). Natomiast budowa zewnętrznej błony jest asymetryczna, jej zewnętrzny listek stanowi głównie silnie anionowy LPS, a wewnętrzny PE oraz PG.^{15,29-31}

Błona komórkowa bakterii gram-dodatnich, omówiona na przykładzie *S. aureus*, jest również symetryczna, charakteryzuje się brakiem obecności PE i składa się głównie z anionowych PG (58 - 90%) i CL (5 - 42%). Stosunek zawartości PG i CL jest zależny od fazy

wzrostu bakterii. W fazie wykładniczej dominuje PG, natomiast w fazie stacjonarnej ulega stopniowej akumulacji CL i zmniejsza się zawartość PG.^{19,32} Pewna frakcja PG jest poddawana enzymatycznemu przyłączeniu reszty lizyny poprzez wiązanie estrowe, co skutkuje powstaniem lysyl-PG posiadającego wypadkowy ładunek dodatni. W przypadku *S. aureus* w przybliżeniu 40 - 50% cząsteczek PG jest zmodyfikowanych w ten sposób i odsetek ten może ulegać zmianie w odpowiedzi na czynniki środowiskowe, takie jak obecność antybiotyków wpływających na syntezę ściany komórkowej.^{19,29,31}

Błona komórkowa *C. albicans*, będącym grzybem zaliczanym do rzędu drożdżaków, zawiera w swoim składzie znaczną ilość zwitterionowych PE (ok. 29%) i PC (ok. 39%), a także frakcję anionowych fosfolipidów. Stanowi ją głównie fosfatydyloinozytol (PI; ok. 18%), fosfolipid zawierający fragment inozytolu w swojej głowie hydrofilowej oraz PS (ok. 7,7%) i PA (ok. 3,4 %). Istnieją doniesienia sugerujące niesymetryczną budowę dwuwarstwy lipidowej drożdżaków, wedle których PI ulokowany jest głównie w jej zewnętrznym listku. W przeciwieństwie do komórek bakteryjnych, *C. albicans* będący eukariontem zawiera w swojej błonie sterole, głównie ergosterol, które usztywniają strukturę dwuwarstwy fosfolipidowej.²⁹

Skład lipidowy i rozmieszczenie ich w błonie komórek ssaków znacząco różni się od mikroorganizmów. Błonę komórkową czerwonych krwinek (RBCs, ang. *red blood cells*) stanowi w znacznej większości cholesterol (40 - 50 %) oraz zwitterionowe fosfolipidy PC (15 - 30%), SM (14 - 26%) i PE (10 - 15%). Do anionowych lipidów błony RBCs należy głównie PS (5 - 15%). Ponadto występuje stosunkowo niewielka ilość glikolipidów (ok. 4%).^{29,33,34} Lipidy rozmieszczone są niesymetrycznie pomiędzy listkami dwuwarstwy. Zewnętrzny listek stanowią głównie zwitterionowe fosfolipidy o zerowej krzywiznie, tj. PC i SM, natomiast listek wewnętrzny zawiera zwitterionowy PE, o ujemnej krzywiznie, oraz anionowy PS. Szacuje się że 50 - 77% PC, 82 - 100% SM i 100% glikolipidów ulokowanych jest w zewnętrznym listku, natomiast 94 - 100% PS i 87 - 100% PE w listku wewnętrznym.³⁵

2. Wielkocząsteczkowe MTAC

Znaczna większość zbadanych do tej pory MTAC charakteryzuje się budową amfifilową, tj. zawierają w swojej strukturze fragment lipofilowy i hydrofilowy. Budowa taka sprawia, że w środowisku wodnym tworzą agregaty oraz preferencyjnie lokują się na granicy faz woda/powietrze, dzięki czemu obniżają napięcie powierzchniowe. Ze względu na aktywność powierzchniową, można zaklasyfikować je do surfaktantów (ang. *surfactant* od *surface-active agent*). Amfifilowa struktura umożliwia wbudowywanie się tych molekuł w dwuwarstwę

fosfolipidową zbudowaną z lipidów charakteryzujących się również amfifilową strukturą (Rysunek 2a).

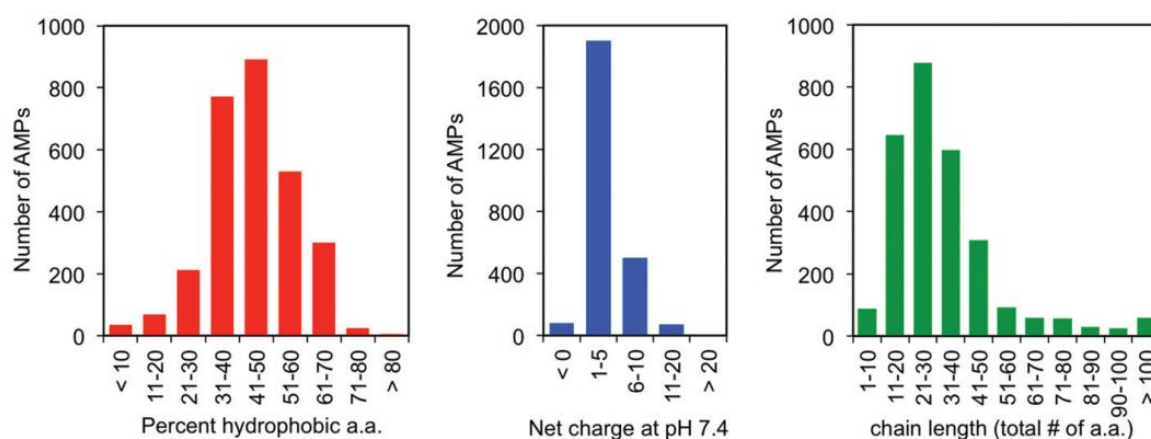
Mechanizm działania MTAC polega na zaburzeniu struktury błony komórkowej prowadząc do zwiększenia jej przepuszczalności. Opiera się on na wielu niespecyficznych oddziaływaniach elektrostatycznych, wodorowych i hydrofobowych z dwuwarstwą fosfolipidową, które w rezultacie prowadzą do jej fizycznego zniszczenia. Tak złożony mechanizm utrudnia mikroorganizmom nabycie oporności wobec MTAC,^{36,37} co zostało wykazane eksperymentalnie.³⁸⁻⁴⁴ Jednakże niespecyficzny mechanizm działania niesie ze sobą trudność w opracowaniu selektywnych czynników biobójczych, zabijających komórki bakteryjne, nie uszkadzając przy tym komórek eukariotycznych. Pomimo wielu lat badań użycie MTAC ogranicza się głównie to zastosowań powierzchniowych na skórę lub w kroplach do oczu. Niektóre z nich są stosowane w leczeniu infekcji wewnętrznych jako leki ostatniej szansy, jak na przykład polimyksyna B i E, powodujące częste i poważne skutki uboczne.⁴⁵ W związku z tym dalsze badania nad tą grupą związków są ważną i aktualną tematyką badawczą.

W przyrodzie występują zarówno niskocząsteczkowe MTAC, takie jak saponiny,⁴⁶ oraz wielkocząsteczkowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs, ang. *antimicrobial peptides*).²⁹ W niniejszej rozprawie rozwinąłem szerzej temat AMPs, ponieważ były one w przeszłości inspiracją do podjęcia prac nad syntetycznymi polikationami (SMAMPs, ang. *synthetic mimic of antimicrobial peptides*), mającymi naśladować je swoimi właściwościami fizykochemicznymi oraz aktywnością biologiczną.

2.1. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs)

AMPs występują powszechnie w przyrodzie i są produkowane przez różne organizmy, przez co w literaturze można natrafić na wiele sposobów ich klasyfikacji. Produkowane przez bakterie rybosomowe AMPs, aktywne wobec innych bakterii, nazywane są bakteriocynami. Stwierdzono dla nich wiele różnych mechanizmów działania, w tym również tworzenie porów w błonie komórkowej.⁴⁷ Inną klasą bakteryjnych AMPs są polimyksyny, nierybosomalne peptydy produkowane przez syntetazę peptydów nierybosomowych (ang. *nonribosomal peptide synthetase*).⁴⁸ AMPs wytwarzane są także przez organizmy wyższe - rośliny, kręgowce i bezkręgowce - gdzie stanowią ważny element nieswoistego układu odpornościowego, będąc pierwszą linią obrony przed infekcjami. Ze względu na pełnioną funkcję nazywane są peptydami obronnymi gospodarza (HDP, ang. *host-defense peptides*).^{36,49}

Cechą wspólną większości AMPs jest obecność kationowych grup bocznych, w postaci reszt lizyny oraz argininy, a także hydrofobowych grup w postaci reszt między innymi *izo-leucyny* i *fenyloalaniny*. Średnia długość AMPs wynosi 10-50 aminokwasów z czego ok. 50% stanowią aminokwasy hydrofobowe, natomiast wypadkowy ładunek cząsteczki mieści się w granicach +2 do +10 (Rysunek 4).^{14,50,51} Dodatni ładunek odpowiada za elektrostatyczne oddziaływanie peptydów z silnie anionową otoczką komórkową oraz dwuwarstwą lipidową bakterii (Rysunek 1), natomiast obecność reszt hydrofobowych umożliwia wbudowanie się do wnętrza dwuwarstwy.⁵¹

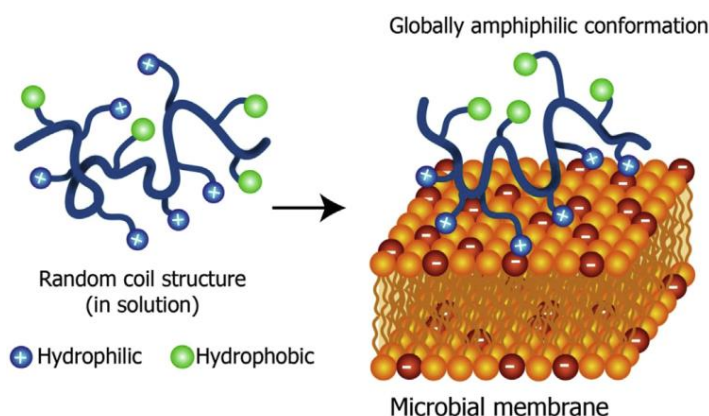


Rysunek 4. Zaczepnięte z literatury wykresy obrazujące zawartość hydrofobowych aminokwasów, wypadkowy ładunek w pH 7,4 oraz całkowitą ilość aminokwasów w AMPs sporządzone przez C. Ergene i wsp.¹⁴ na podstawie bazy peptydów przeciwbakteryjnych (<https://aps.unmc.edu/>).

2.2. Syntetyczne polikationy naśladujące AMPs (SMAMPs)

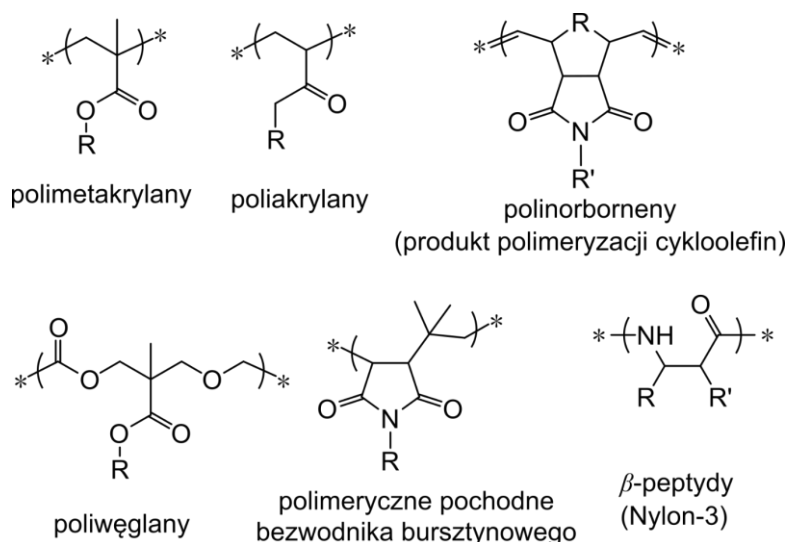
Wysoka podatność AMPs na działanie enzymów proteolitycznych obecnych w osoczu krwi oraz stosunkowo wysokie koszty ich syntezy w dużej skali stały się siłą napędową badań nad ich analogami pozbawionymi tych wad. Ponieważ większość naturalnie występujących AMPs charakteryzuje się α -helikalną strukturą po adsorpcji na powierzchni dwuwarstwy, początkowo popularny był pogląd, że polikationowe SMAMPs powinny tworzyć amfifilową helisę już w roztworze, aby symulować aktywności AMPs.^{52,53} Jednakże w tym czasie prace wielu innych badaczy wykazały, że aby zasymulować działanie biologiczne AMPs, SMAMPs muszą posiadać tylko ugrupowanie hydrofobowe oraz kationowe, natomiast struktura drugorzędowa w roztworze nie musi być zdeterminowana. Zakłada się, że cząsteczka SMAMPs o umiarkowanej hydrofobowości w roztworze wodnym przyjmuje strukturę lokalnie

amfifilowego kłęбка statystycznego (ang. *random coil conformation*), natomiast w momencie oddziaływania z dwuwarstwą fosfolipidową cząsteczka polikationu przyjmuje uporządkowaną, globalnie amfifilową strukturę (ang. *globally amphiphilic structure*) (Rysunek 5).^{14,17,54}



Rysunek 5. Zaczepnięte z literatury schematyczne przedstawienie koncepcji zmiany konformacji z kłęбка statystycznego, charakteryzującego się lokalną amfifilowością, na globalnie amfifilową podczas oddziaływania z dwuwarstwą fosfolipidową.¹⁷

W przeciągu ostatnich dwóch dekad zsyntetyzowano i zbadano aktywność biologiczną wielu różnych rodzajów polikationów w celu poznania zależności struktura-aktywność. Pośród wielu platform polimerowych największą uwagę poświęcono kationowym pochodnym metakrylanu i akrylanu,^{55–76} poliwinylpirydyny,^{77,78} *N*-alkilowanym kationowym pochodnym poli(amidu bezwodnika bursztynowego),^{79–83} pochodnym nylonu-3 (β -peptydy),^{52,53,84–91} produktom metatycznej polimeryzacji cykloolefin (ROMP, ang. *Ring opening metathesis polymerization*)^{92–100} oraz poliwęglanom (Rysunek 6).^{42,101–104} Większość tych pochodnych składała się z ugrupowania kationowego ulokowanego w grupie bocznej polimeru, będącego jednocześnie fragmentem hydrofilowym cząsteczki oraz alkilowych grup stanowiących fragment hydrofobowy. Opisywane były również polikationy zawierające grupę kationową umieszczoną w łańcuchu głównym polimeru, nazywane jonenami (ang. *ionenes*).^{38–40,104–111}

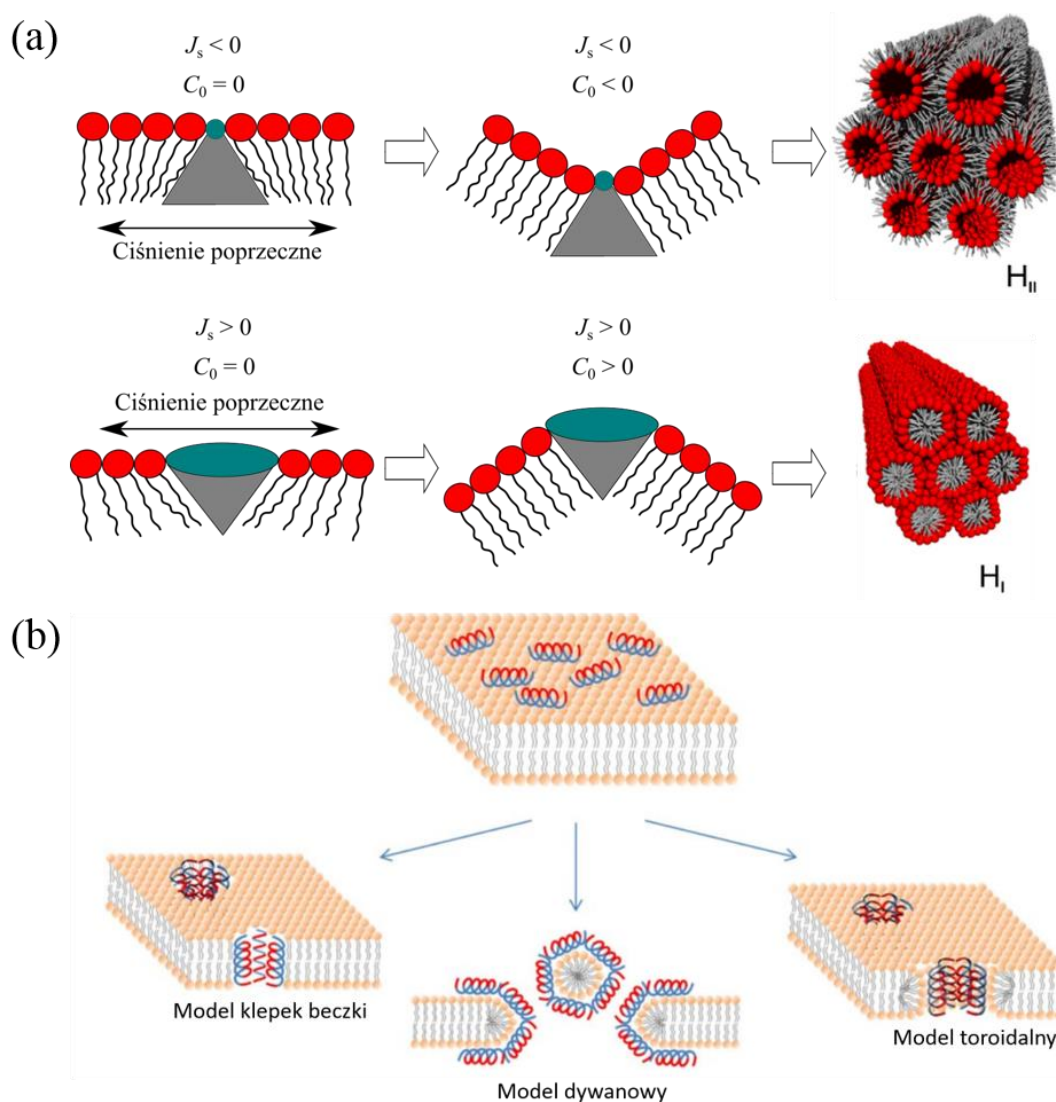


Rysunek 6. Struktury łańcuchów głównych polimerów (platform polimerowych), których pochodne są najczęściej badane jako SMAMPs.

Pomimo, iż znaczna większość z przytoczonych polikationów mocno odbiega strukturalnie od AMPs, nadal nazywane są one SMAMPs. W wyniku szerokich badań zidentyfikowano wiele parametrów strukturalnych wpływających zarówno na aktywność przeciwdrobnoustrojową, jak i hemolityczną oraz cytotoksyczność SMAMPs. Zagadnieniu temu poświęciłem osobny podrozdział mojej rozprawy (Podrozdział 6).

2.3. Mechanizm działania AMPs i SMAMPs

Pierwszym etapem działania AMPs i SMAMPs jest adsorpcja na powierzchni dwuwarstwy fosfolipidowej dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym, po czym następuje wbudowanie się cząsteczki do wnętrza dwuwarstwy poprzez oddziaływania hydrofobowe. W zależności od geometrii rozważanej cząsteczki powstające po jej wbudowaniu naprężenia boczne mogą odkształcić zewnętrzny listek dwuwarstwy w dwóch kierunkach (Rysunek 7a). Cząsteczki o $J_s < 0$ będą silniej napierać na ogony hydrofobowe, niż głowy hydrofilowe, co doprowadzi do wygięcia się listka dwuwarstwy w kierunku fazy wodnej, natomiast w przypadku $J_s > 0$ sytuacja będzie odwrotna. W skrajnym przypadku może dojść do lokalnego uformowania się fazy heksagonalnej (H_I) lub odwróconej fazy heksagonalnej (H_{II}).^{23,30,112}



Rysunek 7. (a) Ciśnienie wywierane na listek dwuwarstwy w zależności od geometrii wbudowanego MTAC (na podst. lit.²³) oraz nie-lamelarne fazy do których może prowadzić (graf. zaczerp. z lit.³⁰); (b) dyskutowane w literaturze modele działania AMPs tłumaczące zwiększenie przepuszczalności dwuwarstwy fosfolipidowej (graf. zaczerp. z lit.¹¹⁵).

Przyjmuje się, że dla niskiego stosunku ilości AMPs do lipidów (P/L, ang. *peptide to lipid ratio*) cząsteczki peptydów układają się równolegle do dwuwarstwy, natomiast gdy stosunek ten wzrasta AMPs zaczynają przyjmować orientację prostopadłą. W efekcie dochodzi do przerwania ciągłości dwuwarstwy fosfolipidowej. Aby wyjaśnić mechanizm przerwania ciągłości zaproponowano trzy modele, które są najczęściej dyskutowane w literaturze (Rysunek 7b). Pierwszy z nich to model „dywanowy” (ang. *carpet model*), który zakłada, że peptydy po osiągnięciu krytycznego stężenia na powierzchni dwuwarstwy wyrywają jej fragmenty tworząc agregaty złożone z AMPs i fosfolipidów. Drugi model nazwany „modelem klepek beczki” (ang.

barrel-stave model) zakłada formowanie się porów w poprzek membrany zbudowanych z cząsteczek peptydów ułożonych w taki sposób, że hydrofobowa część cząsteczki oddziałuje z hydrofobowym wnętrzem dwuwarstwy, natomiast hydrofilowa tworzy światło poru. Trzeci model nazwany toroidalnym (ang. *toroidal-pore model*) zakłada stopniowe odginanie się płaszczyzny zewnętrznego listka dwuwarstwy do wnętrza komórki ($C_0 > 0$) prowadzące do utworzenia porów, których światło tworzą zarówno hydrofilowe fragmenty AMPs jak i fosfolipidów. Czwartą możliwością, rzadziej przytaczaną w literaturze, która może być etapem przejściowym dla wymienionych modeli, jest indukowane peptydami formowanie się nie lamelarnych faz fosfolipidów, które charakteryzują się przestrzeniami podobnymi do kanałów jonowych (Rysunek 7a).³⁰ Istnieją także doniesienia literaturowe dowodzące udziału innych, wewnątrzkomórkowych mechanizmów przeciwdrobnoustrojowego działania tych związków.^{113–115}

3. Skład lipidowy, a selektywność działania AMPs i SMAMPs

Niektóre SMAMPs, a także syntetyczne oraz naturalne AMPs, a w szczególność HDPs będące elementem układu odpornościowego ssaków, wykazują znacznie wyższą aktywność biobójczą wobec mikroorganizmów, niż komórek ssaków. Ze względu na mechanizm działania polegający na destabilizacji dwuwarstwy, obserwowana selektywność wydaje się mieć związek z różnicami w budowie struktur otaczających komórki mikroorganizmów i ssaków, a w szczególności ze składem lipidowym błony komórkowej.^{14,17,29,30} Poniżej przedstawiłem cztery główne czynniki, które wydają się mieć największy wpływ na obserwowany efekt.

Powierzchnia komórek bakteryjnych, w przeciwieństwie do ssaków, charakteryzuje się silnie ujemnym ładunkiem. Bakterie gram-ujemne posiadają wyeksponowany na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej LPS, o charakterze anionowym, a ich wewnętrzna błona zawiera znaczną frakcję rozłożonych symetrycznie anionowych fosfolipidów (Rysunek 1). Komórki bakterii gram-dodatnich otoczone są silnie anionowymi kwasami tejchojowymi i lipotejchojowymi, a ich błona komórkowa składa się głównie z anionowych fosfolipidów, których ładunek jest tylko częściowo neutralizowany przez kationowy lysyl-PG. Budowa taka sprawia, że potencjał elektrokinetyczny powierzchni komórek *E. coli* i *S. aureus*, wyrażony jako zeta-potencjał (ζ), wynosi odpowiednio ok. -50 mV i -40 mV.^{116–118} Natomiast komórki ssaków zawierają niewielką ilość anionowych fosfolipidów, które znajdują się głównie w wewnętrznym listku dwuwarstwy lipidowej, co skutkuje zeta-potencjałem ok. -15 mV.¹¹⁹ W związku z tym, kationowe związki przeciwbakteryjne znacznie silniej oddziałują elektrostatycznie z powierzchnią komórek bakteryjnych, w porównaniu do komórek ssaków,

co uważane jest za jedną z przyczyn ich selektywnego działania.¹⁷ Wyższa podatność dwuwarstwy lipidowej zawierającej większą ilość anionowych lipidów na działanie SMAMPs została eksperymentalnie wykazana w badaniach z udziałem liposomów przez A. Som i G. Tew,²⁵ natomiast D. Ciumac i wsp. wykazali mocniejsze zaburzenie monowarstwy Langmuira zawierającej większą frakcję anionowych fosfolipidów przez AMPs.¹²⁰ Efekt ten widoczny jest również w mechanizmie obronnym *S. aureus* przeciwko AMPs. Wykazano, że szczepy ze znokautowanym genem kodującym enzym odpowiedzialny za przekształcanie anionowego PG w kationowy lysyl-PG, procesu który częściowo neutralizuje anionowy ładunek powierzchni komórki, charakteryzują się wyższą podatnością na AMPs.¹²¹

Ważną różnicą w składzie błony komórkowej pomiędzy *E. coli*, a ssakami, jest rodzaj zwitterionowych fosfolipidów. Komórki *E. coli* zawierają głównie PE, o ujemnej krzywiznie, i nie posiadają PC, o zerowej krzywiznie. Natomiast komórki ssaków zawierają głównie PC, eksponowany w zewnętrznym listku dwuwarstwy i niewielką ilość PE, który ułożony jest w wewnętrznym listku.³⁵ Według wielu badań dwuwarstwy lipidowe zawierające znaczną ilość PE są bardziej podatne na działanie SMAMPs i AMPs, natomiast PC stabilizuje dwuwarstwę. L. Yang i wsp. wykazali, że szczep *E. coli* niezawierający w swojej błonie komórkowej PE jest znacznie mniej podatny na otrzymane przez nich SMAMPs, niż szczep dziki, którego błona zawierała ok 78% PE.¹²² Eksperymenty na liposomach potwierdziły, że dwuwarstwa o wyższym stosunku PE/PC jest bardziej podatna na destruktywne działanie SMAMPs i AMPs.^{25,122–124} Efekt ten powiązano z ujemną krzywizną PE, która sprawia, że fosfolipid ten generuje naprężenia w dwuwarstwie odginające jej powierzchnię w kierunku fazy wodnej (Rysunek 2c).¹¹² Przy pomocy techniki rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małym kątem (SAXS, ang. *small-angle X-ray scattering*) udowodniono, że oddziaływanie SMAMPs i AMPs z dwuwarstwą zawierającą PE prowadzi do negatywnej krzywizny międzyfazy woda-lipidy i powstania fazy H_{II} (Rysunek 2c) lub odwróconej fazy kubicznej (Q_{II}), oraz brak takiego efektu dla analogicznych układów zawierających PC.^{123,125,126} Gram-dodatnia bakteria *S. aureus* nie zawiera natomiast PE, ale zawiera znaczną ilość CL o krzywiznie zerowej, która może ulec zmianie na ujemną pod wpływem dwuwartościowych jonów metali (Rysunek 3). Y. Xie i L. Yang wykazali, że $CaCl_2$ posiada właściwości bakteriobójcze przeciwko *S. aureus* w fazie stacjonarnej, co przypisali negatywnej krzywiznie kompleksu CL- Ca^{2+} prowadzącą do destabilizacji fazy L i formowaniu się fazy H_{II} .²⁸

Ponadto kardiolipina jest fosfolipidem specyficznym dla bakterii oraz mitochondrium, który nie występuje w plazmatycznej błonie komórek ssaków. Lipid ten pełni istotne funkcje

podczas procesów wymagających modulacji kształtu dwuwarstwy fosfolipidowej, co jest wymagane do prawidłowego funkcjonowania niektórych białek oraz podczas podziałów komórkowych. W badaniach na liposomach wykazano, że dwuwarstwa zawierająca CL, jako anionowy fosfolipid, jest bardziej podatna na działanie AMPs i SMAMPs od analogicznej dwuwarstwy zawierającej PG jako anionowy składnik.^{127–129} W związku z tym, hipotetyczne specyficzne oddziaływanie z CL mogłoby pozytywnie wpłynąć na selektywność tej klasy czynników bakteriobójczych. Jednakże dotyczy to tylko scenariusza, w którym związki te nie penetrują dwuwarstwy komórek ssaków dostając się do ich wnętrza, w którym mogłyby oddziaływać z błoną mitochondrialną bogatą w CL.

Kolejną ważną różnicą w składzie błon komórkowych jest obecność steroli w komórkach eukariotycznych oraz ich brak w komórkach prokariotycznych. Najpowszechniej występującym steroidem u ssaków jest cholesterol stanowiący do 50% wszystkich lipidów obecnych w błonie komórkowej. Cholesterol moduluje płynność dwuwarstwy fosfolipidowej poprzez formowanie uporządkowanych domen lipidowych (uporządkowana faza ciekła, ang. *ordered liquid phase*), co prowadzi do jej usztywnienia.^{130,131} Wraz ze wzrostem zawartości cholesterolu w dwuwarstwie spada jej podatność na AMPs, co wykazano w badaniach z użyciem liposomów.^{132–135} W podobny sposób działa ergosterol obecny w błonie komórkowej *C. albicans*, co może odpowiadać za jego niższą podatność na działanie AMPs i SMAMPs w porównaniu do bakterii.¹³⁶ Ochronny efekt steroli wiązany jest z usztywnieniem dwuwarstwy fosfolipidowej co czyni ją mniej podatną na odkształcenia spowodowane przez oddziaływanie z AMPs lub SMAMPs.¹³⁵

Aktywność AMPs i SMAMPs wobec grzybów *C. albicans* jest zazwyczaj niższa niż w przypadku bakterii, co jest związane z obecnością wspomnianego wyżej ergosterolu, a także składem fosfolipidowym zbliżonym do komórek ssaków. Jednak w przeciwieństwie do komórek ssaków, drożdżak ten posiada silnie anionową ścianę komórkową, która może w pewnym stopniu tłumaczyć obserwowaną przez niektórych badaczy selektywność.

4. Wielkości charakteryzujące właściwości biologiczne AMPs i SMAMPs

W celu scharakteryzowania właściwości biologicznych AMPs i SMAMPs prowadzone są zazwyczaj oznaczenia kilku najważniejszych wielkości. Podstawowym testem pozwalającym określić aktywność przeciwdrobnoustrojową tych związków jest wyznaczenie minimalnego stężenia zatrzymującego wzrost mikroorganizmów (MIC, ang. *minimum*

inhibitory concentration). Najczęściej używaną metodą jest technika kolejnych rozcieńczeń w pożywce wzrostowej na płytce 96-dółkowej (ang. *broth microdilution method/technique*), która, w skrócie, polega na inkubacji mikroorganizmów z badanym materiałem w serii jego 2-krotnych rozcieńczeń. Jako wartość MIC uznaje się najniższe zastosowane stężenie dla którego nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmów. W literaturze naukowej można spotkać wizualną ocenę wzrostu lub zastosowanie pomiaru absorbancji światła 600 nm (OD_{600} , ang. *optical density*) przez zawiesinę mikroorganizmów. W przypadku pomiarów OD_{600} stosowanym progiem zatrzymania wzrostu jest 90% - 99% inhibicji względem kontroli. Uzyskana w ten sposób wartość MIC niesie ze sobą informację, że realne stężenie hamujące wzrost znajduje się w przedziale pomiędzy oznaczoną wartością MIC, a połową tej wartości. Kolejną wielkością charakteryzującą aktywność przeciwdrobnoustrojową jest minimalne stężenie bakteriobójcze lub grzybobójcze (MBC lub MFC, ang. *minimum bactericidal/fungicidal concentration*), niosące informację o stężeniu badanego związku niezbędnym do zmniejszenia żywotności początkowego inokulum mikroorganizmów o 99,9%. Określenie żywotności bakterii następuje poprzez wysianie zawiesiny mikroorganizmów po inkubacji z badanym czynnikiem na szalki z podłożem wzrostowym i zliczenie ilości kolonii, które wyrosły po dodatkowej inkubacji.

Podstawowym parametrem używanym do wstępnego szacowania toksyczności względem komórek ssaków jest pomiar stężenia badanego związku potrzebnego do wywołania lizy połowy RBCs (HC_{50} , ang. *hemolytic concentration 50%*). W celu oceny stopnia hemolizy RBCs po inkubacji z badanym czynnikiem są wirowane, a następnie określana jest ilość uwolnionej hemoglobiny w supernatancie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 540 nm. Natomiast cytotoksyczność badana jest najczęściej metodą z wykorzystaniem testów MTT lub XTT, jako aktywność mitochondriów po inkubacji z badanym czynnikiem. Obie metody wykorzystują barwniki, które pod wpływem utlenienia następującego w pobliżu aktywnego mitochondrium przekształcają się w barwne pochodne. Określenie poziomu zabarwienia poprzez pomiar absorbancji światła przy określonej długości fali pozwala na oszacowanie żywotności komórek. Raportowanym wynikiem badań cytotoksyczności jest stężenie, w którym aktywność mitochondrialna osiąga połowę wartości względem kontroli (IC_{50} , ang. *inhibitory concentration 50%*). Wartość tę można wyznaczyć jako współczynnik równania Hill'a, opisującego sigmoidalną zależność dawka-odpowiedź, po dopasowaniu numerycznym danych eksperymentalnych.¹³⁷ Równanie to ma następującą postać:

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{C}\right)^n} \quad (1)$$

gdzie:

E - mierzony efekt, tutaj cytotoksyczność jako % obniżenia aktywności mitochondrialnej,

$E_{\max}$ - maksymalna możliwa wartość mierzonego efektu, tutaj 100%,

C - stężenie badanego związku,

IC_{50} - stężenie badanego związku dające połowę $E_{\max}$,

n - współczynnik Hill'a określający nachylenie krzywej sigmoidalnej.

5. Metodyka badań mechanizmu działania MTAC

Pomimo pojedynczych doniesień literaturowych dotyczących wewnątrzkomórkowego działania AMPs i SMAMPs, postulowanym głównym mechanizmem ich działania jest zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej bakterii. Prowadzi to do wycieku składników cytoplazmy zaburzając homeostazę komórki, co w konsekwencji powoduje jej śmierć. Wnioski te uzyskano z badań nad zmianą przepuszczalności błony komórkowej bakterii, natomiast badania na liposomach, jako modelowych błonach komórkowych, pozwoliły sprawdzić oddziaływanie na samą dwuwarstwę fosfolipidową. Aby poznać dokładniej sposób oddziaływania AMPs i SMAMPs z dwuwarstwą fosfolipidową, pod kątem lokowania się ich względem fosfolipidów, prowadzone są badania z wykorzystaniem jeszcze bardziej uproszczonych modeli, takich jak np. monowarstwa Langmuira i dwuwarstwa osadzona na podłożu stałym (ang. *solid supported bilayer*). W podrozdziale tym przedstawiłem najważniejsze metody badawcze, które są stosowne w celu potwierdzenia zdolności nowych polikationów do zwiększania przepuszczalności błony komórkowej bakterii. Poruszyłem także temat badań z użyciem liposomów, głównie pod kątem wpływu składu lipidowego dwuwarstwy na podatność wobec AMPs i SMAMPs.

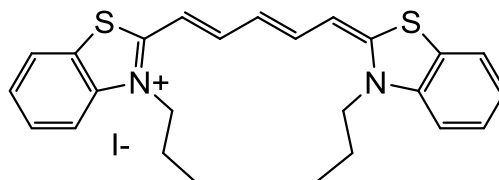
5.1. Wybrane metody z wykorzystaniem całych komórek

Bakterie charakteryzują się skomplikowaną i wielowarstwową strukturą otoczki komórkowej (Rysunek 1), w związku z czym wyniki badań na uproszczonych modelach błony komórkowej nie dają się łatwo interpolować do całych komórek. Do tej pory opracowano wiele metod badawczych pozwalających określić czy, oraz oszacować w jakim stopniu, błona komórkowa bakterii zwiększyła swoją przepuszczalność pod wpływem SMAMPs i AMPs. Metody te opierają się głównie na zastosowaniu hydrofilowych barwników, które nie migrują

przez nieuszkodzoną błonę komórkową, oraz skaningowej lub emisyjnej mikroskopii elektronowej (SEM lub TEM, ang. *scanning* lub *transmission electron microscopy*). Zarówno AMPs, jak i SMAMPs, mogą indukować wypływ substancji o różnej wielkości z komórki poprzez tworzenie porów w dwuwarstwie lub jej niespecyficzne zniszczenie (Rysunek 7). Zastosowanie różnych metod pozwala na ocenę wielkości powstających otworów i zniszczeń.

5.1.1. Depolaryzacja błony komórkowej.

Błona komórkowa bakterii jest spolaryzowana, tj. występuje różnica potencjałów elektrycznych po jej wewnętrznej i zewnętrznej stronie, spowodowana głównie różnym stężeniem K^+ i Na^+ . Potencjał błonowy jest niezbędny dla niektórych procesów życiowych bakterii, szczególnie tych opartych o funkcjonowanie białek transmembranowych,¹³⁸ i zaburzenie go, poprzez wywołanie wycieku K^+ przez błonę komórkową, może potencjalnie doprowadzić do śmierci komórki. Depolaryzacja związana jest głównie z migracją kationów potasowych i sodowych, o średnicy hydrodynamicznej ok. 0,12 i 0,20 nm,¹³⁹ przez dwuwarstwę fosfolipidową. Jedną z metod badania zmian potencjału błonowego jest zastosowanie barwników fluorescencyjnych, których agregacja na powierzchni lub we wnętrzu dwuwarstwy fosfolipidowej zależna jest od stopnia jej polaryzacji (ang. *voltage sensitive dyes*).¹⁴⁰ Tego typu barwnikiem używanym powszechnie w badaniach nad AMPs i SMAMPs jest jodek 3,3'-di-propylo-tiakarbocyjanianu (DiSC₃(5), ang. *3,3-dipropylthiadicarbocyanine iodide*; Rysunek 8).^{41,76,81,93,141–143} Cząsteczki DiSC₃(5), będące amfifilowymi kationami, akumulują się w dwuwarstwie fosfolipidowej zawierającej anionowe lipidy, co prowadzi do zwiększenia ich lokalnego stężenia i samo-wygaszenia (ang. *self-quenching*). Podczas depolaryzacji natomiast następuje uwolnienie barwnika do medium co skutkuje jego rozcieńczeniem i znacznym wzrostem emisji fluorescencji o długości fali 670 nm przy wzbudzeniu światłem o długości 622 nm.^{140,144}



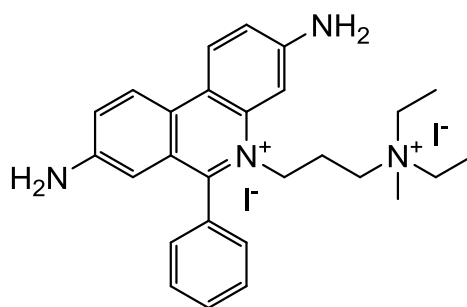
Rysunek 8. Barwnik fluoroscencyjny DiSC₃(5) wykorzystywany do badania depolaryzacji dwuwarstwy fosfolipidowej przez AMPs i SMAMPs.

Interesującym przykładem zastosowania DiSC₃(5) jest praca A. Song i wsp., którzy badali przeciwdrobnoustrojowe właściwości polikationów będących produktem naprzemiennej

metatycznej polimeryzacji cycloolefin (AROMP, ang. *alternating ROMP*).⁹³ Badane przez nich polimery powodowały całkowitą depolaryzację komórek *S. aureus* i *E. coli* po 10 minutach, co doskonale korelowało z kinetyką zabijania *E. coli*, ale kinetyka zabijania *S. aureus* była znacznie wolniejsza. Autorzy artykułu wysnuli na tej podstawie wniosek, że depolaryzacja może być bezpośrednią przyczyną śmierci *E. coli*. Natomiast w przypadku *S. aureus* sama depolaryzacja jest niewystarczającym czynnikiem, aby uśmiercić tę bakterię i inny mechanizm o wolniejszej kinetyce, jak formowanie się porów lub działanie wewnątrzkomórkowe, jest odpowiedzialny za aktywność.

5.1.2 Iodek propidyny

Jodek propidyny (IP) jest hydrofilowym barwnikiem fluorescencyjnym (Rysunek 9), którego wydajność kwantowa po związaniu z DNA lub RNA znacząco wzrasta (od kilku do kilkunastu razy).^{145,146} Po interkalacji do materiału genetycznego wykazuje maksimum wzbudzenia przy długości fali 535 nm i maksimum emisji o długości 617 nm.¹⁴⁶ Ze względu na hydrofilowy charakter barwnik ten nie jest w stanie przejść przez nienaruszoną błonę komórkową. Dzięki tej właściwości znalazł zastosowanie w testach do określania żywotności bakterii (np. komercyjny test BackLight)^{146,147} oraz określania sposobu śmierci komórek eukariotycznych (apoptoza/nekroza).¹⁴⁸ Żywa komórka bakterii posiada spójną błonę komórkową uniemożliwiającą wejście IP do jej wnętrza, natomiast błona martwych komórek ulega stopniowej degradacji dzięki czemu cząsteczka IP może dostać się do jej wnętrza i wiązać z DNA. Przyjmuje się, że komórki wykazujące silną fluorescencję pochodzącą od IP są martwe.¹⁴⁵ Znane są jednak przykłady żywych komórek, których błona jest przepuszczalna dla IP, jak np. w przypadku szybko dzielących się komórek w wykładniczej fazie wzrostu, dlatego też metoda ta bywa obarczona błędem.¹⁴⁹

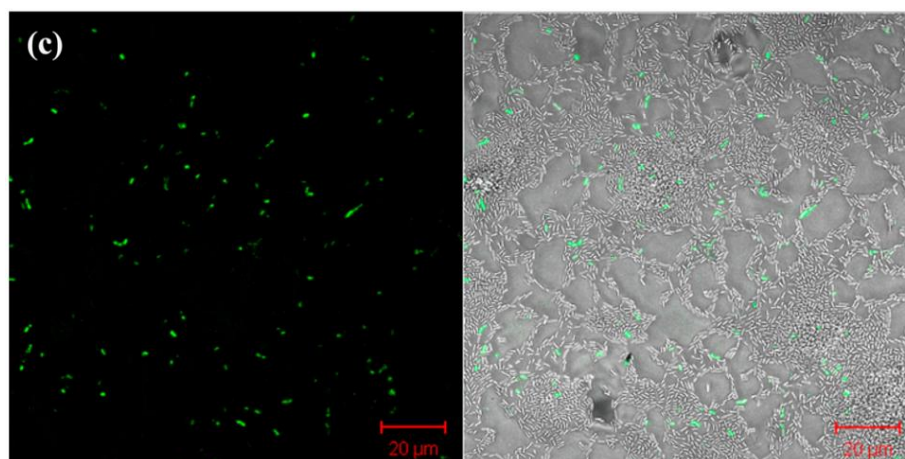


Rysunek 9. Barwnik fluorescencyjny IP wykorzystywany do badania przepuszczalności błony komórkowej.

Barwnik IP znalazł również zastosowanie w badaniach nad mechanizmem działania MTAC. W kilku pracach komórki bakterii traktowane polikationem wybarwiono przy pomocy IP i obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym^{40,64,72,94,150,151} lub poddano analizie przy pomocy cytometru.¹⁵² Autorzy tych artykułów zinterpretowali zaobserwowaną fluorescencję we wnętrzu komórek bakteryjnych jako dowód na uszkodzenie błony komórkowej przez polikationy. Nie skomentowali jednak możliwości, że obserwowane naruszenie integralności błony komórkowej może być związane ze śmiercią komórki samą w sobie. Argumentem przemawiającym za faktem, że błona została uszkodzona przez użyty czynnik przeciwbakteryjny jest zwiększenie przepuszczalności dla IP już po krótkim czasie inkubacji, od 30 min do 2 h.^{40,94,152} Tak szybkie działanie wskazuje na brak konieczności dostania się badanych związków do wnętrza komórki i pasuje do modelu działania kontaktowego, poprzez destabilizację dwuwarstwy fosfolipidowej. Jodek propidyny cechuje się średnicą 1,5 nm, w związku z czym pory lub inne uszkodzenia błony wywołane przez badane czynniki muszą mieć odpowiednio większy rozmiar.

5.1.3. Znakowane fluoresceiną dekstrany o różnej masie molowej

W celu badania, czy AMPs i SMAMPs zwiększają przepuszczalność błony komórkowej dla hydrofilowych cząsteczek o większej średnicy hydrodynamicznej, stosuje się znakowany izotiocyanianem fluoresceiny dekstran (FITC-dekstran) o różnej masie molowej. W znacznej większości opublikowanych prac został zastosowany komercyjnie dostępny FITC-dekstran o masach od 4 kDa do 150 kDa cechujący się według producenta (Merck) średnicą hydrodynamiczną od 2,8 nm do 17,0 nm. Eksperyment jest analogiczny do badań z zastosowaniem IP, tj. komórki po inkubacji z testowanym czynnikiem traktuje się roztworem FITC-dekstranu o odpowiedniej masie molowej, po czym nadmiarowy barwnik jest odmywany, a komórki obserwowane są pod mikroskopem fluorescencyjnym^{40,43,44,101,103,153} lub mierzona jest ich całkowita fluorescencja.¹⁵⁴ Fluorescencja skorelowana z umiejscowieniem komórek świadczy o przedostaniu się barwnika do wnętrza komórki przez uszkodzoną błonę komórkową. Przykładowy wynik, zaczerpnięty z literatury,¹⁰³ przedstawiłem na Rysunku 10.



Rysunek 10. Zaczepnięte z literatury przykładowe zdjęcie komórek *E. coli* inkubowanych z kationową pochodną poliwęglanu i FITC-dekstranem 100 kDa pokazujące dobre skorelowanie fluorescencji z umiejscowieniem komórek.¹⁰³

Cztery grupy badawcze wykazały, że ich polikationy umożliwiają migrację FITC-dekstranu o masie molowej 100 kDa przez błonę komórkową bakterii, którego średnica hydrodynamiczna jest szacowana na 13,8 nm.^{40,101,10344} Natomiast w trzech innych pracach, w których wykorzystano FITC-dekstran o różnych masach, autorzy wykazali, że AMPs tworzą pory o średnicy ok 23 nm,¹⁵³ w przedziale 7-29 nm⁴³ oraz pomiędzy 5,6-9,4 nm.¹⁵⁴

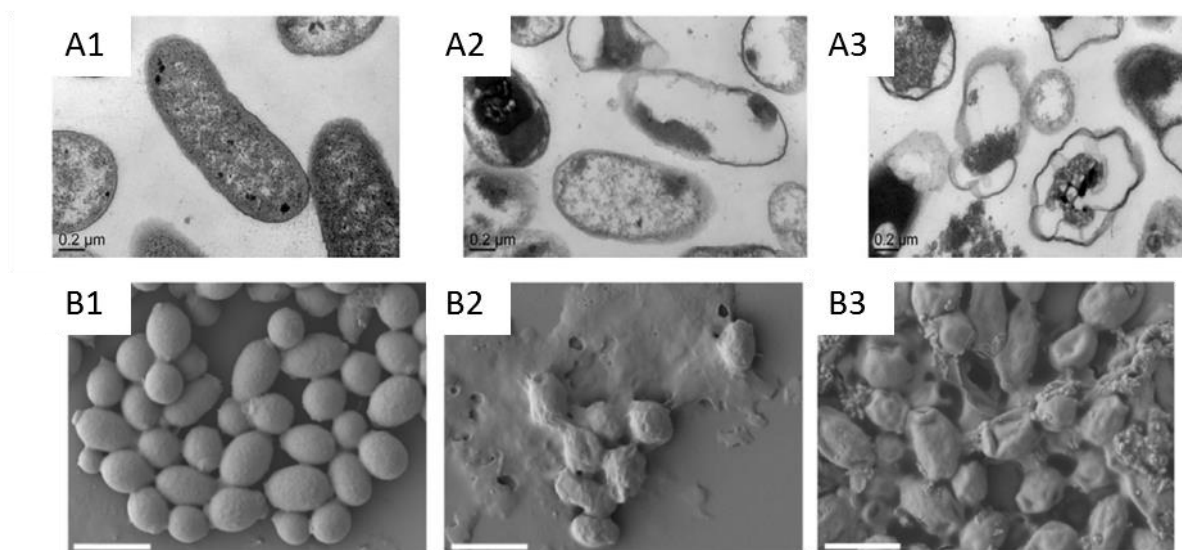
5.1.4. Obecność makrocząsteczek z cytoplazmy w supernatancie

Kolejną metodą pozwalającą ocenić na ile poważnie uszkodzona jest błona komórkowa bakterii jest szacowanie względnej ilości materiału cytoplazmatycznego, który wypłynął z komórki. W tym celu bakterie po inkubacji z czynnikiem przeciwbakteryjnym oddziela się od medium poprzez wirowanie lub mikrofiltrację, a następnie badana jest absorbancja przy długości fali 260 nm, która odpowiada maksimum dla wielu aromatycznych struktur obecnych w białkach oraz DNA i RNA.¹⁵⁵ Stosując tę metodę wykazano, że niektóre polikationy indukują wypływ makrocząsteczek z wnętrza komórki zależny od stężenia polimeru.^{42,44,156}

5.1.5. Mikroskopia elektronowa

Przedstawione powyżej metody pozwalają w sposób pośredni stwierdzić czy AMPs i SMAMPs powodują uszkodzenia w błonie komórkowej bakterii. Natomiast zastosowanie mikroskopii elektronowej pozwala na bezpośrednią obserwację zmiany kształtu bakterii i zaburzeń w strukturze ich otoczki. Najszerzej wykorzystywana do tego celu jest skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM, ang. *scanning electron microscopy*)^{39,42,43,64,72,73,82,152,157,158} oraz w mniejszym stopniu transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM, ang. *transmission electron microscopy*).^{42,44,93,152} Metodyka ta pozwoliła zaobserwować silną deformację

komórek pod wpływem SMAMPs, co przedstawiłem na przykładowych obrazach SEM i TEM zaczerpniętych z literatury (Rysunek 11).



Rysunek 11. Zaczerpnięte z literatury przykładowe obrazy TEM (A1-A3)⁴⁴ i SEM (B1-B3)³⁹ komórek bakteryjnych przed (A1 i B1) i po (A1, A2, B1 i B2) traktowaniu ich SMAMPs.

5.1.6. Zeta-potencjał komórek bakteryjnych

Komórki bakterii cechują się silnie ujemnym potencjałem elektrokinetycznym powierzchni.^{116–118} Mechanizm działania AMPs i SMAMPs oparty o dezintegrację błony komórkowej zakłada, że ich cząsteczki początkowo adsorbują na powierzchni komórki, dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym, co powinno prowadzić do neutralizacji potencjału elektrokinetycznego. Znalazło to potwierdzenie w badaniach zeta-potencjału powierzchni komórek bakteryjnych traktowanych różnymi AMPs.^{152,154,159} Autorzy przytoczonych prac wykazali, że wraz ze wzrostem stężenia badanych peptydów zeta-potencjał bakterii wzrasta osiągając w pewnym momencie nawet wartość dodatnią.^{152,159} Wyniki te przemawiają za kontaktowym mechanizmem działania AMPs i SMAMPs.

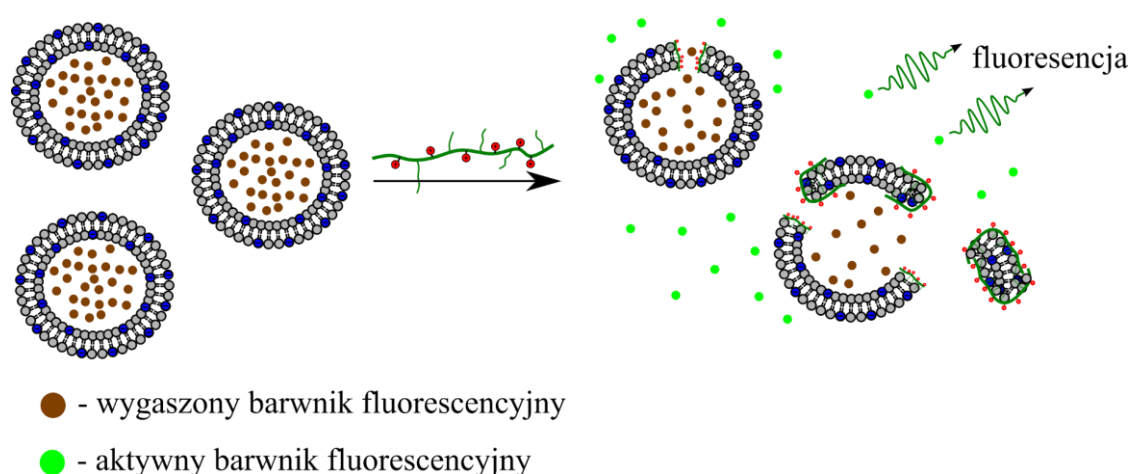
5.2. Wybrane metody z wykorzystaniem liposomów

Otoczka komórkowa bakterii jest złożoną strukturą składającą się z wielu elementów, pośród których dwuwarstwa fosfolipidowa, będąca głównym postulowanym celem działania AMPs i SMAMPs, odpowiada za zachowanie jej spójności. W związku z tym zastosowanie modelowej dwuwarstwy, w postaci liposomów, pozwala na bezpośrednią obserwację zaburzeń w jej integralności wykluczając wpływ pozostałych struktur otaczających komórkę. Liposomy są modelem błony komórkowej odbiegającym od „prawdziwych komórek bakterii”, jednakże

pozwalającym na dokładniejsze poznanie między innymi wpływu składu lipidowego dwuwarstwy na oddziaływanie z AMPs i SMAMPs oraz testowanie czy związki te są w stanie zwiększyć przepuszczalność dwuwarstwy odpowiadającej składem błonie komórkowej bakterii. W badaniach tych wykorzystuje się małe jednowarstwowe liposomy (SUVs, < 100 nm średnicy; ang. *small unilamellar vesicles*), duże jednowarstwowe liposomy (LUVs, < 1 μm średnicy; ang. *large unilamellar vesicles*) oraz olbrzymie jednowarstwowe liposomy (GUVs, 1 - 10 μm średnicy; ang. *giant unilamellar vesicles*). Aby symulować skład lipidowy bakterii stosuje się zazwyczaj mieszaniny PE z CL i PG w różnych proporcjach lub bakteryjne ekstrakty lipidowe, natomiast błony komórkowe eukariontów symulowane przez liposomy zbudowane z PC.^{14,29,30,160}

5.2.1. Liposomy wypełnione barwnikiem fluorescencyjnym

Popularną techniką badania zdolności AMPs i SMAMPs do zwiększenia przepuszczalności dwuwarstwy fosfolipidowej jest zastosowanie SUVs i LUVs wypełnionych roztworem barwnika fluorescencyjnego w stężeniu powyżej którego barwnik ten ulega samo-wygaszeniu. W momencie wytworzenia porów lub całkowitego zniszczenia liposomów następuje uwolnienie barwnika prowadzące do jego rozcieńczenia w otaczającym liposomy buforze. Obserwowanym efektem jest wzrost fluorescencji (Rysunek 12).¹⁴ Istnieje również znacznie mniej popularna wersja tego testu wykorzystująca liposomy wypełnione roztworem chlorku sodu, który po uwolnieniu podnosi przewodnictwo elektryczne roztworu mierzone przy pomocy konduktomietru.¹⁶¹



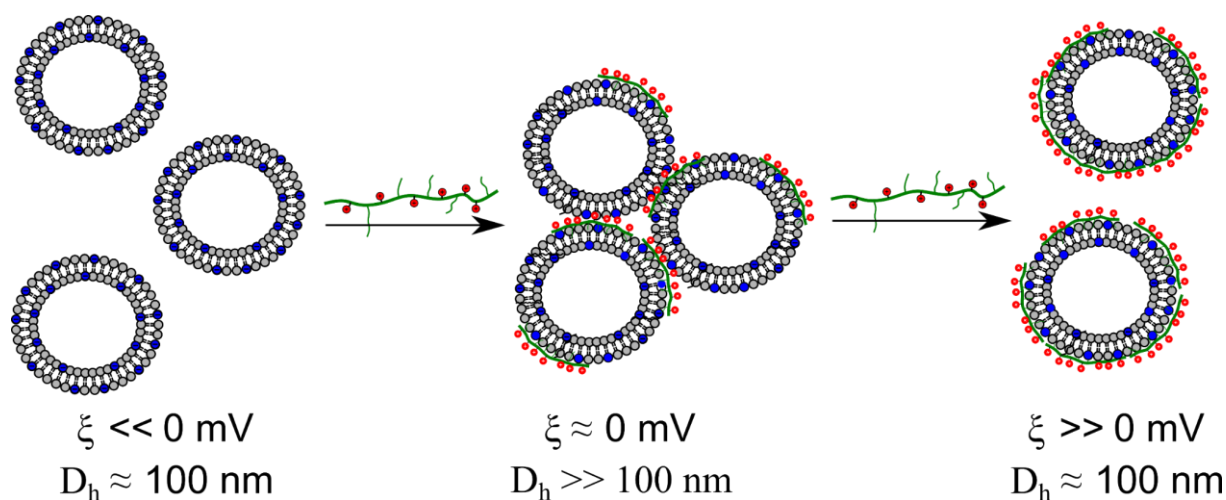
Rysunek 12. Schematyczne przedstawienie metodyki badania działania AMPs i SMAMPs na dwuwarstwę z wykorzystaniem liposomów wypełnionych barwnikiem fluorescencyjnym.

Najczęściej używanymi do tego celu barwnikami są kalceina w postaci poczwórnej soli sodowej^{25,63,90,93,95,97,98,127,133,162} oraz rodamina B.^{57,74,75} Znacznie rzadziej stosowana jest fluoresceina.¹²⁴ Badania te prowadzone są zazwyczaj w buforach o pH zbliżonym do 7,0-7,4 zawierających chlorek sodu w stężeniu zbliżonym do fizjologicznego (ok. 130 mM). Fluorescencja kalceiny badana jest najczęściej po wzbudzeniu światłem w zakresie 450-490 nm dla emisji w zakresie 510-515 nm, natomiast w przypadku rodaminy po wzbudzeniu światłem o długości 566 nm dla emisji 586 nm.

Stosując tę metodykę, w kilku pracach naukowych pokazano dobrą korelację pomiędzy uwalnianiem kalceiny przez polikationy z liposomów mających symulować błonę komórkową bakterii, a ich właściwościami przeciwbakteryjnymi.^{25,57,93,95} Taki efekt autorzy uznali za dowód na mechanizm działania oparty o zaburzenie struktury dwuwarstwy lipidowej. Jednakże przypadki braku takowej korelacji były również raportowane dla niektórych polikationów, co może wynikać z nieadekwatnego modelu, oddziaływań z innymi strukturami otaczającymi komórki, lub innym mechanizmem działania polegającym na oddziaływaniu ze strukturami wewnątrzkomórkowymi.^{98,99}

5.2.2. Badania techniką DLS

Wyżej opisana technika pozwala na wgląd w zdolność AMPs i SMAMPs do zaburzania integralności dwuwarstwy lipidowej, nie daje jednak informacji na temat adsorpcji tych związków na powierzchni dwuwarstwy w warunkach, w których ilość polimeru lub peptydu jest zbyt mała, aby wpłynąć na jej przepuszczalność. Adsorpcja ta może prowadzić do fuzji bądź agregacji liposomów, co można obserwować przy pomocy techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *dynamic light scattering*).¹⁶⁰ Metoda DLS pozwala określić dystrybucję wielkości cząstek znajdujących się w roztworze i oszacować ich średni promień hydrodynamiczny (R_h). Ponadto wiele aparatów DLS (np. apart Malvern Zetasizer Nano ZS) posiada wbudowaną funkcję pomiaru ζ wykorzystując do tego celu pomiar mobilności elektroforetycznej, która jest następnie podstawą do obliczenia ζ z równania Henry'ego.¹⁶³ Wykorzystując tę technikę kilka grup badawczych zbadało zależność R_h oraz ζ zawiesiny liposomów od stosunku molowego AMPs lub SMAMPs do lipidów (L/P, ang. *lipid to polymer/peptide ratio*).^{90,96,161,162,164-169}



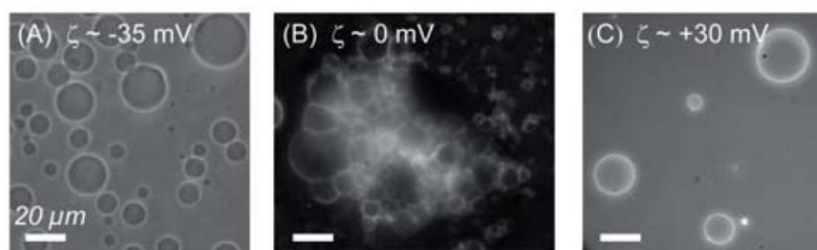
Rysunek 13. Schematyczne przedstawienie metody badania oddziaływania AMPs i SMAMPs z liposomami z wykorzystaniem techniki DLS.

Wykazano między innymi, że pochodne poli(4-winylopirydyny),^{161,166,167} hitozan¹⁶⁵ i polilizyna¹⁶⁹ podnoszą zeta-potencjał powierzchni liposomów neutralizując go przy pewnej wartości P/L, co powoduje agregację liposomów objawiającą się jako wzrost R_h (Rysunek 13). Natomiast dalsze zwiększanie P/L prowadzi do wysycenia powierzchni liposomów polikationem zwiększając zeta potencjał, co ostatecznie jest przyczyną stabilizacji liposomów opłaszczonych polikationem.^{161,165–167,169} A. Sybachin i wsp. wykazali, na przykładzie oddziaływania poli(4-winylopirydyny) z liposomami o różnym stosunku PC/CL, że potrzeba więcej polikationu do neutralizacji ładunku liposomów o wyższej zawartości anionowych fosfolipidów.¹⁶⁴ Wyniki otrzymane przez S. Shi i wsp. oraz S. Hedegaard i wsp. świadczą o wyższej skuteczności (przy niższych wartościach P/L) do agregowania liposomów przez hydrofilowe pochodne poli- β -laktamów i peptydy penetrujących błonę (CPPs, ang. *cell-penetrating peptides*) w porównaniu do ich bardziej hydrofobowych analogów.^{90,162} Natomiast G. Gabriel i wsp., badając kationowe pochodne polinorbornenu, zaobserwowali odwrotną tendencję. Ponadto potwierdzili oni wyniki otrzymane w badaniach DLS obserwując agregację znakowanych fluorescencyjnie LUVs pod mikroskopem, oraz pokazali, że ich polikationy agregują również komórki bakteryjne.⁹⁶

5.2.3. Mikroskopia elektronowa

Technika DLS pozwala w sposób pośredni, poprzez analizę fluktuacji rozproszonego światła w czasie, badać agregację liposomów pod wpływem polikationów. Ponadto metoda ta jest bardzo czuła na wszelkie stałe zanieczyszczenia. Oba te czynniki mogą prowadzić do pewnych błędów interpretacyjnych. Metodą komplementarną, pozwalającą zweryfikować

wyniki DLS, jest np. TEM. Technika ta została wykorzystana do obserwacji liposomów po inkubacji z polikationami potwierdzając ich agregację.^{165,170,171} Na Rysunku 14 przedstawiłem przykładowe obrazy TEM, zapożyczone z literatury,¹⁶⁵ przedstawiające LUVs traktowane różną ilością hitozanu.



Rysunek 14. Przykładowe obrazy, zaczerpnięte z literatury, TEM LUVs inkubowanych (A) bez dodatku oraz z dodatkiem (B) 0,18 ekwiwalentu lub (C) 5 ekwiwalentów hitozanu.¹⁶⁵

6. Struktura polikationów, a ich aktywność biologiczna.

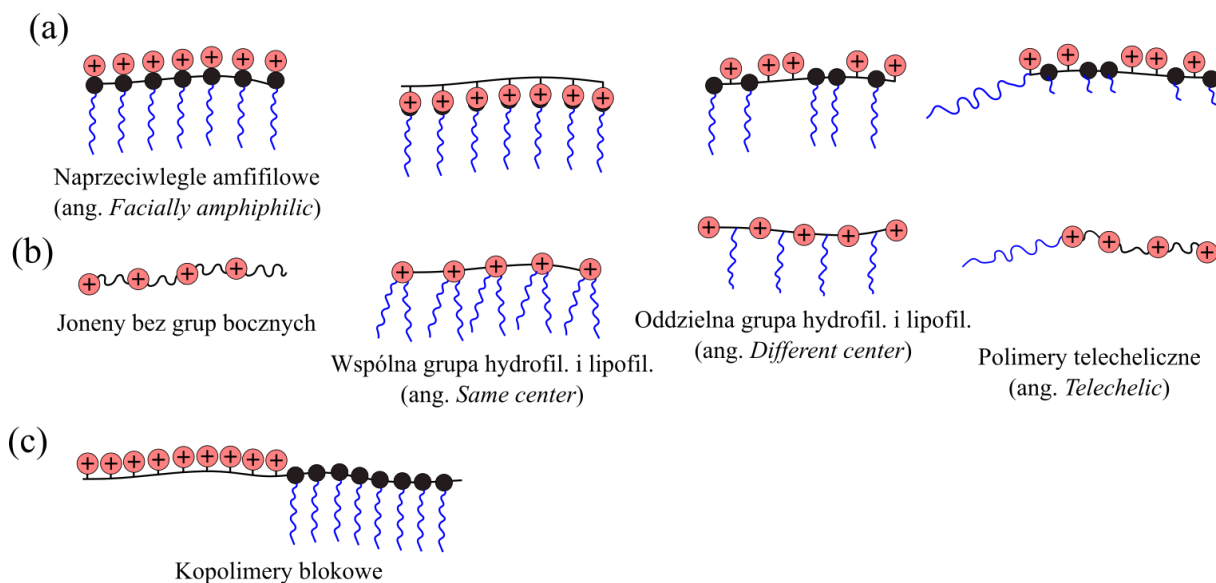
Poza aktywnością przeciwdrobnoustrojową polikationy testowane są także jako czynniki transfekcyjne ułatwiające wprowadzenie obcego DNA do komórek oraz w systemach dostarczania leków jako stabilizatory nośników, np. liposomów, lub nośniki same w sobie w postaci miceli/agregatów.^{172,173} W przypadku zastosowań przeciwdrobnoustrojowych polikationy są badane jako pokrycia powierzchni (od ścian szpitalnych po implanty), hydrożele oraz substancje czynne w roztworach wodnych.¹⁷⁴ Niniejsza rozprawa skupia się na zastosowaniu przeciwbakteryjnych polikationów jako potencjalnej alternatywy dla obecnie stosowanych antybiotyków, dlatego też w przeglądzie literatury poruszyłem tylko temat związków rozpuszczalnych w wodzie, tj. SMAMPs. Opisane w literaturze SMAMPs charakteryzują się różną geometrią i kształtem. Można znaleźć doniesienia na temat SMAMPs liniowych, rozgałęzionych,¹⁷⁵ dendrymerycznych,^{176,177} dendronów,¹⁵⁰ polimerów gwieżdzistych^{14,17,178} i innych.^{179,180} W ramach swojej rozprawy skupiłem się głównie na polikationach liniowych i w związku z tym zdecydowałem się na zawężenie przeglądu literatury do liniowych SMAMPs.

Aby racjonalnie planować strukturę SMAMPs niezbędne jest dokładne zrozumienie wpływu ich poszczególnych parametrów i elementów strukturalnych na aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz biozgodność. W celu poznania zależności struktura-aktywność (SAR, ang. *structure-activity relationship*) polikationów wiele grup badawczych syntetyzowało całe serie pochodnych, różniące się wybranym parametrem strukturalnym, i przeprowadziło

oznaczenia ich aktywności. Poniżej przedstawiłem wybrane doniesienia na temat badań najważniejszych parametrów strukturalnych SMAMPs.

6.1. Architektura (położenie grupy hydrofobowej względem kationowej)

Według obecnego stanu wiedzy AMPs i SMAMPs adsorbując na powierzchni dwuwarstwy fosfolipidowej przyjmują stopniowo w pełni amfifilową konformację, która pozwala na skuteczne oddziaływanie fragmentów hydrofobowych makrocząsteczki z wnętrzem dwuwarstwy. Głębokość na jaką fragmenty te mogą zanurzyć się w dwuwarstwie, poziom zaburzenia jej struktury, a także różnica w ciśnieniu bocznym jakie wywiera część hydrofilowa oraz hydrofobowa na dwuwarstwę, wydają się silnie zależeć od struktury cząsteczki polikationu. W literaturze szeroko dyskutowanych jest kilka możliwych struktur polikationów, w rozumieniu różnego położenia względem siebie grup hydrofobowych, kationowych i łańcucha głównego polimeru, nazywanych także różną architekturą (Rysunek 15).^{14,17}



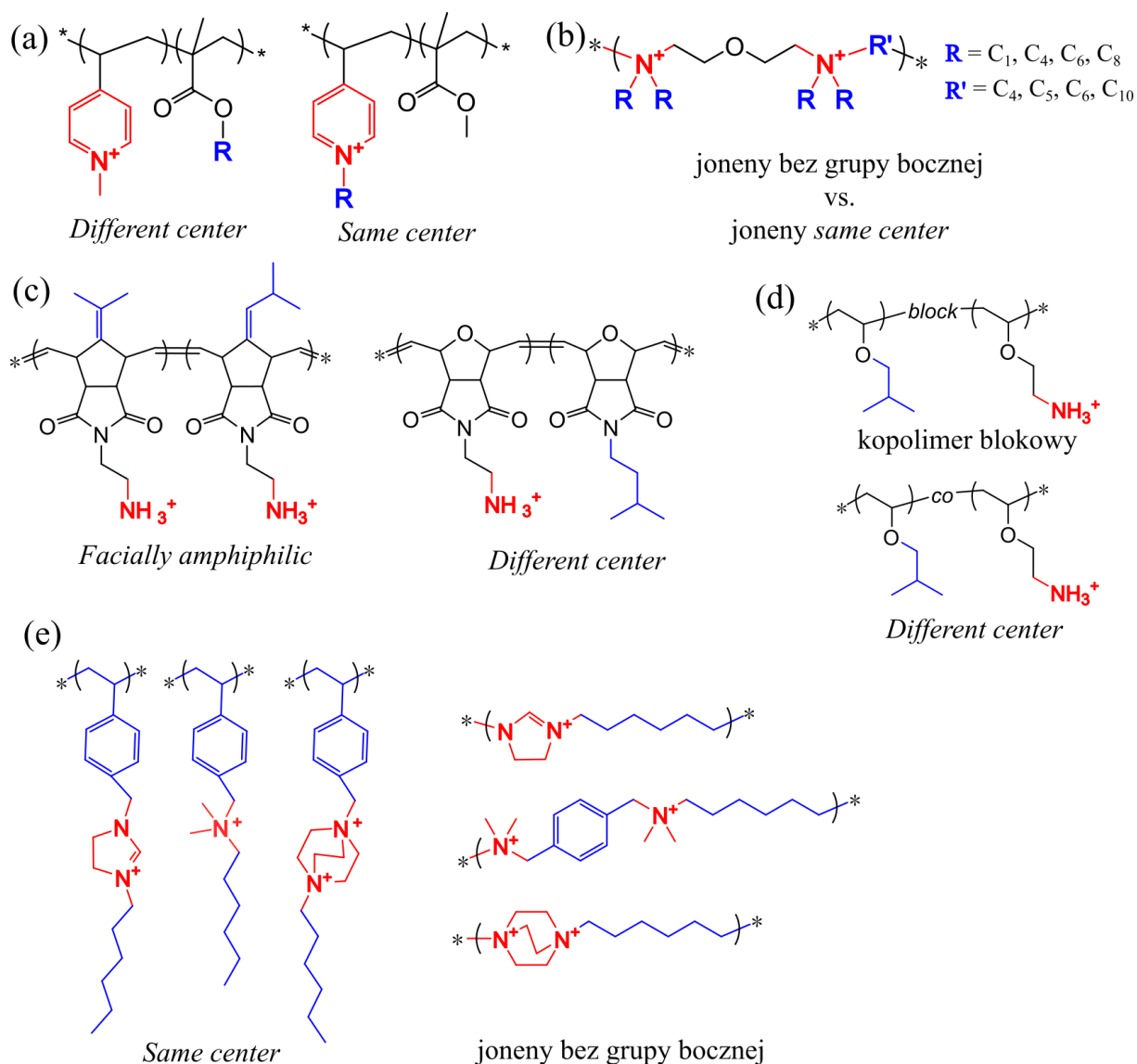
Rysunek 15. Schematyczna prezentacja najczęstszych połączeń grupy hydrofobowej z kationową względem łańcucha głównego polimeru dla SMAMPs (a) zawierających grupę kationową w łańcuchu bocznym oraz (b) jonenów; (c) kopolimery blokowe.

Jednym z kryterium podziału architektury liniowych polikationów jest położenie grupy kationowej względem łańcucha głównego polimeru, co pozwala na wyróżnienie polimerów z grupą kationową ulokowaną w łańcuchu bocznym oraz jonenów (Rysunek 15a i b). Natomiast podział ze względu na wzajemne położenie grup kationowych i hydrofobowych pozwala wyróżnić polikationy zawierające obie grupy w obrębie jednostki powtarzalnej ulokowane po

przeciwnych stronach łańcucha głównego (naprzeciwległe amfifilowe, ang. *facially amphiphilic*), oraz po tej samej stronie gdzie obie grupy są połączone bezpośrednio ze sobą (ang. *same center*). Ponadto można wyróżnić polikationy o oddzielnych grupach hydrofobowych i kationowych (ang. *different center*), polimery telecheliczne posiadające grupę hydrofobową w postaci alkilowej grupy końcowej (ang. *telechelic*) oraz kopolimery blokowe (Rysunek 15c) o dobrze rozdzielonych jednostkach kationowych i hydrofobowych.^{14,17,181}

V. Sambhy i wsp. jako jedni z pierwszych zaprezentowali badania nad różnicą w aktywności SMAMPs typu *same center* oraz *different center* stosując bibliotekę kopolimerów poliwinylpirydyny oraz polimetakrylanu (Rysunek 16a). Wyniki ich badań jednoznacznie wskazały na trochę silniejszą aktywność przeciwbakteryjną oraz znacznie silniejszą aktywność hemolityczną polikationów typu *different center*, co świadczy o lepszej selektywności polimerów *same center*.⁷⁸ Grupa badawcza G. N. Tew'a na przykładzie polinorbornenów (Rysunek 16c) wykazała mocniejszą aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz wyższą selektywność polinorbornenów typu *facially amphiphilic* w porównaniu do *different center*.⁹⁴ Porównując aktywność kationowych kopolimerów blokowych i statystycznych poli(winyloeteru) (Rysunek 16d) grupa K. Kurody stwierdziła porównywalną aktywność przeciwbakteryjną obu typów polimerów, znacznie wyższą aktywność hemolityczną kopolimerów statystycznych oraz zdolność do agregacji RBCs przez kopolimery blokowe.⁷⁵

J. Gua i wsp. dokonali pierwszej próby bezpośredniego porównania aktywności polikationów *same center* (Rysunek 15a) z jonenami bez grupy bocznej (Rysunek 15b). W tym celu zsyntetyzowali trzy kationowe pochodne polistyrenu oraz ich analogi w postaci jonenów o zbliżonej strukturze i średniej masie molekularnej (Rysunek 16e). Badania nad aktywnością biologiczną wykazały jednoznacznie dużo wyższą aktywność przeciwbakteryjną oraz znacznie niższą hemolityczną jonenów, co przekłada się na ich wyższą selektywność.¹⁵⁷ C. Mattheis i wsp. sprawdzili aktywność serii jonenów różniących się hydrofobowością grupy bocznej oraz łańcucha głównego (Rysunek 16b), badając w ten sposób różnicę między aktywnością przeciwbakteryjną jonenów bez grupy bocznej (dla $R = CH_3$) oraz jonenów *same center* (dla $R' = C_4$ oraz $R > CH_3$). Wyniki ich badań pokazują niemal całkowity brak wpływu długości grupy R' na MIC oraz znaczny spadek aktywności dla podstawników R dłuższych od grupy metylowej, co świadczy o słabszym działaniu jonenów *same center* w porównaniu z tymi bez grupy bocznej (Rysunek 15b).¹⁸²

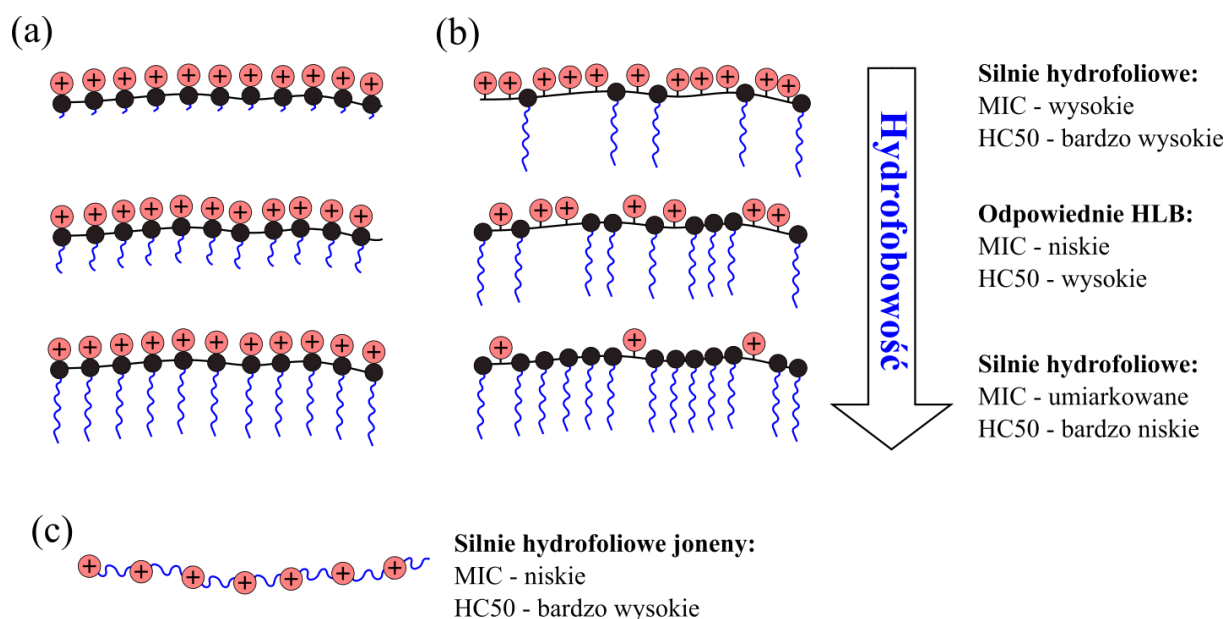


Rysunek 16. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem architektury na aktywność.

6.2. Równowaga lipofilo-hydrofilowa

Jednym z najszerzej zbadanych parametrów jest równowaga lipofilo-hydrofilowa (HLB, ang. *hydrophilic-lipophilic balance* lub *amphiphilic balance*). Równowaga ta modulowana jest najczęściej poprzez kopolimeryzację monomerów hydrofobowych i hydrofilowych w różnych proporcjach (Rysunek 17b)^{56,65} lub zastosowanie podstawników alkilowych o różnej długości pozwalających modulować hydrofobowość na poziomie monomeru (Rysunek 17a).^{60,183} Początkowo hydrofilowe fragmenty SMAMPs były tożsame z fragmentem kationowym. W związku z tym pierwsze podejścia do modulacji HLB wiązały się najczęściej ze zmianą gęstości dodatniego ładunku wzdłuż łańcucha polimerowego, będącej również istotnym parametrem

wpływającym na oddziaływanie z dwuwarstwą fosfolipidową. Rozważane jest nawet pojęcie równowagi kationowo-hydrofobowej (ang. *cationic-hydrophobic balance*) w kontekście SMAMPs.⁵⁴



Rysunek 17. Zobrazowanie strategii modulowania HLB polikationów na poziomie (a) monomeru oraz (b) poprzez kopolimeryzację monomerów hydrofobowych i hydrofilowych; (c) schematyczna zobrazowanie jonów.

Ogólnym wnioskiem, jaki można wyciągnąć z wielu opublikowanych prac dotyczących polikationów z grupą kationową w łańcuchu bocznym, jest niska aktywność najbardziej hydrofilowych polikationów, oraz wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej wraz ze wzrostem hydrofobowości cząsteczki (Rysunek 17a i b).^{56–58,60,65,78,94,97,98,102,103,150,183} Natomiast nadmierny wzrost hydrofobowości prowadzi do obniżenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej SMAMPs, co może być związane z formowaniem się nieaktywnych agregatów polimerowych lub obniżeniem rozpuszczalności w wodzie.^{57,78,94,102} Wymagana obecność odpowiednio hydrofobowych fragmentów w cząsteczce polikationu tłumaczona jest skuteczniejszą penetracją hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy fosfolipidowej prowadzącą do jej destabilizacji.^{14,184} Rosnąca hydrofobowość polikationów prowadzi do monotonicznego wzrostu aktywności hemolitycznej w przypadku znacznej większości zbadanych platform polimerowych. Interesujące jest, że ma to miejsca nawet w przypadkach, gdy obserwowano spadek aktywności przeciwdrobnoustrojowej przez nadmiernie hydrofobowe podstawniki.^{57,78,94,102} W pracach tych zasugerowano, że należy poszukiwać optymalnego HLB, aby utrzymać jak najwyższą aktywność polikationów przy jak najniższej hemolityczności.

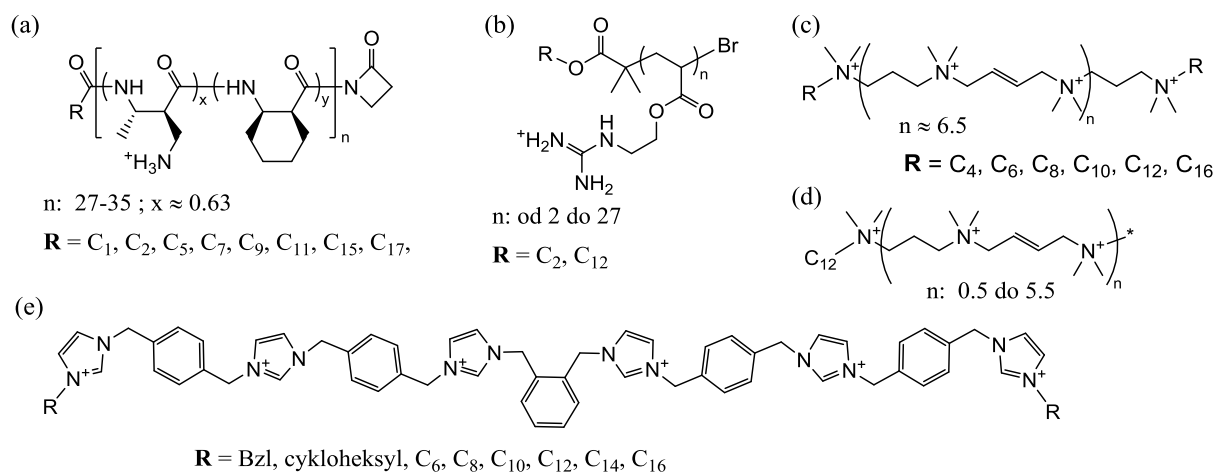
Wyniki w pewnym stopniu niezgodne z powyższą regułą opublikowano dla jonenów. Znane są względnie hydrofilowe jony, niezawierające znacznej ilości hydrofobowych fragmentów w stosunku do hydrofilowych, które wykazują bardzo silne właściwości przeciwbakteryjne i pomijalnie niską hemolityczność (Rysunek 17c).^{39,40,105,108,109,111,182} Jednakże autorzy tych prac nie zbadali dokładniej tego zagadnienia. Intrygujące wyniki otrzymali C. Mattheis i wsp. którzy wykazali, że jonen z *N,N*-metylowymi grupami bocznymi charakteryzuje się silną aktywnością wobec *E. coli*, która znacząco maleje po zamienianiu grup *N,N*-metylowych na C₄, i dopiero wbudowanie silnie hydrofobowej grupy C₈ przywraca w pewnym stopniu tę aktywność (Rysunek 16b).¹⁸²

6.3. Grupa końcowa, polikationy telecheliczne

Grupy końcowe nie wywierają znaczącego wpływu na właściwości polimerów o wysokiej masie molekularnej, jednakże znaczna większość polikationów badanych pod kątem właściwości przeciwdrobnoustrojowych znajduje się na pograniczu pomiędzy oligomerami i polimerami, posiadając od 5 do 60 jednostek powtarzalnych. Charakter grupy końcowej tak krótkich oligomerów może w znacznym stopniu modulować ich właściwości, jak na przykład HLB (Rysunek 15, polimery telecheliczne).

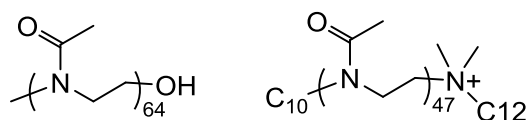
B. Mowery i wsp. zbadali wpływ długości alkilowej grupy końcowej pochodnych nylonu-3 o stopniu polimeryzacji (DP, ang. *degree of polymerization*; liczba jednostek powtarzalnych) w granicach 27-35 merów (Rysunek 18a). Wzrost długości grupy bocznej od C₂ do C₁₂ spowodował obniżenie MIC dla wszystkich badanych bakterii, natomiast dalsze wydłużanie tej grupy spowodowało spadek aktywności. Polimery od C₂ do C₈ wykazały niską aktywność hemolityczną, natomiast pomiędzy C₈ a C₁₈ obserwowany był monotoniczny wzrost tej aktywności wraz ze wzrostem hydrofobowości grupy końcowej.⁹¹ Analogiczne wyniki otrzymali S. Strassburg i wsp.¹¹⁰ oraz S. Riduan i wsp.¹⁵⁸ badający aktywność krótkich jonenów o długości ok. 6 merów z różnymi alkilowymi grupami końcowymi (Rysunek 18c i e). Zaobserwowali najsilniejszą aktywność dla polikationów z grupami końcowymi od C₆ do C₁₂, w zależności od mikroorganizmu i polimeru, oraz gwałtowny wzrost aktywności hemolitycznej dla polimerów z grupą powyżej C₆¹⁵⁸ lub C₈.¹¹⁰ J. Grace i wsp. sprawdzili aktywność homopolimeru metakrylanu, o długości od 7 do 27 merów, zawierającego grupę guanidynową w łańcuchu bocznym, oraz grupę C₂ lub C₁₂ jako grupę końcową (Rysunek 18b). Polikationy z grupą C₂ nie wykazały aktywności zarówno przeciwbakteryjnej jak i hemolitycznej, natomiast wszystkie polimery z grupą C₁₂ były aktywne. Zarówno aktywność hemolityczna jak i przeciwbakteryjna wykazała tendencje wzrostowe wraz ze zmniejszaniem DP, co może być

związane ze wzrostem wpływu hydrofobowej grupy końcowej.⁷⁶ Podobne wyniki otrzymali S. Strassburg i wsp. dla serii jonenów o długości od 1 do 5.5 jednostek powtarzalnych zakończonych grupą C₁₂ (Rysunek 18d), jednakże w przypadku tego polimeru spadek aktywności hemolitycznej był znacznie mocniejszy (15-krotny wzrost HC₅₀) od spadku aktywności przeciwbakteryjnej (5-krotny wzrost MIC).¹¹⁰



Rysunek 18. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem grupy końcowej na aktywność.

Interesujące badania przeprowadzono w grupie badawczej J. C. Tiller'a na metylowej polioksazolinie (PMOX, ang. *poly(methyl oxazoline)*), nietoksycznym i nie aktywnym przeciwko mikroorganizmom polimerze, który nie posiada formalnego ładunku. Wykazali oni możliwość aktywacji PMOX poprzez przyłączenie kationowych, amfifilowych grup końcowych, co podkreśla jak ważne jest uwzględnienie wpływu grupy końcowej polikationów.^{170,185-187} Na przykład przyłączenie łańcucha C₁₆ oraz łańcucha C₁₂ wraz z czwartorzędową solą amoniową zwiększyło MIC wobec *S. aureus* i *E. coli* z więc niż 8900 μM do odpowiednio 6 i 56 μM (Rysunek 19).¹⁷⁰ Badania nad wpływem hydrofobowości grup alkilowych wykazały charakterystyczny przebieg zależności MIC od długości grup alkilowych z minimum w okolicy łańcucha C₁₀,¹⁸⁷ natomiast badania nad zależnością DP od aktywności PMOX z grupami C₁₂ i C₂ wykazały spadek zarówno aktywności przeciwbakteryjnej jak i hemolitycznej wraz ze wzrostem DP.¹⁸⁵



Rysunek 19. Przykładowe struktury PMOX, które posłużyły do zbadania aktywacji nieaktywnego i neutralnego polimeru poprzez amfifilową kationową grupę końcową.

6.4. Dodatek nienaładowanej hydrofilowej grupy bocznej

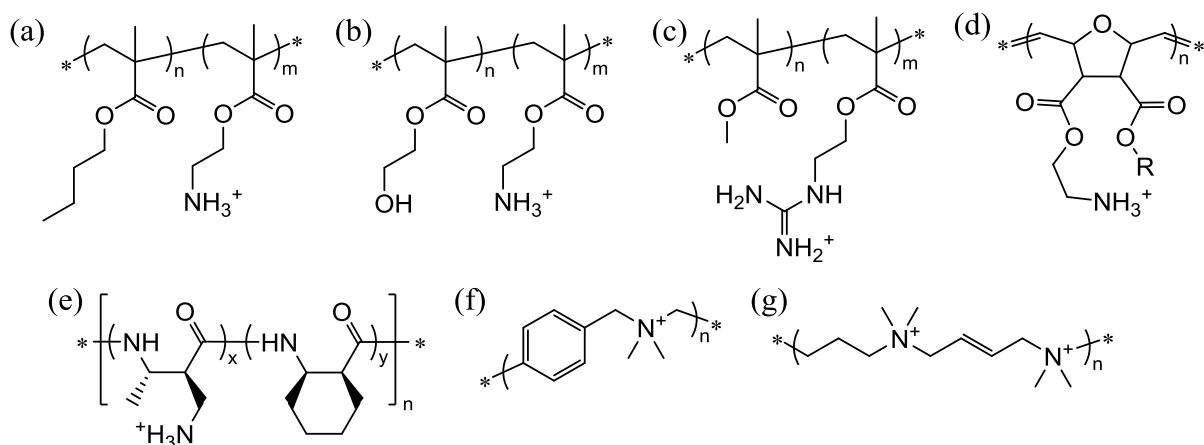
AMPs, a w szczególności HDPs stanowiące element układu odpornościowego ssaków, zawierają poza ugrupowaniami hydrofobowymi i kationowymi także nienaładowane, silnie hydrofilowe struktury w postaci poliamidowego łańcucha głównego oraz niektórych grup bocznych.¹⁴ Aby upodobnić SMAMPs do HDPs, w celu poprawy ich biokompatybilności, w okolicy 2009 roku zaczęły pojawiać się prace dotyczące trójskładnikowych kopolimerów uwzględniające nie-kationowy hydrofilowy składnik, a także homopolimery wzbogacone o taką grupę.

Do tej pory przeprowadzono badania nad wpływem oligomerycznych fragmentów poli(tlenku etylenu) (PEG, ang. *polyethylene glycol*),^{71,73,77,100,188} grup cukrowych,^{100,178,189,190} hydroksylowych^{64,87} oraz amidowych^{79,81,191} na aktywność SMAMPs. Opublikowane są również badania nad poprawą biokompatybilności AMPs, w tym HDPs, poprzez przyłączenie fragmentów PEG.^{192–194} Ogólnym wnioskiem z tych badań jest obniżenie lub nawet wyłączenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej SMAMPs zawierających nienaładowaną hydrofilową grupę, co powiązano z utrudnionym oddziaływaniem z anionową błoną komórkową oraz zwiększoną średnicą hydrodynamiczną. W większości z przytoczonych badań zaobserwowano także znaczne obniżenie aktywności hemolitycznej, co zazwyczaj prowadzi do poprawy selektywności zdefiniowanej jako HC_{50}/MIC . Ponadto wykazano spadek cytotoksyczności polikationów po wbudowaniu do ich struktury fragmentów cukrowych,^{178,189,190} a także po zwiększeniu zawartości merów PMOX w amfifilowym kopolimerze PMOX-PEI.¹⁹¹

6.5. Średnia masa molowa

Stabilność kompleksów rośnie wraz z liczbą wiązań, które łączą dwie struktury stanowiące go. Dlatego też całkowita liczba grup kationowych oraz hydrofobowych, które mogą oddziaływać z dwuwarstwą lipidową, przypadających na jedną cząsteczkę polikationu może wpłynąć na ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Zwiększając średnią liczbę merów przypadających na jeden łańcuch polimerowy można hipotetycznie zwiększyć siłę oddziaływania z dwuwarstwą. Średnia długość polimeru przekłada się natomiast na jego średnią masę molekularną.

Grupa badawcza K. Kuroda zbadła, jako jedna z pierwszych, wpływ długości SMAMPs, na przykładzie polimetakrylanu (Rysunek 20a), na ich aktywność przeciwbakteryjną oraz hemolityczną. Wykazali oni delikatny spadek aktywności wobec *E. coli* wraz ze wzrostem DP od ok. 7 do ok. 39 przy jednoczesnym wzroście HC₅₀, co przekłada się na wzrost selektywności wraz ze spadkiem DP.⁵⁵ Natomiast w innej swojej pracy zaprezentowali dane przedstawiające wyraźny spadek MIC wobec *E. coli* homopolimeru z łańcuchem amino-etylowym wraz ze wzrostem DP od ok. 9 do ok. 30, oraz niewielki wpływ długości łańcucha kopolipolimerów zawierających powyżej 40% merów hydrofobowych (zawierających grupę butylową) (Rysunek 20a).⁵⁸ X. Yang i wsp. powtórzyli badania nad wpływem masy polimetakrylanu przedstawionego na Rysunku 20a na większej liczbie różnych bakterii, na przykładzie bardziej hydrofilowego analogu z Rysunku 20b. Otrzymane przez nich wyniki wskazują na mocniejszy wpływ DP na aktywność bardziej hydrofilowych kationowych polimetakrylanów.⁶⁴ Natomiast K. Locock i wsp., badający polimetakrylany zawierające grupę guanidynową (Rysunek 20c), stwierdzili spadek aktywności przeciwko *S. aureus* wraz ze wzrostem DP.⁶² Podobną zależność dla *S. aureus* zaobserwowali K. Lienkamp i wsp. dla polinorbornenów (Rysunek 20d), co wytłumaczyli „efektem sita” grubej ściany peptydoglikanowej otaczającej komórki bakterii gram-dodatnich (Rysunek 1), która zatrzymuje polikationy o większej masie. Autorzy tej pracy wykazali ponadto monotoniczny spadek HC₅₀ i MIC wobec *E. coli* wraz ze wzrostem DP.¹⁸³ Badania nad wpływem DP na aktywność pochodnych nylonu-3 przeprowadzone w grupie S. H. Gellman’a również wykazały delikatny spadek aktywności wobec *S. aureus* wraz ze wzrostem DP oraz wzrost wobec *E. coli*, a także znaczny wzrost aktywności hemolitycznej (Rysunek 20e).⁹¹



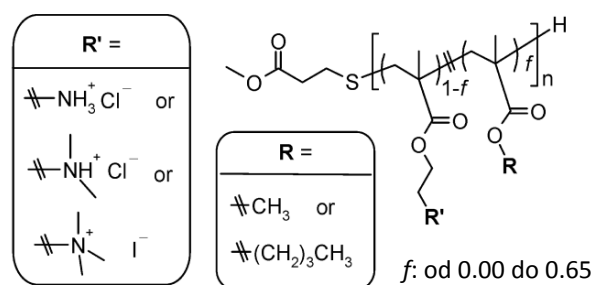
Rysunek 20. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem średniej masy molowej na aktywność.

Badania nad wpływem długości jonenów na ich aktywność zbadali już w 1990 roku T. Ikeda i wsp. stwierdzając silny wzrost aktywności wraz z DP (Rysunek 20f).^{108,109} Do zbieżnych wniosków doszli A. Strassburg i wsp. również badający wpływ DP jonenów (Rysunek 20g).¹¹⁰ Obie grupy badawcze przeprowadziły badania nad jonenami otrzymanymi na drodze sekwencyjnego dołączania kolejnych merów oraz ich wielkocząsteczkowymi odpowiednikami otrzymanymi na drodze polimeryzacji stopniowej.

6.6. Rodzaj i gęstość grup kationowych

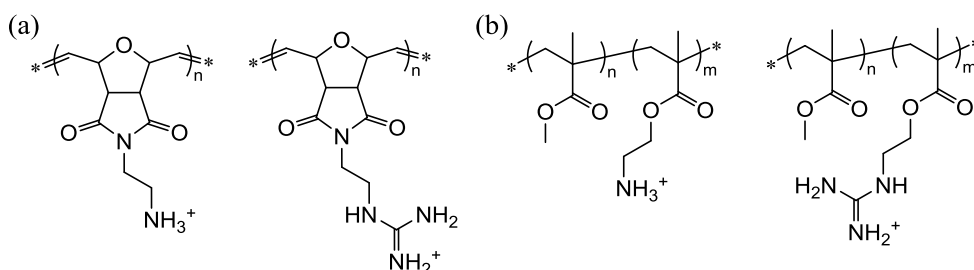
Pierwszy etap mechanizmu działania SMAMPs zakłada ich oddziaływanie elektrostatyczne z anionową powierzchnią komórki, co w konsekwencji prowadzi do adsorpcji na powierzchni dwuwarstwy fosfolipidowej. Dlatego też rodzaj grup kationowych, od których zależy powinowactwo cząsteczki polikationu do anionowych struktur otoczki komórkowej, oraz gęstość rozmieszczenia tych grup wzdłuż łańcucha polimerowego, jest kolejnym parametrem wpływającym na aktywność.

E. Palermo i wsp. zbadali aktywność serii polimetakrylanów różniących się między sobą hydrofobowością oraz rodzajem grupy aminowej (Rysunek 21).⁵⁶ W przypadku serii zawierającej grupę metylową w łańcuchu bocznym ($R = C_1$) najwyższą aktywność wobec *E. coli* wykazały polimery z pierwszorzędową grupą aminową, następnie z trzeciorzędową, a z czwartorzędową grupą amoniową okazały się być nieaktywne. Natomiast w bardziej hydrofobowej serii polikationów z grupą butylową ($R = C_4$) wszystkie pochodne wykazały znaczną aktywność, która była najwyższa dla aminy pierwszorzędowej i najniższa dla czwartorzędowej soli amoniowej. W innej pracy ta sama grupa badawcza wykazała, że polimetakrylan z pierwszorzędową grupą amoniową silniej oddziałuje z grupą fosforanową obecną w fosfolipidach, co posłużyło autorom jako wyjaśnienie różnic w aktywności przeciwbakteryjnej. Mocniejsze oddziaływanie grupy $-NH_3^+$ wytłumaczono możliwością tworzenia wiązań wodorowych z grupą ortofosforanową, oraz brak takiej możliwości dla grupy $-NMe_3^+$.⁷⁴



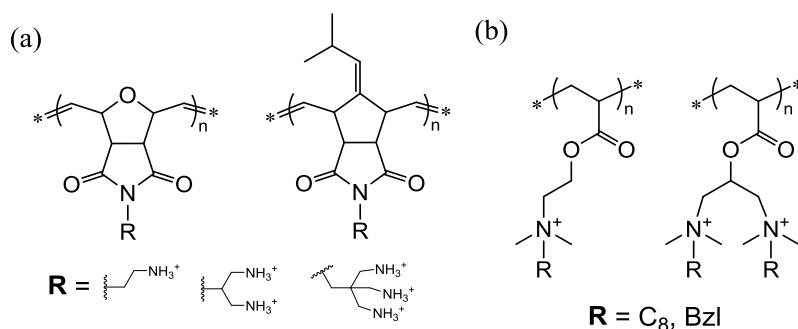
Rysunek 21. Struktura polimetakrylanów otrzymanych w grupie K. Kuroda, które posłużyły do oceny wpływu rodzaju grupy kationowej na aktywność. Grafika zaczerpnięta z lit.⁵⁶

Na przykładzie polinorbornenów⁹⁹ oraz polimetakrylanów^{62,76,195} zbadano różnicę w aktywności pomiędzy SMAMPs zawierającymi pierwszorzędową grupę aminową oraz guanidynową (Rysunek 22). Wyniki otrzymane dla obu grup polimerów świadczą o znacznie wyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz niższej hemolityczności polimerów z grupą guanidynową. Szersze badania nad mechanizmem przedstawionych polinorbornenów wykazały, że polimery guanidynowe pomimo silnego działania bakteriobójczego nie zaburzają struktury błony komórkowej, co wskazuje na ich wewnątrzkomórkowy mechanizm działania.⁹⁹ Wynik ten jest zgodny z faktem, że peptydy penetrujące komórki (CPPs, ang. *cell-penetrating peptides*), zdolne do swobodnej migracji przez błonę komórkową, zawierają znaczne ilości argininy posiadającej grupę guanidynową.¹⁹⁶ Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania może tłumaczyć niską hemolityczność tych polikationów, ale może być również powodem ich wysokiej cytotoksyczności. J. L. Grace i wsp. wykazali wyższą cytotoksyczność polimetakrylanowej pochodnej zawierającej grupę guanidynową w porównaniu od jej analogu z grupą aminową.⁷⁶



Rysunek 22. Struktura polikationów które posłużyły do zbadania różnicy pomiędzy pierwszorzędową grupą aminową, a guanidynową.

Grupa badawcza N. Tew'a zbadła pochodne polinorbornenu zawierające różną ilość grup kationowych przypadających na jedną jednostkę powtarzalną polimeru (Rysunek 23a). Zwiększenie liczby grup kationowych obniżyło aktywność hemolityczną bardziej hydrofobowej pochodnej (bardziej hydrofilowa eterowa pochodna była niehemolityczna) oraz wywarło dodany wpływ na właściwości przeciwbakteryjne.⁹⁸ H. Wang i wsp. badając geminalne kationowe pochodne akrylanu również zaobserwowali wyższą aktywność pochodnych o większej liczbie grup kationowych w jednostce powtarzalnej (Rysunek 23b).⁶³



Rysunek 23. Struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem gęstości rozmieszczenia grup kationowych.

6.7. Struktura łańcucha głównego SMAMPs

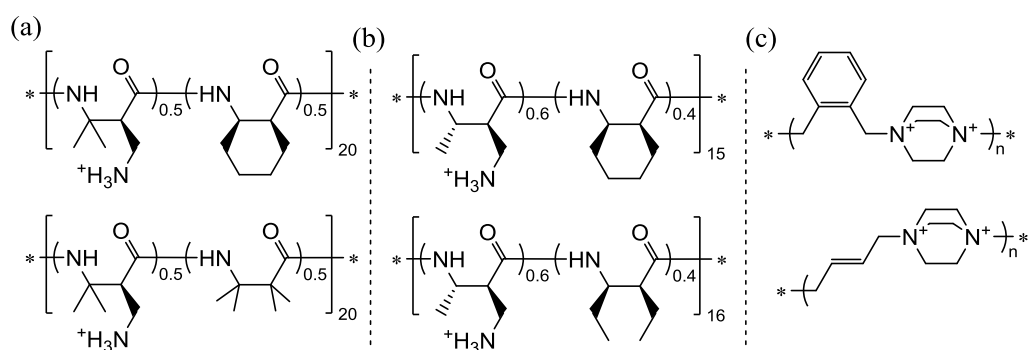
Amfifilowe polikationy o umiarkowanej hydrofobowości w roztworze wodnym mogą przyjmować różne konformacje, które charakteryzują się różnym powinowactwem do struktur otoczki komórkowej mikroorganizmów. Przyjmuje się, że w postaci wolnej posiadają konformację kłęбка statystycznego, charakteryzującego się lokalną amfifilowością, która ulega uporządkowaniu do globalnie amfifilowej konformacji podczas oddziaływania z dwuwarstwą fosfolipidową (Rysunek 5).^{14,17,54} Ponieważ możliwe zmiany konformacyjne oraz stabilność poszczególnych konformerów wydają się zależeć od właściwości łańcucha głównego polikationu, jego struktura może mieć znaczący wpływ na aktywność biologiczną SMAMPs. W literaturze istnieją doniesienia na temat SMAMPs o różnej budowie łańcucha głównego (Rysunek 6), jednakże niewiele jest badań nad bezpośrednim wpływem poszczególnych aspektów budowy tego łańcucha, jak na przykład elastyczności (swobody rotacji) oraz izomerii podstawienia, bez wpływania na całkowite HLB.¹⁴

6.7.1. Sztywność

Zagadnienie wpływu elastyczności kationowych makrocząstek na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową zostało stosunkowo szeroko zbadane dla AMPs.^{197–201} Badania te

obejmowały modulację sztywności poprzez wbudowanie glicyny lub proliny do cząsteczki peptydu^{197–200} oraz zwiększenie makrocyklicznego pierścienia poprzez dodanie kolejnych grup metylenowych,²⁰¹ co pociąga za sobą także zmiany w równowadze hydrofilo-lipofilowej.

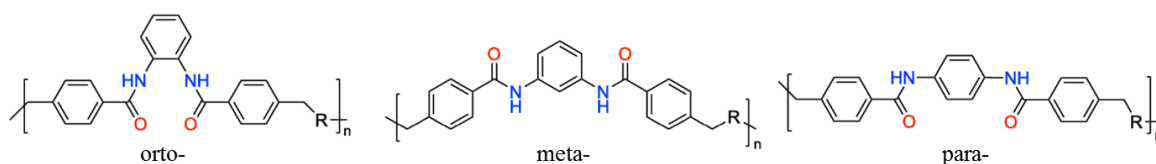
Grupa badawcza S. H. Gellman’a przeprowadziła badania nad wpływem sztywności łańcucha głównego SMAMPs stosując pochodne nylonu-3 zawierające taką samą ilość atomów węgla. W jednej ze swoich prac wykazali wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową i niższą hemolityczną usztywnionej pochodnej zawierającej cykliczną grupę boczną (Rysunek 24a).⁸⁹ Natomiast w drugiej porównywalną aktywność przeciwdrobnoustrojową giętkiej i usztywnionej wersji nylonu-3 oraz wyższą aktywność hemolityczną usztywnionej (Rysunek 24b).⁸⁸ Badania przeprowadzone przez Y. Yuan i wsp. na serii jonenów zawierających łączniki w postaci *orto* podstawionego pierścienia beznenu oraz butylenu (Rysunek 24c) wykazały wyższą aktywność tych drugich, co autorzy przypisali większej elastyczności grupy butylenowej. Należy jednak zauważyć, że w tym przypadku jonen sztywny charakteryzował się również wyższą hydrofobowością.³⁹



Rysunek 24. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem elastyczności łańcucha głównego SMAMPs.

6.7.2. Izomeria położenia

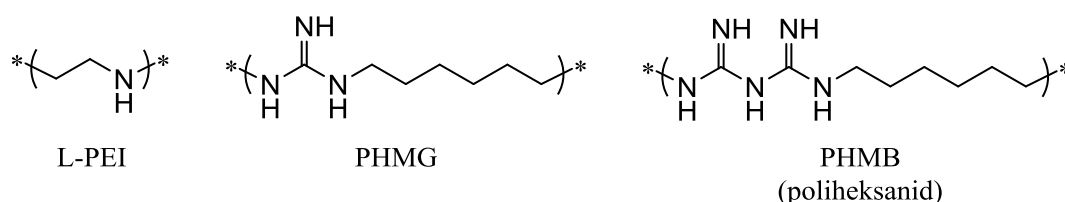
Izomeria położenia została zbadana dla jonenów jako izomeria konstytucyjna pierścienia benzenowego.^{39,202} Wyniki otrzymane przez J. Mayr i wsp. dla serii jonenów o izomerii *orto*, *meta* i *para* (Rysunek 25) świadczą o najniższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej serii *orto*, co autorzy tłumaczą łatwiejszym formowaniem się agregatów o niższej aktywności, oraz braku znaczących różnic między *meta* i *para*. Najśłabszą aktywność hemolityczną wykazały jony *meta*.²⁰² Y. Yuan i wsp. zaobserwowali natomiast w serii swoich jonenów wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową izomerów *orto* w porównaniu do *para*.³⁹



Rysunek 25. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem izomerii łańcucha głównego SMAMPs. Schemat zaczerpnięty z lit.²⁰²

7. Aktywność biobójcza jononów

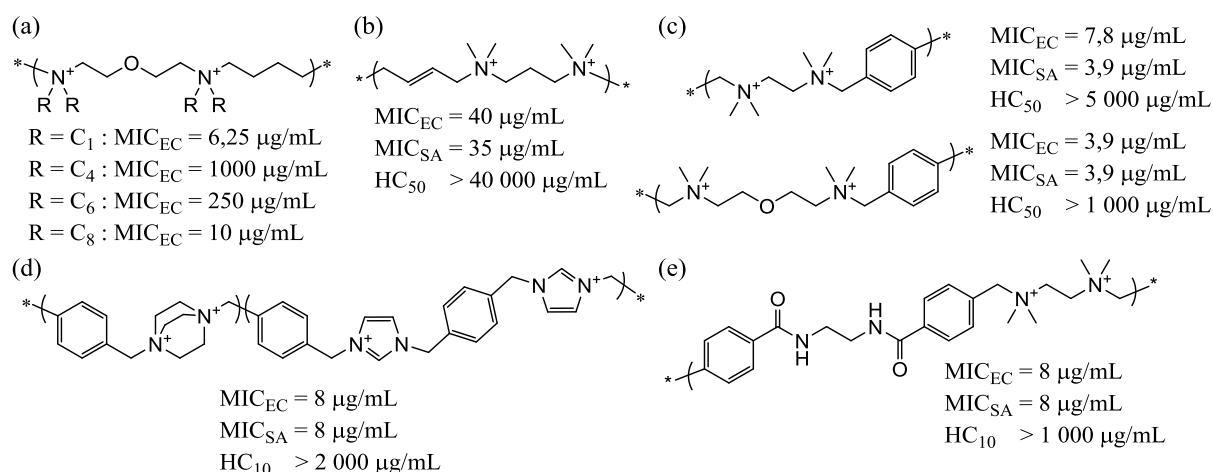
Do najbardziej znanych i najszerzej zbadanych liniowych jononów należą liniowa polietylenoimina (L-PEI) oraz poli(heksametyleno-guanidyna) (PHMG) i poli(heksametyleno-bi-guanidyna) (PHMB), nazywana także poliheksanidem (Rysunek 26). Ładunek dodatni tych związków pochodzi od ulegających protonowaniu grup aminowej, guanidynowej i bi-guanidynowej. Zarówno L-PEI, jak i jej rozgałęziona forma (B-PEI, ang. *branched PEI*), znane są ze zdolności do poprawy transfekcji genów. B-PEI uważana jest nawet za złoty standard jako nie-wirusowy wektor transfekcyjny i dostępna handlowo pod nazwą jetPEI®.^{203,204} Ponadto L-PEI wykazuje stosunkowo silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz zdolność do uszkodzania błony komórkowej bakterii.^{175,205} Jednakże ze względu na wysoką cytotoksyczność oraz hemolityczność jej zastosowanie w medycynie jest obecnie mocno ograniczone,^{206,207} co jest motywacją do podejmowania badań nad nowymi modyfikacjami L-PEI.^{203,208} PHMG i PHMB również wykazują silną aktywność przeciwdrobnoustrojową^{209–211} poprzez mechanizm działania oparty o zaburzanie struktury błony komórkowej.^{212,213} Jednakże doniesienia sugerujące wewnątrzkomórkowy mechanizm, np. poprzez interakcje z DNA, również istnieją.²¹⁴ Powszechnie używany jako antyseptyk PHMB do niedawna uważany był za nietoksyczny, jednakże ostatnie doniesienia literaturowe dowodzą aktywności cytotoksycznej względem komórek wątroby i płuc.^{215,216}



Rysunek 26. Struktury najszerzej zbadanych liniowych jononów.

Według mojej oceny najbardziej intrygujące i najciekawsze właściwości, pod kątem zastosowania jako nowe antybiotyki, wykazują jonony będące czwartorzędownymi solami

amoniowymi. Tak jak zaznaczyłem w Podrozdziale 6.2., znaczna większość polikationów o grupie kationowej ulokowanej w łańcuchu bocznym wymaga obecności odpowiednio hydrofobowych grup funkcyjnych, aby zoptymalizować aktywność przeciwdrobnoustrojową względem hemolitycznej (Rysunek 17a i b).^{58,65,78,88,95} Natomiast badania nad hydrofobowością grupy bocznej jonenów *same center* (Rysunek 27a) wykazały najwyższą aktywność najbardziej hydrofilowych struktur ($R=C_1$). Zamiana grupy R z C_1 na C_4 spowodowała 160-krotny wzrost MIC wobec *E. coli*. Dalsze wydłużanie grupy alkilowej poprzez C_6 do C_8 skutkowało obniżaniem MIC względem C_4 , jednakże aktywność dorównująca najbardziej hydrofilowej pochodnej nie została osiągnięta. Ponadto zmiana hydrofobowości łańcucha głównego nie wpłynęła na badaną aktywność (Rysunek 16b).¹⁸² Autorzy tej pracy nie przeprowadzili niestety badań nad właściwościami hemolitycznymi i mechanizmem działania tych związków. W mojej opinii, przytoczony powyżej wpływ hydrofobowości grupy R na MIC (Rysunek 27a) może świadczyć o odmiennym mechanizmie oddziaływania z dwuwarstwą fosfolipidową silnie hydrofilowych oraz hydrofobowych jonenów. Jonen C_1 może hipotetycznie działać według mechanizmu niewymagającego wbudowania hydrofobowych grup do wnętrza dwuwarstwy, żeby zaburzyć jej strukturę, np. poprzez silne oddziaływanie z głowami anionowych lipidów. Natomiast mechanizm jonenów C_4 , C_6 i C_8 , których grupa kationowa jest trudniej dostępna z przyczyn sterycznych, opiera się w dużej mierze na zaburzeniu struktury dwuwarstwy poprzez oddziaływania hydrofobowe, co tłumaczyłoby wzrost aktywności wraz z hydrofobowością. Już w 1990 roku wykazano, że hydrofilowy jonen przedstawiony na Rysunku 20f, oraz jego pochodne, indukują separację lipidów anionowych w obrębie dwuwarstwy fosfolipidowej tworząc swoiste tratwy lipidowe.¹⁰⁹ Autorzy tej pracy postawili hipotezę, że tratwy te destabilizują strukturę dwuwarstwy zwiększając jej przepuszczalność, co skorelowali z obserwowaną aktywnością przeciwbakteryjną. Hipoteza ta nie zyskała jednak popularności i stosunkowo rzadko dyskutowana jest w pracach eksperymentalnych.



Rysunek 27. Struktury względnie hydrofilowych jonenów będących czwartorzędowymi solami amoniowymi o silnej aktywności przeciwbakteryjnej i niskiej hemolityczności.

Do innych opisanych przykładów względnie hydrofilowych jonenów, o doskonałej selektywności zdefiniowanej jako $\text{HC}_{50}/\text{MIC}$, należy między innymi jonen przedstawiony na Rysunku 27b otrzymany przez A. Strassburg i wsp., którego MIC wobec *S. aureus* i *E. coli* wynosi odpowiednio $35 \mu\text{g/mL}$ i $45 \mu\text{g/mL}$ przy pomijalnie niskiej hemolityczności nawet w stężeniu 40 mg/mL .¹¹⁰ Joneny zawierające grupę aromatyczną w łańcuchu głównym otrzymane przez S. Liu i wsp. (Rysunek 27c) wykazały jeszcze niższy MIC, na poziomie $3,9 - 7,8 \mu\text{g/mL}$, oraz HC_{50} wyższe niż 5 mg/mL .⁴⁰ Joneny otrzymane przez Y. Yuan i wsp., zawierające podjednostkę DABCO oraz imidazol w łańcuchu głównym (Rysunek 27d), a także jonen zawierający grupę amidową w łańcuchu głównym (Rysunek 27e) otrzymany w grupie badawczej Y. Y. Yang'a wykazały MIC $8 \mu\text{g/mL}$ i HC_{10} (stężenie powodujące lizę 10% RBCs) większe niż 1 mg/mL .^{39,44,105} Na przykładzie polikationów z Rysunku 27c i e wykazano zdolność hydrofilowych jonenów do zwiększania przepuszczalności błony komórkowej bakterii.^{40,44} W mojej opinii, silna aktywność przeciwbakteryjna (dwuwarstwa lipidowa bakterii jest silnie anionowa) oraz niezwykle niska hemolityczność (niemal neutralny zewnętrzny listek dwuwarstwy RBCs) jonenów wspierają hipotezę dotyczącą mechanizmu niszczenia błony komórkowej opartego głównie o oddziaływania elektrostatyczne z powierzchnią dwuwarstwy. Zidentyfikowałem brak szczegółowych badań nad mechanizmem działania jonenów z czwartorzędowymi grupami amoniowymi z wykorzystaniem modelowych dwuwarstw fosfolipidowych.

Joneny z czwartorzędowymi grupami amoniowymi charakteryzują się szybką kinetyką działania bakteriobójczego w stężeniach bliskich MIC,^{40,44,105,111} podobnie do innych typów

polikationów.^{42,101,102,104,189} Wykazano również brak nabywania oporności na jony przez bakterie poddawane działaniu tych związków w stężeniach poniżej MIC, podczas gdy w przypadku tradycyjnych antybiotyków MIC wzrastał od 5- do nawet 270-krotnie dla takich samych warunków eksperymentalnych.^{39,40,44} Niektóre z opisanych jonów zostały zbadane pod kątem aktywności wobec izolowanych antybiotykoopornych szczepów klinicznych wykazując zadowalające MIC, w szczególności przeciwko opornym na metycylinę szczepom *S. aureus* (MRSA, ang. *methicillin-resistant S. aureus*) (MIC 4 - 8 µg/mL).^{40,44,111} Polikationy tego typu wykazują również aktywność wobec biofilmów.^{39,44}

Wyniki badań cytotoksyczności jonów przedstawionych na Rysunku 27a metodą MTT wykazały, że stężenie powodujące śmierć połowy (IC₅₀, ang. *inhibitory concentration 50%*) mysich fibroblastów linii L929 przez pochodne o grupie R=C₁ jest niższe niż 25 µg/mL. Wynik ten świadczy o bardzo wysokiej cytotoksyczności tych związków, w porównaniu do MIC w zakresie 6,25 - 1000 µg/mL.¹⁸²

Badania nad toksycznością jonów przeprowadzone przez S. Liu i wsp. (Rysunek 27c), z wykorzystaniem MTT, wykazały cytotoksyczność na poziomie 20% wobec ludzkich fibroblastów w stężeniu 500 µg/mL. Należy tutaj jednak zauważyć, że czas inkubacji wynosił tylko 2 min, zamiast standardowych 24 h. Natomiast badania cytotoksyczności tych samych jonów w stężeniu 500 µg/mL na tych samych komórkach przeprowadzone poprzez pomiar stopnia uwolnienia dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang. *lactate dehydrogenase*) wykazały cytotoksyczność na poziomie kilku procent po 2 min inkubacji i 15% po 1 h inkubacji.⁴⁰ Dalsze badania na myszach wykazały skuteczność jonenu z Rysunku 27c w zwalczaniu skórnych infekcji wywołanych przez *P. aeruginosa*, natomiast dawka tego związku podanego doustnie powodująca śmierć połowy badanych myszy (LD₅₀, ang. *lethal dose*) wyniosła aż 1871 mg/kg.⁴⁰

Y. Yuan i wsp. przeprowadzili badania na myszach pochodnej jonenu z Rysunku 27d w celu określenia skuteczności zwalczania skórnych infekcji wywołanych przez lekooporny szczep *S. epidermidis*. Wyniki badań wykazały skuteczność na poziomie działania ampicyliny, oraz słabszy efekt niż wankomycyna. Autorzy tej pracy nie sprawdzili LD₅₀ badanego związku.³⁹

Wyniki badań przeprowadzonych na myszach z wykorzystaniem jonenu przedstawionego na Rysunku 27e przez W. Lou i wsp. wykazały wysoką skuteczność tego związku w zwalczaniu zapalenia płuc wywołanego wielolekooporną (MDR, ang. *multidrug*

resistant) bakterią *K. pneumoniae*. Polimer ten zadziałał skuteczniej od używanego antybiotyku imipenemu. Badany jonon wykazał LD₅₀ równe 67,5 mg/kg po podaniu dootrzewnowym, natomiast dawka efektywna (ED₅₀, ang. *effective dose*) wyniosła tylko 0,62 mg/kg.⁴⁴

Stosując mysi model infekcji *S. aureus* L. Liu i wsp. zbadali skuteczność *in vivo* pochodnej jonenu przedstawionego na Rysunku 27d składającego się z naprzemiennym fragmentów benzytowych i imidazolowych. Oznaczone LD₅₀ wyniosło 1,72 mg/mL, natomiast ED₅₀ 0,046 mg/mL.¹¹¹

III. Wnioski z badań literatury i założenia pracy

Z przedstawionego w poprzednim rozdziale przeglądu literatury wyłania się obraz względnie hydrofilowych jononów, będących czwartorzędowymi solami amoniowymi, jako związków silnie przeciwbakteryjnych o niskiej aktywności hemolitycznej. Cytotoksyczność ich wacha się natomiast od umiarkowanej do wysokiej. Cechy te sprawiają, że związki należące do tej klasy wydają się mieć potencjał do zastosowania jako nowe antybiotyki pomocne w walce z antybiotykoopornością.

Według T. Ikeda hydrofilowe jonony o dużej gęstości ładunku dodatniego mogą destabilizować dwuwarstwę fosfolipidową poprzez tworzenie tzw. tratw złożonych z anionowych fosfolipidów.¹⁰⁹ Natomiast bardziej hydrofobowe jonony *same center*, działające słabiej od hydrofilowych,¹⁸² mogą takich tratw nie tworzyć przez zatłoczenie sterycznej grupy kationowej oddziałując z dwuwarstwą głównie poprzez oddziaływania hydrofobowe. W związku z tym postanowiłem skupić się w swoich badaniach na jononach *different center* o dużej gęstości ładunku dodatniego, które mogłyby oddziaływać zarówno z hydrofobowym wnętrzem dwuwarstwy jak i tworzyć tratwy lipidowe. Spodziewanym połączeniem tych dwóch efektów byłby znaczny wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz niewielki hemolitycznej.

Ponieważ każda platforma polimerowa wymaga osobnej optymalizacji HLB, w celu otrzymania jak najbardziej selektywnego SMAMPs, badania nad wpływem hydrofobowości grupy bocznej jononów *different center* są jednym z przedmiotów mojej rozprawy. Pomimo dużej ilości publikacji na temat wpływu hydrofobowości na aktywność polikationów, nie opiasano jeszcze systematycznych badań nad wpływem hydrofobowości tej grupy jononów na ich aktywność biologiczną i mechanizm działania.

Aby racjonalnie projektować nowe SMAMPs należy dokładnie znać wpływ poszczególnych modyfikacji ich struktury na aktywność. Pomimo dużej liczby artykułów naukowych opisujących wyniki badań nad wpływem różnych parametrów strukturalnych polikationów na ich właściwości biologiczne, nadal część z tych parametrów nie jest dokładnie zrozumiana i poznana. Należą do nich między innymi sztywność oraz izomeria konstytucyjna łańcucha głównego, które wydają się mieć znaczący wpływ na możliwe zmiany konformacyjne, a tym samym na oddziaływanie z dwuwarstwą fosfolipidową i aktywność przeciwdrobnoustrojową. Kolejnym przedmiotem mojej rozprawy było wzbogacenie wiedzy dotyczącej wpływu tych dwóch parametrów na aktywność jonenów.

Istnieją doniesienia o obniżeniu aktywności hemolitycznej oraz cytotoksyczności niektórych polikationów po wbudowaniu w ich struktury nienaładowanej grupy hydrofilowej, lecz nie opisano takich modyfikacji w przypadku jonenów. Stało się to motywacją do podjęcia badań w tym właśnie kierunku, co jest kolejnym przedmiotem mojej rozprawy.

Selektywność niektórych AMPs oraz SMAMPs wynika w dużej mierze z różnic w składzie fosfolipidowym błony komórkowej bakterii oraz ssaków. Najszerzej dyskutowaną różnicą jest zawartość anionowych fosfolipidów w dwuwarstwie fosfolipidowej - komórki bakteryjne zawierają ich znacznie więcej, co nadaje powierzchni bakterii bardziej ujemny potencjał elektrokinetyczny w porównaniu z komórkami ssaków. Ponadto otoczka komórkowa bakterii zawiera inne struktury o charakterze anionowym, głównie LPS oraz kwasy tejchojowe i lipotejchojowe, które również wpływają na jej ujemny zeta-potencjał. Dzięki temu kationowe amfifilowe cząsteczki silniej oddziałują z mocno anionową powierzchnią bakterii, niż z niemal neutralną powierzchnią komórek ssaków. Drugą ważną różnicą w składzie dwuwarstwy, o udokumentowanym wpływie na aktywność AMPs i SMAMPs, jest zawartość fosfolipidów o ujemnej krzywiznie. Błona komórkowa bakterii zawiera znaczne ilości takich fosfolipidów (np. PE), natomiast błona komórkowa ssaków tylko nieznaczną ilość ulokowaną głównie w wewnętrznym listku dwuwarstwy fosfolipidowej. Dwuwarstwa zbudowana z tych lipidów jest bardziej podatna na destruktywne działanie AMPs i SMAMPs w porównaniu z analogiczną dwuwarstwą złożoną z PC, o zerowej krzywiznie. Wpływ tych różnic w składzie dwuwarstwy na jej oddziaływanie z AMPs i SMAMPs został już stosunkowo szeroko zbadany, lecz, według mej najlepszej wiedzy, nie w kontekście mechanizmu działania jonenów o dużej gęstości ładunku dodatniego.

Podsumowując, głównymi założeniami mojej pracy doktorskiej są: (i) synteza biblioteki nowych jonenów pozwalająca na zbadanie wpływu hydrofobowości, sztywności i izomerii

łańcucha głównego oraz dodatkowej hydrofilowej grupy bocznej na właściwości tych związków; (ii) badania biologiczne otrzymanych jonenów a także (iii) zrozumienie mechanizmu działania jonenów, szczególnie w kontekście składu lipidowego dwuwarstwy fosfolipidowej.

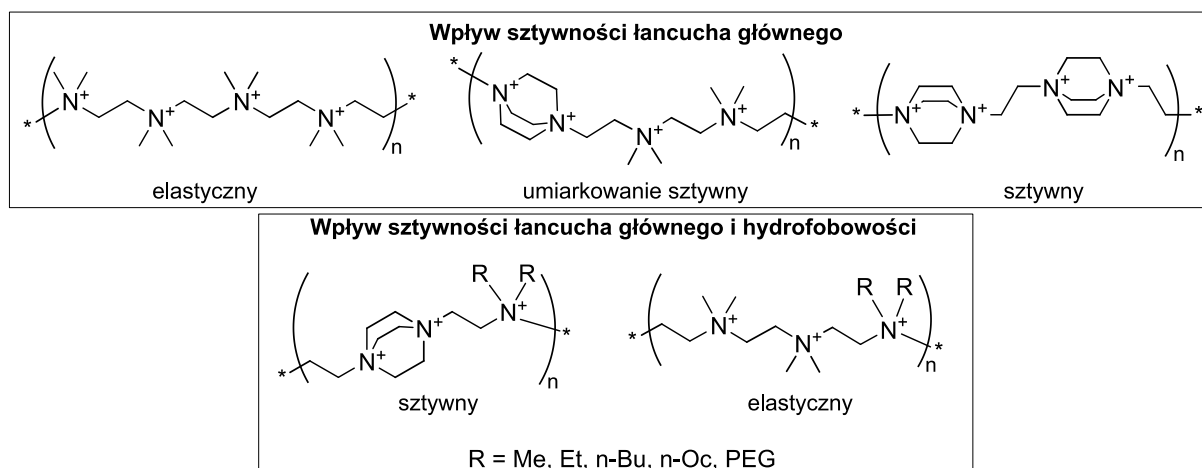
IV. Badania własne i analiza wyników

8. Struktura, synteza oraz charakterystyka polikationów

8.1. Plan biblioteki polikationów opartej na strukturze L-PEI (badania nad stabilnością jonenów o dużej gęstości ładunku dodatniego)

8.1.1. Koncepcja biblioteki jonenów, będących pochodnymi L-PEI

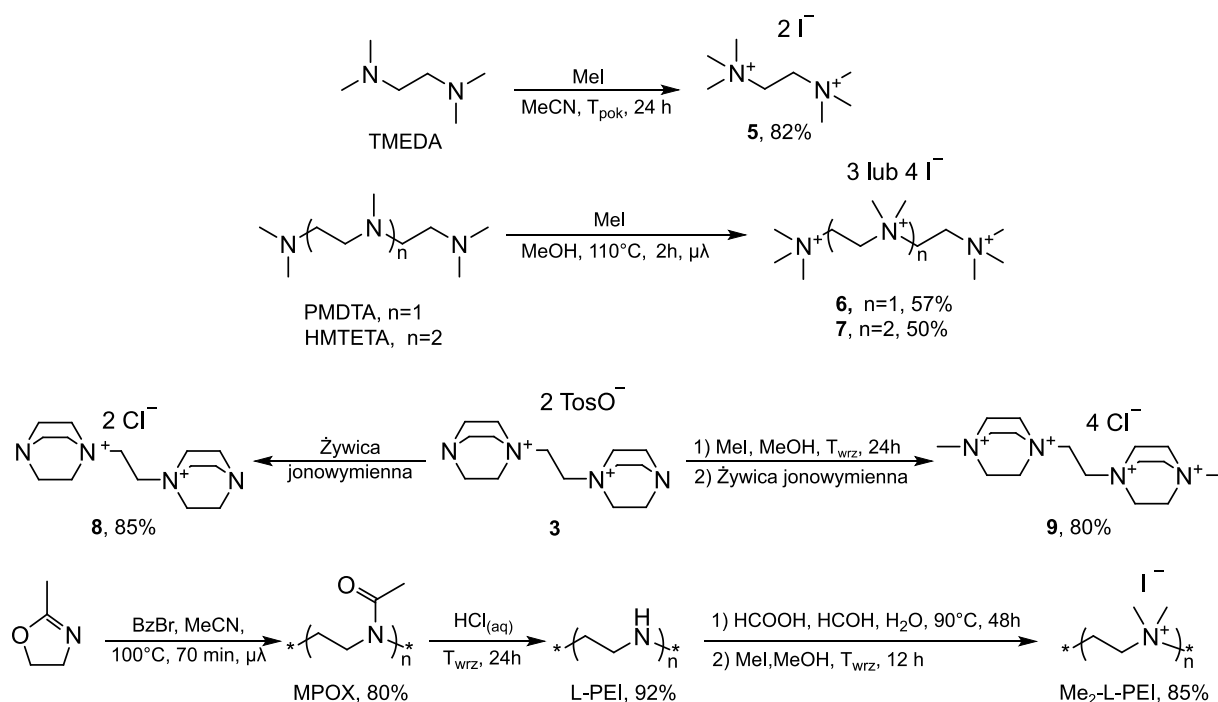
Postawione cele badawcze postanowiłem zrealizować badając właściwości jonenów, będących pochodnymi L-PEI (Rysunek 26) o dobrze zdefiniowanej strukturze pierwszorzędowej, zaprezentowanych na Rysunku 28. Porównanie jonenów o różnej zawartości podjednostki będącej pochodną 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu (DABCO) w łańcuchu głównym miało pozwolić na zbadanie wpływu elastyczności łańcucha głównego tych związków na aktywność biologiczną. Porównanie dwóch serii jonenów, sztywnych i elastycznych, w obrębie których jony różniłyby się dodatkowo podstawnikiem alkilowym, pozwoliłoby mi zbadać wpływ samej hydrofobowości oraz wzajemne interakcje wpływów hydrofobowości i sztywności.



Rysunek 28. Koncepcja struktur polikationów, opartych o strukturę L-PEI, pozwalających na zbadanie wpływu wybranych parametrów na właściwości biologiczne, która nie została zrealizowana.

Pierwszą z zaprezentowanych na Rysunku 28 pochodnych L-PEI, w formie wyczerpująco metylowanej ($\text{Me}_2\text{-L-PEI}$), można otrzymać poprzez prostą reakcję pomiędzy L-PEI, a jodkiem metylu. Pozostałe struktury wymagały natomiast syntezy poprzez reakcję poliaddycji pomiędzy odpowiednimi podwójnymi aminami trzeciorzędowymi oraz podwójnymi bromkami alkilowymi (reakcja Menshutkin'a). Niestety, wiele przeprowadzonych przeze mnie reakcji syntezy monomerów, bądź gotowych polimerów, nie przebiegała zgodnie z oczekiwaniami. Reakcje pomiędzy aminami, a czwartorzędowymi solami 2-bromoetano-1-amoniowymi, jak na przykład związek **1** na Schemacie 1, prowadziły w większości przypadków do pochodnych soli winylo-amoniowych, jako jedynych produktów (analogów pochodnej **2**). Przykładową reakcję pomiędzy **1** i *N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiaminą (TMEDA) prowadziłem w różnych rozpuszczalnikach oraz w różnej temperaturze, otrzymując każdorazowo produkt **2** jako dominujący. Zastosowanie chlorku i tosyłanu zamiast bromku, jako grup odchodzących, również nie przyniosło pożądaných efektów. Najdłuższym otrzymanym sztywnym polikationem była pochodna **4**, zawierająca dwie podjednostki DABCO, którą otrzymałem w dwuetapowej syntezie przedstawionej na Schemacie 1. Ostatni etap alkilowania **3** przy pomocy 1,2-dibromoetanu wymagał wydłużonego czasu reakcji, wynikającego ze znacznie obniżonej reaktywności monokationu DABCO w porównaniu z samym DABCO.²¹⁷ Ważną obserwacją była obecność **2** wśród produktów rozpadu związku **4** pod wpływem różnych amin. Wynik ten sugerował, że obecny w związku **4** układ dwóch podwójnych soli amoniowych DABCO połączonych grupą etylenową jest silnie podatny na reakcję eliminacji Hofmanna. Był również mocną przesłanką ku temu, iż związki zaprezentowane na Rysunku 28 są niemożliwe do otrzymania na drodze poliaddycji.

amoniowych zbadalem wykorzystując modelowe związki **5 - 9** oraz samą Me₂-L-PEI (Schemat 2). Podwójną sól amoniową **5** otrzymałem metylując TMEDA jodkiem metylu w temperaturze pokojowej. Synteza pochodnych **6** i **7** wymagała natomiast zastosowania podwyższonej temperatury (110 °C) oraz reaktora mikrofalowego. Sztywne czwartorzędowe sole amoniowe **8** i **9** otrzymałem z pochodnej **3**, powstałej w reakcji DABCO z tosyłowanym glikolem etylenowym (Schemat 1). Me₂-L-PEI otrzymałem w sekwencji następujących reakcji: polimeryzacji z otwarciem pierścienia oksazoliny metylowej inicjowanej bromkiem benzylu, hydrolizy otrzymanej poli(metylo-oksazoliny) do L-PEI, reakcji Eschwailera-Clarka pozwalającej otrzymać L-PEI w postaci aminy trzeciorzędowej (Me-L-PEI) oraz alkilowania jodkiem metylu. Analiza ¹H NMR otrzymanej Me₂-L-PEI pozwoliła określić stopień konwersji monomerów do czwartorzędowej soli amoniowej na poziomie 95%. Związek ten jest nierozpuszczalny w wodzie demineralizowanej i dopiero w roztworze NaCl o stężeniu 0,4 M rozpuścił się w wystarczającym stopniu, aby możliwe było zarejestrowanie widma ¹H NMR. Czystość wszystkich otrzymanych produktów końcowych wykazałem poprzez analizę elementarną, która potwierdziła skład pierwiastkowy.



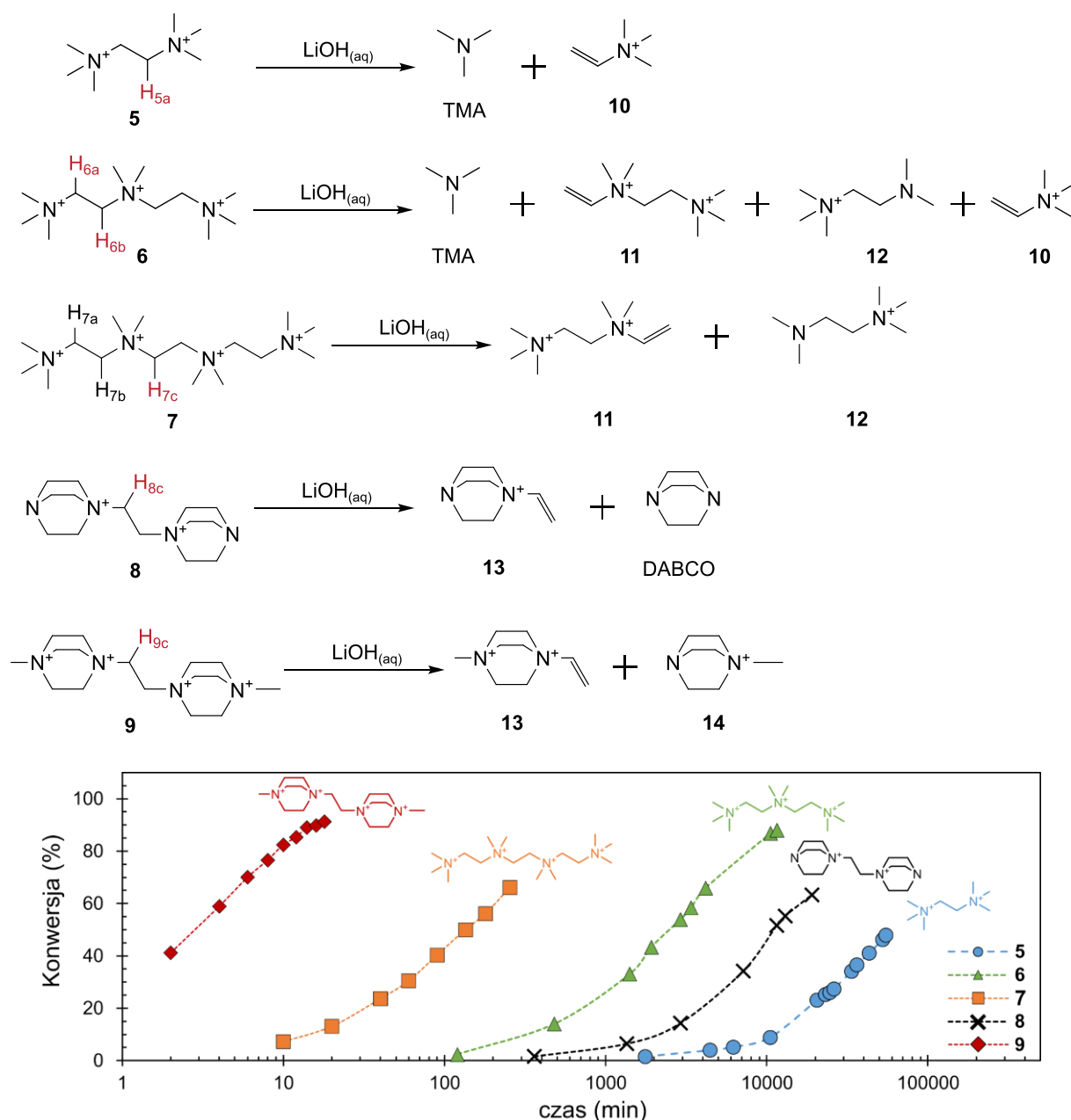
Schemat 2. Synteza pochodnych **5 - 9** i Me₂-L-PEI wykorzystanych w badaniach nad stabilnością czwartorzędowych soli amoniowych.

Stabilności otrzymanych związków w środowisku zasadowym zbadalem poprzez reakcje z wodorotlenkiem litu w 25 °C. Aby zidentyfikować produkty rozpadu przeprowadziłem

reakcje z dużym nadmiarem LiOH, aż do pełnej konwersji soli amoniowych. Na podstawie analizy widm ^1H NMR surowych mieszanin poreakcyjnych (zamieszczonych w Załączniku 1 jako Rysunki Z1.1-Z1.5) wywnioskowałem, że badane sole amoniowe ulegają rozpadowi zgodnie z Rysunkiem 29 bez reakcji ubocznych (z dokładnością detekcji spektroskopii ^1H NMR). Aby potwierdzić proponowane przeze mnie ścieżki rozpadu z mieszaniny poreakcyjnej soli **5** wyizolowałem produkt **10**, z rozpadu soli **7** produkt **12**, a z rozpadu soli **9** udało mi się wyizolować oba produkty **13** i **14**. Porównanie widm ^1H NMR mieszanin reakcyjnych z otrzymanymi wzorcami jednoznacznie potwierdziło, że badane sole amoniowe w testowanych warunkach ulegają tylko reakcji eliminacji Hofmanna.

Przed przystąpieniem do dokładnych badań kinetycznych sprawdziłem czy aminy trzeciorzędowe **12** i **14** reagują z odpowiednio **7** i **9** prowadząc do ich rozpadu (Rysunek 29). W tym celu sole **7** i **9** potraktowałem wodorotlenku litu w niedomiarze (0,12 ekwiwalentu). Stopień konwersji tych reakcji utrzymywał się na poziomie ok. 12% nawet po 5 dniach inkubacji w 25 °C, co świadczy o zbyt niskiej zasadowości amin **12** i **14**, aby mogły reagować z badanymi związkami.

Aby zbadać kinetykę rozpadu soli **5**, **6**, i **8** przeprowadziłem reakcje z zastosowaniem deuterowanego wodorotlenku litu w D_2O , co umożliwiło mi bezpośrednie śledzenie przebiegu tych procesów przy pomocy spektroskopii ^1H NMR. Ze względu na dużą szybkość rozpadu **7** i **9** konieczne było zatrzymanie reakcji poprzez dodatek nadmiaru kwasu solnego przed rejestracją widma ^1H NMR. Badania nad rozpadem **6**, **7** i **9** przeprowadziłem stosując 1,2 ekwiwalentu wodorotlenku litu, natomiast w przypadku **5** i **8** zastosowałem 12 ekwiwalentów ze względu na bardzo niską szybkość ich rozpadu. Znając przebieg badanych reakcji, a także przesunięcia chemiczne substratów oraz produktów, wyznaczyłem zależność stopnia konwersji badanych soli w czasie (Rysunek 29). Obserwowane zmiany na widmach ^1H NMR w trakcie przebiegu reakcji zobrazowałem w Załączniku 1 jako Rysunek Z1.6-Z1.11.



Rysunek 29. Góra: zidentyfikowane produkty rozpadu badanych soli amoniowych w środowisku zasadowym w temperaturze 25 °C. Na czerwono zaznaczono atomy wodoru na które następuje atak anionu hydroksylowego w myśl reakcji eliminacji Hofmanna; dół: konwersja soli amoniowych (50 mM) do produktów reakcji eliminacji pod wpływem wodorotlenku litu (60 mM dla reakcji z **6**, **7** i **9**; 600 mM dla reakcji z **5** i **8**) w wodzie w temperaturze 25 °C obliczona na podstawie spektroskopii ^1H NMR.

Następnie, sprawdziłem czy otrzymane dane pasują do modelu reakcji kinetyki drugiego rzędu:

$$\ln \frac{[SA]}{[OH^-]} = ([SA_0] - [OH_0^-])k_s t + \ln \frac{[SA_0]}{[OH_0^-]} \quad (2)$$

gdzie:

[SA] - stężenie soli amoniowej obliczone na podstawie stopnia konwersji,

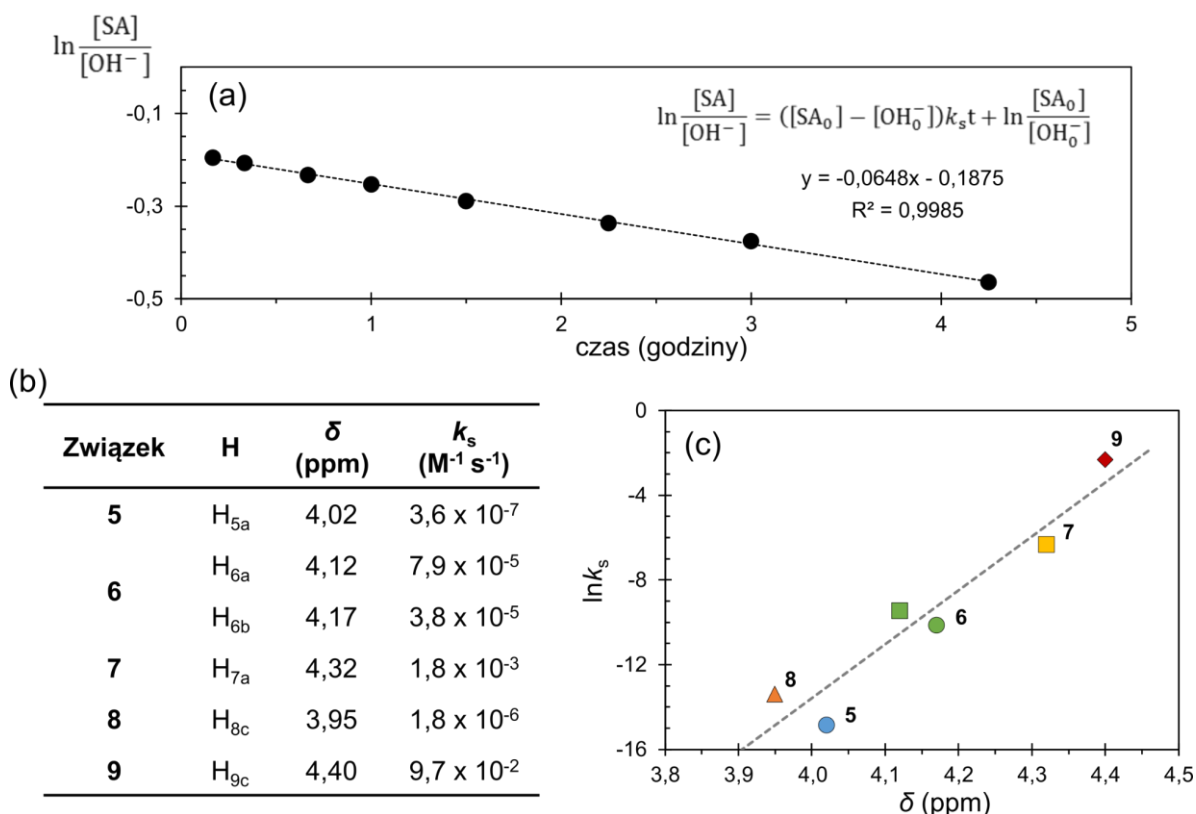
[OH⁻] - stężenie jonów hydroksylowych obliczone na podstawie stopnia konwersji SA,

[SA₀] - stężenie początkowe soli amoniowej,

[OH₀⁻] - początkowe stężenie wodorotlenku litu,

k_s - stała szybkości reakcji drugiego rzędu,

otrzymując bardzo dobre dopasowanie, co zaprezentowałem na przykładzie pochodnej **7** na Rysunku 30a (dopasowanie danych dla pozostałych pochodnych przedstawiłem w Załączniku 1 jako Rysunek Z1.12-Z1.16). Zestawienie oszacowanych w ten sposób stałych szybkości reakcji drugiego rzędu (k_s) z przesunięciami chemicznymi atomów wodoru ulegających eliminacji przedstawiłem na Rysunku 30b i c. Eliminacja potrójnej soli **6** przebiegała dwoma odrębnymi ścieżkami - poprzez eliminację atomu wodoru H-6a, prowadzącą do produktów **10** i **12**, oraz eliminację H-6b, prowadzącą do trimetyloaminy (TMA) i **11**. Stosunek zawartości produktów reakcji eliminacji H-6a do H-6b w czasie trwania całej reakcji wynosił 2,10 ± 0,18, z czego wynika, że stosunek stałych szybkości tych dwóch reakcji wynosi ok 2,10 (liczby atomów H-6a i H-6b są jednakowe). Pozwoliło mi to na obliczenie poszczególnych stałych szybkości na podstawie sumarycznej stałej szybkości eliminacji soli **6**.



Rysunek 30. (a) Dopasowanie danych zaprezentowanych na Rysunku 29 do równania kinetyki drugiego rzędu (2) na przykładzie reakcji soli amoniowej **7**; (b) tabela zestawiająca oszacowane k_s z przesunięciami chemicznymi (δ) atomów wodoru ulegającymi eliminacji (H); (c) zależność logarytmu naturalnego k_s od δ , kształty reprezentują różne grupy odchodzące: $\square$ - **12**, $\circ$ - TMA, $\diamond$ - **14**, Δ - DABCO.

Szybkość reakcji eliminacji E2 zależy od rodzaju nukleofila, rozpuszczalnika, grupy odchodzącej, a także aktywacji oraz zawady sterycznej atomu wodoru ulegającego eliminacji.^{226,227} W dalszej części mojej rozprawy przedyskutowałem w jaki sposób zmiany w grupie odchodzącej oraz poziomie aktywacji atomów wodoru wraz z dodawaniem kolejnych Me₂-L-PEI_{ru} (**5**, **6**, **7**), a także usztywnieniem tych struktur (**8**, **9**), wpływają na szybkość eliminacji Hofmanna.

Przesunięcia chemiczne atomów wodorów ulegających eliminacji dobrze korelują ze stałymi szybkości odpowiednich reakcji eliminacji (Rysunek 30c) – im wyższe przesunięcie chemiczne tym wyższa stała szybkości. Łącząc ten wynik z faktem, że atom wodoru o wyższym przesunięciu chemicznym δ jest słabiej ekranowany, a co za tym idzie wiązanie C-H jest silniej spolaryzowane,²²⁸ postanowiłem wykorzystać przesunięcie chemiczne do jakościowego określenia aktywacji atomów wodoru w tym układzie. Należy zauważyć, że otoczenie

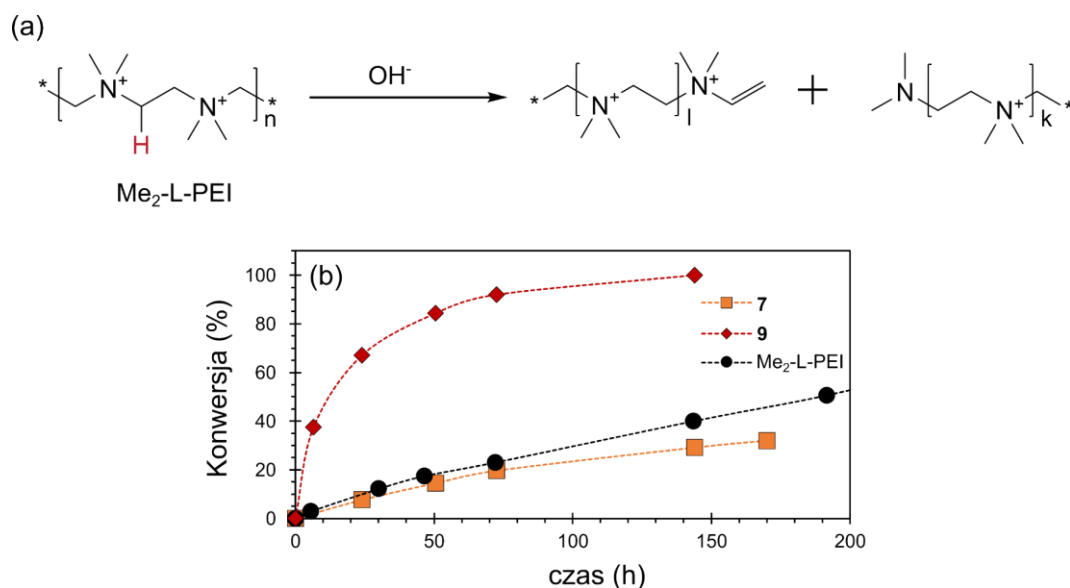
chemiczne wszystkich rozważanych atomów wodoru jest bardzo podobne (grupy etylenowe pomiędzy czwartorzędowymi solami amoniowymi), co minimalizuje wpływ innych efektów na przesunięcie chemiczne.

Najwolniej przebiegała eliminacja podwójnych soli amoniowych **5** i **8** (Rysunek 30b). Około pięciokrotnie wyższa $k_{s,8}$ w porównaniu z $k_{s,5}$ świadczy o lepszych właściwościach DABCO, jako grupy odchodzącej, niż TMA. Natomiast sumaryczna stała szybkości eliminacji soli **6**, uwzględniająca dwukrotnie większą liczbę aktywnych atomów wodoru przypadających na jedną cząsteczkę, jest ok. 160-krotnie większa od stałej szybkości eliminacji **5**. Dodatkowa grupa Me₂-L-PEI_{ru} znacząco zwiększyła podatność soli amoniowej wobec reakcji eliminacji (**5** vs **6**). Pomimo tego, iż TMA jest grupą opuszczającą zarówno w reakcji rozpadu **5** jak i **6**, przebiegającej poprzez eliminację H-6b (Rysunek 29), stała szybkości $k_{s,6b}$ jest ok. 100-krotnie wyższa od $k_{s,5}$. Obserwację tę można wyjaśnić poprzez silniejszą aktywację H-6b w porównaniu z H-5a, co odpowiada wyższemu przesunięciu chemicznemu pierwszego atomu wodoru ($\delta_{H-6b} = 4,17$ ppm) względem drugiego ($\delta_{H-5a} = 4,02$ ppm). Druga ścieżka rozpadu **6**, poprzez eliminację H-6a, jest dwukrotnie szybsza od ścieżki dyskutowanej powyżej, pomimo niższego δ_{H-6a} od δ_{H-6b} . Przyczyną tego zjawiska może być lepsza właściwość **12**, jako grupy odchodzącej, niż TMA. Monokation TMEDA **12** charakteryzuje się pK_a równym 5,7, podczas gdy TMA 9,8,²¹⁷ co przekłada się na jego niższą nukleofilowość.

Idąc dalej, poczwórna czwartorzędowa sól amoniowa **7**, posiadająca dodatkową grupę Me₂-L-PEI_{ru} w porównaniu z **6**, wykazała jeszcze niższą stabilność w środowisku zasadowym - stała $k_{s,7}$ jest ok. 20-krotnie wyższa od $k_{s,6a}$. Ze względu na takie same grupy odchodzące **12** obserwowana różnica w szybkościach wynika z jeszcze silniejszej aktywacji H-7c ($\delta_{H-7c} = 4,32$ ppm) w porównaniu do H-6a ($\delta_{H-6a} = 4,12$ ppm). W przypadku soli **9** o usztywnionej strukturze stała szybkości $k_{s,9}$ jest ok. 50-krotnie wyższa od stałej $k_{s,7}$ dla jej elastycznego odpowiednika **7**. Można to wytłumaczyć poprzez zarówno lepszą grupę odchodzącą **14** w porównaniu do **12**, a także mocniejszą aktywację H-9c ($\delta_{H-9c} = 4,40$ ppm) w porównaniu do H-7c ($\delta_{H-7c} = 4,32$ ppm). Oba te efekty związane są z usztywnioną strukturą DABCO w takiej konformacji, w której oba atomy azotu ułożone są względem siebie blisko w przestrzeni. Ułożenie to sprawia, że czwartorzędowa grupa amoniowa monokationu DABCO **14** mocniej obniża dostępność wolnej pary elektronowej na wolnej grupie aminowej, niż ma to miejsce w monokationie TMEDA **12**, obniżając tym samym jej zasadowość i nukleofilowość.²¹⁷ Z drugiej strony widoczny jest addytywny efekt dwóch czwartorzędowych grup amoniowych - jedna z grup soli **9** silnie oddziałuje na drugą w obrębie jednej jednostki DABCO prowadząc do mocniejszej

polaryzacji wiązania C-H w łańcuchu etylenowym. Objawia się to wyższym przesunięciem chemicznym H-9c (4,40 ppm) od H-7c (4,32 ppm). Sól **9** wykazuje 10^4 razy wyższą stałą szybkości reakcji od jej nie-metylowanego analogu **8**, co również związane jest z opisanymi powyżej efektami.

Przedstawione powyżej wyniki wskazują na addytywny efekt kolejnych grup Me₂-L-PEI_{ru} na polaryzację wiązania C-H w obrębie grupy etylenowej, a także w pewnym stopniu na nukleofiliwość grupy odchodzącej, co powiązałem ze zwiększoną podatność czwartorzędowych soli amoniowych na eliminację Hofmana. Porównanie szybkości rozpadu Me₂-L-PEI z poczwórną solą **7** pozwoliły mi określić, czy efekty te wzrastają dalej powyżej czterech Me₂-L-PEI_{ru}. Badania porównawcze Me₂-L-PEI z **7** i **9** przeprowadziłem w roztworze Na₂CO₃ w D₂O z dodatkiem 0,4 M NaCl. Łagodniejsze środowisko umożliwiło mi monitorowanie przebiegu reakcji bezpośrednio przy pomocy spektroskopii ¹H NMR, natomiast dodatek NaCl miał na celu zwiększenie rozpuszczalności Me₂-L-PEI w wodzie. Na widmach ¹H NMR degradującej Me₂-L-PEI obecne były sygnały przy przesunięciach charakterystycznych dla wiązania podwójnego (5,8, 5,9 i 6,5 ppm) oraz dla grup metylowych przy trzeciorzędowej grupie aminowej (2,3 ppm). Wynik ten potwierdza, że polimer również rozpada się poprzez reakcję eliminacji (Rysunek 31a). Szybkość degradacji sztywnej soli **9** była znacznie większa od rozpadu **7** oraz Me₂-L-PEI - po 72 godzinach konwersja **9** przekroczyła 90%, podczas gdy dla pozostałych dwóch pochodnych była na poziomie ok. 20% (Rysunek 31b). W przypadku Me₂-L-PEI konwersja odnosi się do jednostek powtarzalnych polimeru. Początkowe przebiegi konwersji **7** i Me₂-L-PEI w czasie są do siebie zbliżone, aż do 72 godziny, po czym rozpad soli **7** delikatnie zwalnia. Przyczyny tego zjawiska można doszukiwać się w spadku stężenia anionów hydroksylowych wynikłego z tworzenia się buforu węglanowego. Roztwór 0,1 M Na₂CO₃ wykazuje pH ok. 11, lecz gdy konwersja soli amoniowych osiąga wartość 20% stężenie Na₂CO₃ spada do 0,09 M, a stężenie NaHCO₃ wzrasta do 0,01M, skutkując obniżeniem pH do ok. 9. Ten ok. 100-krotny spadek stężenie OH⁻ znacząco spowalnia dalszą degradację **7**, ale nie wpływa na Me₂-L-PEI. Na podstawie tego wyniku można wyciągnąć wniosek, że Me₂-L-PEI jest jeszcze mniej stabilne od jego niskocząsteczkowego analogu **7**.



Rysunek 31. (a) Główna ścieżka rozpadu Me₂-L-PEI w środowisku zasadowym; (b) konwersja soli **7** i **9** oraz jednostek powtarzalnych Me₂-L-PEI (50 mM) w wodnym roztworze Na₂CO₃ (100 mM) z dodatkiem NaCl (400 mM) w temperaturze 25 °C na podstawie analiz widm ¹H NMR.

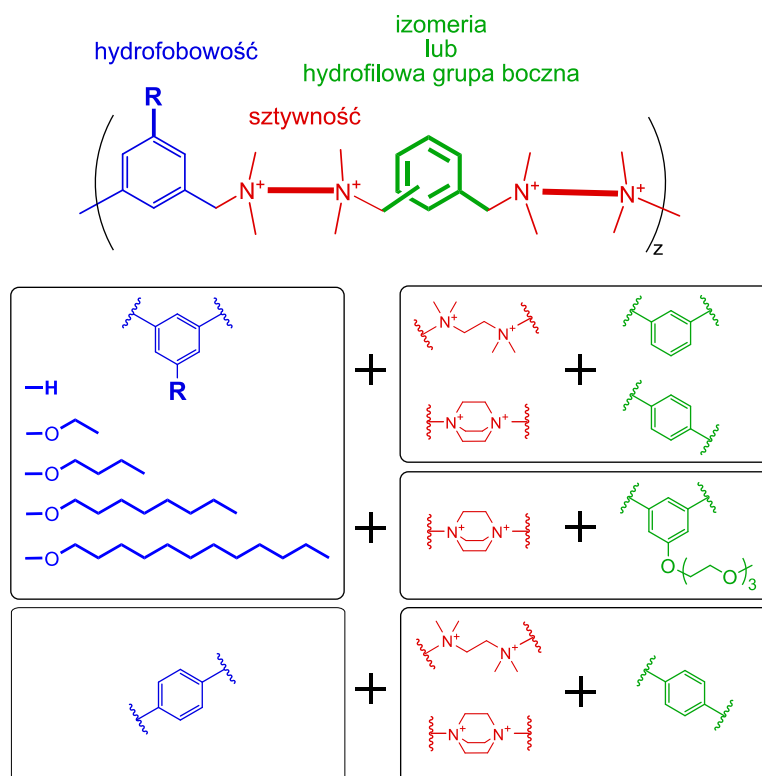
8.1.3. Podsumowanie podrozdziału 8.1.

Podsumowując fragment mojej rozprawy doktorskiej zawarty w punkcie 8.1., niepowodzenia w syntezie zaplanowanej biblioteki jonenów, będących pochodnymi Me₂-L-PEI (Rysunek 28), stały się motywacją do przeprowadzenia badań nad stabilnością czwartorzędowych soli amoniowych będących niskocząsteczkowymi analogami Me₂-L-PEI. Przedstawione przeze mnie wyniki pokazują, że zwiększenie liczby Me₂-L-PEI_{ru} w cząsteczce, z jednej do trzech (**5**, **6**, **7**), znacząco zwiększa szybkość jej eliminacji Hofmanna (stała szybkości reakcji zmienia się z $2,55 \times 10^{-7}$ do $1,80 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Usztywnienie analogu **7** zawierającego trzy Me₂-L-PEI_{ru}, poprzez wprowadzenie grupy DABCO (**9**), jeszcze bardziej przyspieszyło tę reakcję (z $1,80 \times 10^{-3}$ do $9,7 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Dobra korelacja pomiędzy stałymi szybkości, a przesunięciami chemicznymi atomów wodoru będących celem ataku OH⁻ (Rysunek 30b i c), doprowadziła mnie do wniosku, że obserwowany wzrost reaktywności spowodowany jest głównie przez zwiększoną polaryzację wiązania C-H w łańcuchu głównym. Drugim ważnym czynnikiem wpływającym na szybkość rozpadu jest zmiana nukleofilowości grup odchodzących. Ważną konsekwencją diskutowanych zależności jest również niestabilność wyczerpująco alkilowanej L-PEI już w delikatnie zasadowym środowisku, co wykazałem na przykładzie Me₂-L-PEI. Udokumentowany przeze mnie addytywny wpływ kolejnych grup Me₂-L-PEI_{ru} oraz usztywnienia cząsteczki na polaryzację jej wiązań C-H w

łańcuchu etylenowym i szybkość eliminacji Hofmanna, a także rozpad alkiłowanej L-PEI w łagodnych warunkach zasadowych, są elementami nowości naukowej i nie były wcześniej opisane. Zaprezentowane wyniki, poza poszerzeniem ogólnej wiedzy na temat reaktywności czwartorzędowych soli amoniowych, mają także praktyczne znaczenie. Zarówno sama L-PEI, jak i jej pochodne, są szeroko badane pod kątem zastosowania jako wektory do transfekcji genów^{229–231} lub czynniki przeciwdrobnoustrojowe,^{191,205,208,232,233} a niektóre z tych pochodnych są wyczerpująco alkiłowaną PEI.^{232–237} W świetle moich wyników, pochodne takie ulegają stopniowej degradacji w delikatnie zasadowym środowisku wodnym.

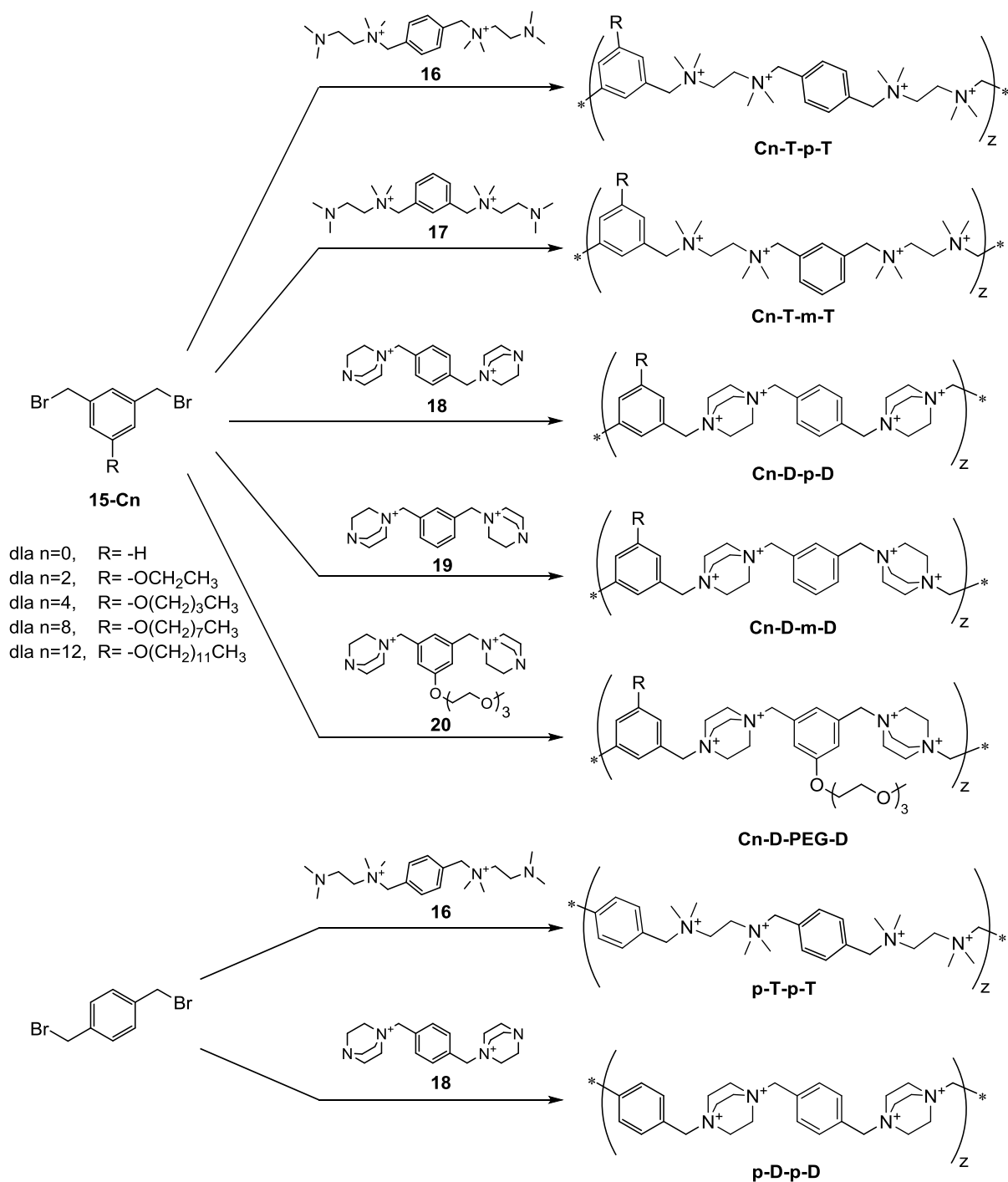
8.2. Plan biblioteki polikationów zawierającej pierścień aromatyczny oraz koncepcja syntezy

Mając na uwadze wnioski płynące z badań omówionych w poprzednim podrozdziale, zaprojektowałem nową bibliotekę jonenów o mniejszej gęstości ładunku dodatniego wzdłuż łańcucha głównego (Schemat 3). Planowane struktury składały się z rozdzielonych grupami aryłowymi pochodnych TMEDA lub DABCO, co pozwoliło na zbadanie wpływu sztywności łańcucha głównego. Obecność grup arylowych pozwoliła rozszerzyć plany badawcze o sprawdzenie wpływu izomerii łańcucha głównego, w znaczeniu izomerii strukturalnej pierścienia benzenowego. Usytuowanie podstawników benzylo-amoniowych względem siebie w pozycjach *para* lub *meta* wydało się mieć, zaraz obok sztywności łańcucha głównego, potencjalnie znaczący wpływ na możliwe konformacje jonenów oraz wynikającą z tego skuteczność oddziaływania z dwuwarstwą fosfolipidową. Planowana biblioteka obejmowała szereg struktur zawierających tylko izomery *meta* oraz naprzemiennie izomery *meta* i *para*, a także dwie struktury zawierające tylko izomery *para*. Hydrofobowość miała być modulowana poprzez długości łańcucha alkoksylowego połączonego z grupą aryłową - najbardziej hydrofilowe polikationy nie zawierały tego ugrupowania, podczas gdy najbardziej hydrofobowe zawierały grupę dodecyloksylową. Dodatek nienadładowanej grupy hydrofilowej zbadalem przy pomocy serii polikationów posiadającej metylowy eter trój(tlenku etylenu) (oPEG, oligomer PEG'u), będący krótkim fragmentem PEG oraz łącznik kationowy w postaci DABCO.



Schemat 3. Prezentacja koncepcji struktur polikationów wykorzystanych do zbadania wpływu wybranych parametrów strukturalnych na właściwości biologiczne.

Powyższa koncepcja prowadzi do biblioteki polikationów składającej się z pięciu serii związków (Schemat 4). W obrębie każdej serii różnią się one między sobą tylko hydrofobowością, natomiast poszczególne serie różnią się między sobą sztywnością, izomerią oraz obecnością dodatkowej grupy hydrofilowej. Biblioteka ta jest wzbogacona o dwa polimery bez hydrofobowych grup bocznych zawierające tylko izomery *para*. W celu ułatwienia dalszej dyskusji przypisałem jonom skrócone nazwy pochodzące od ich najważniejszych parametrów strukturalnych, które to nazwy odpowiadają jednostce powtarzalnej. Człon „Cn” informuje o długości łańcucha alkilowego, „T” oraz „D” odpowiadają łącznikom kationowym i pochodzą odpowiednio od TMEDA i DABCO, natomiast „p” oraz „m” odpowiadają podstawnikowi aryłowemu o izomerii odpowiednio *para* oraz *meta*. Skrót „PEG” w nazwach jonenów odpowiada grupie aryłowej o izomerii *meta* zawierającej metylowy eter trój(tlenku etylenu) (oPEG). Należy zauważyć, że „C0” w nazwach polimerów mogłoby zostać zastąpione przez „m”, jednakże dla ułatwienia dalszej dyskusji nad wpływem hydrofobowości na wybrane właściwości jonenów nie zostało to uczynione.



Schemat 4. Plan syntezy biblioteki jonenów. Aniony bromkowe pomięto dla poprawienia czytelności schematu.

Przedstawioną bibliotekę jonenów otrzymałem w reakcji poliaddycji 1,3-bis(bromometylo)benzenu (**15-C0**) i różnych 1,3-bis(bromometylo)-5-alkoksybenzenów (**15-Cn**, $n = 2, 4, 8, 12$) z trzeciorzędowymi di-aminami **16**, **17**, **18**, **19** i **20**, będącymi pochodnymi 1,4- oraz 1,3- bis(bromometylo)benzenu (Schemat 4). Średnią liczbę merów przypadającą na

cząsteczkę polimeru, wyrażoną jako DP, oraz rodzaj grup końcowych planowałem kontrolować poprzez zastosowanie monomerów aminowych w niewielkim nadmiarze. Zależność DP polimerów otrzymanych w procesie polimeryzacji stopniowej, do której zalicza się również przedstawiona na Schemacie 4 poliaddycja, od stosunku molowego monomerów oraz stopnia ich konwersji opisuje równanie Carother'a (3):²³⁸

$$DP = \frac{1+r}{1+r-2rp} \quad (3)$$

$$\text{dla } p \rightarrow 1, DP = \frac{1+r}{1-r} \quad (4)$$

gdzie:

r - stosunek molowy monomeru w niedomiarze do monomeru w nadmiarze,

p - konwersja monomerów.

W przypadku całkowitej konwersji monomerów ($p = 1$), równanie uprasza się do postaci (4), z której wynika, że w celu otrzymania polimeru o $DP = 10$ należy zastosować stosunek molowy monomerów wynoszący 1,20:1.00.

Realizacja postawionego celu syntetycznego wymagała otrzymania serii di-bromków **15-C_n** oraz serii di-amin **16**, **17**, **18**, **19** i **20**, a także wykonania badań nad samą reakcją poliaddycji.

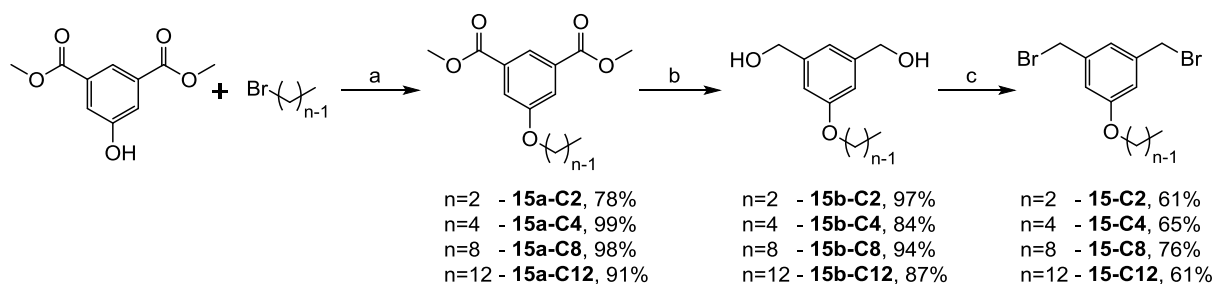
8.3. Synteza monomerów

8.3.1. Bromki 15-C_n

Di-bromek **15-C₀** (1,3-bis(bromometylo)benzen) jest komercyjnie dostępnym związkiem i nie wymagał syntezy. Natomiast pozostałe di-bromkowe monomery **15-C_n** ($n=2, 4, 8, 12$) otrzymałem według ścieżki syntezy przedstawionej na Schemacie 5. Pierwszym etapem była reakcja syntezy eterów Williamsona pomiędzy *n*-bromoalkanami i 5-hydroksy-izoftalanem dimetylu w MeCN z zastosowaniem węgla potasu jako zasady. Otrzymane w ten sposób diestry **15a-C_n** poddałem bezpośrednio redukcji przy pomocy glinowodoru litu (LAH) w tetrahydrofuranie (THF). Bromowanie przeprowadziłem z użyciem bromku fosforu (PBr₃) w chlorku metylenu (DCM), a ostateczne produkty oczyściłem poprzez krystalizację.

Synteza **15-C_n** (dla $n=2, 4, 8, 12$) nie wymagała zastosowania kolumny chromatograficznej na żadnym z etapów, a jej całkowita wydajność, w przeliczeniu na wyjściowy 5-hydroksy-izoftalan dimetylu, wynosiła od 46% do 70%. Strukturę oraz czystość

wszystkich półproduktów i produktów potwierdziłem przy pomocy spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR.

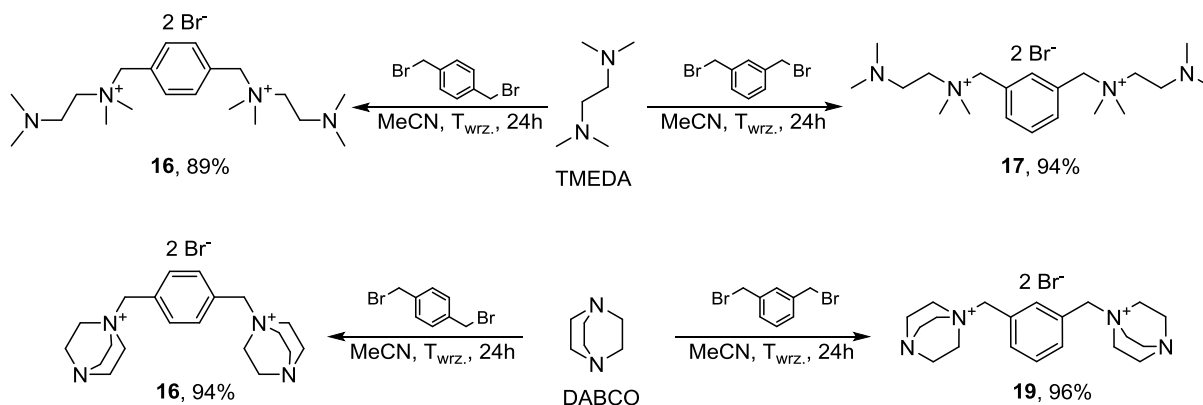


Schemat 5. Ścieżka syntezy monomerów **15-Cn**; (a) K_2CO_3 , MeCN, T_{wrz} , 24h; (b) LAH, THF, T_{pok} , 24h; (c) PBr_3 , DCM, T_{pok} , 24h.

8.3.2. Aminy 16 - 19

Di-aminowe monomery **16**, **17**, **18** i **19** otrzymałem w reakcjach 1,3-bis(bromometylo)benzenu i 1,4-bis(bromometylo)benzenu z DABCO oraz TMEDA (Schemat 6). W celu uniknięcia formowania się produktów ubocznych, w postaci oligomerów, zastosowałem jako rozpuszczalnik MeCN, będący słabym rozpuszczalnikiem dla wielu podwójnych czwartorzędowych soli amoniowych, oraz 6-krotny nadmiar molowy di-amin w stosunku do di-bromków. Pochodne **16**, **18** oraz **19** zgodnie z oczekiwaniami były bardzo słabo rozpuszczalne w MeCN, co umożliwiło ich łatwą izolację poprzez proste odfiltrowania oraz odmycie nadmiarowych amin. Di-amina **17** okazała się być natomiast dobrze rozpuszczalna w układzie reakcyjnym. W związku z czym mieszaninę poreakcyjną założyłem do postaci lepkiego ciała stałego usuwając pewną część nieprzereagowanej TMEDA. Brązowawa pozostałość po dodaniu niewielkiej ilości MeCN przekształciła się w białe, krystaliczne ciało stałe, które po odfiltrowaniu i kilkukrotnym przemyciu eterem dietylowym (Et_2O) okazało się być czystym produktem **17**.

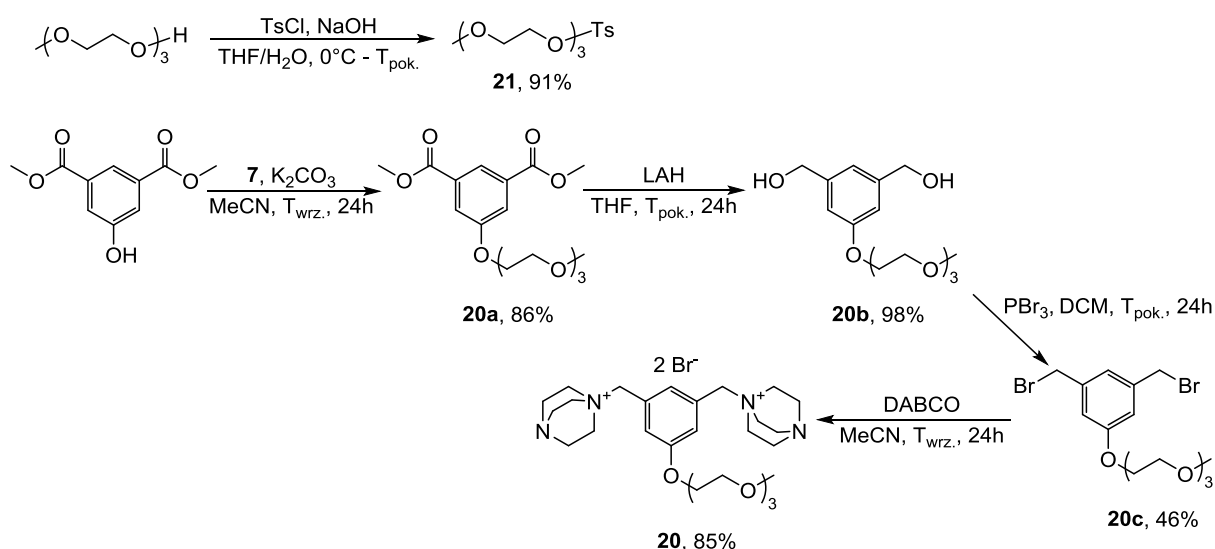
Analiza widm ^1H oraz ^{13}C NMR potwierdziła strukturę oraz wysoką czystość otrzymanych di-amin **16**, **17**, **18** i **19**, a wyniki analizy elementarnej potwierdziły ich skład pierwiastkowy.



Schemat 6. Ścieżka syntezy di-aminowych monomerów **16**, **17**, **18** i **19**.

8.2.3. Amina **20** z grupą PEG

W celu zsyntetyzowania di-aminowego monomeru **20** zawierającego krótki fragment PEG'u otrzymałem tosylian metylowego eteru trój(tlenku etylenu) **21** (Schemat 7), który wykorzystałem następnie w reakcji Williamsona z 5-hydroksy-izoftalanem dimetylu otrzymując pochodną **20a**. Ze względu na ciekłą postać surowego produktu reakcji otrzymanego po odparowaniu MeCN, niemożliwe było wyizolowanie czystego **20a** w sposób analogiczny do zastosowanego w reakcji syntezy **15a-Cn** (Schemat 5). Aby uniknąć czasochłonnego oczyszczania z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej reakcję tę przeprowadziłem używając nadmiaru 5-hydroksy-izoftalanu dimetylu względem **21**. Umożliwiło mi to usunięcie nieprzereagowanego fenolowego substratu poprzez proste przemywanie surowego produktu rozpuszczonego w octanie etylu przy pomocy wodnego roztworu wodorotlenku sodu. Następczą reakcją redukcji **20a** do diolu **20b** przeprowadziłem przy pomocy LAH'u. Produkt **20b**, ze względu na bardzo dobrą rozpuszczalność w wodzie uniemożliwiającą ekstrakcję w układzie woda-octan etylu, wyizolowałem poprzez macerację zatężonej do sucha mieszaniny poreakcyjnej octanem etylu. Bromowanie diolu **20b** przeprowadziłem używając PBr₃, a czysty produkt reakcji **20c** wydzieliłem przy pomocy chromatografii kolumnowej. Końcowy produkt **20** otrzymałem w reakcji **20c** z 6-krotnym nadmiarem DABCO, a procedura jego oczyszczania opierała się na kilkukrotnym rozpuszczaniu w MeCN i wytrąceniu w Et₂O. Całkowita wydajność syntezy pochodnej **20** wynosiła 33%, a jej strukturę oraz skład pierwiastkowy potwierdziłem przy pomocy spektroskopii ¹H i ¹³C NMR oraz analizy elementarnej.

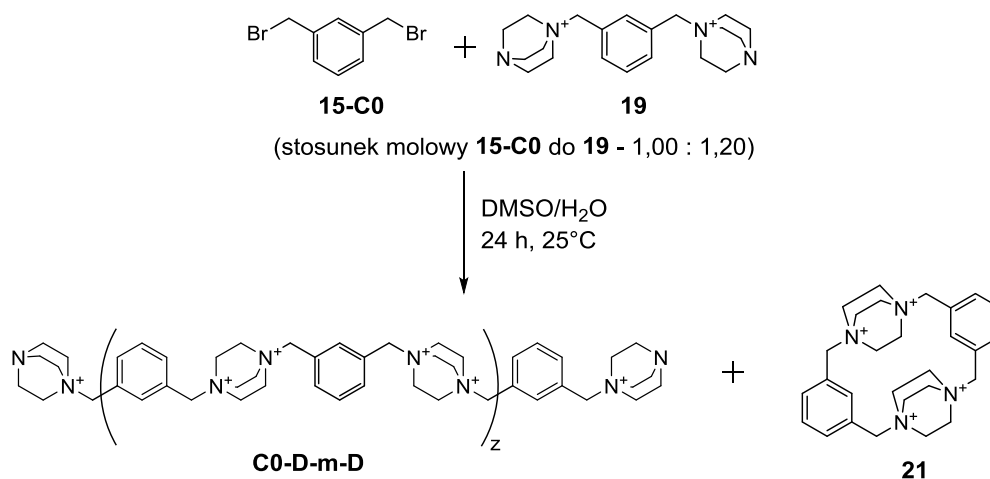


Schemat 7. Ścieżka syntezy di-aminowego monomeru **6** zawierającego fragment oPEG'u.

8.4. Synteza i charakterystyka polimerów

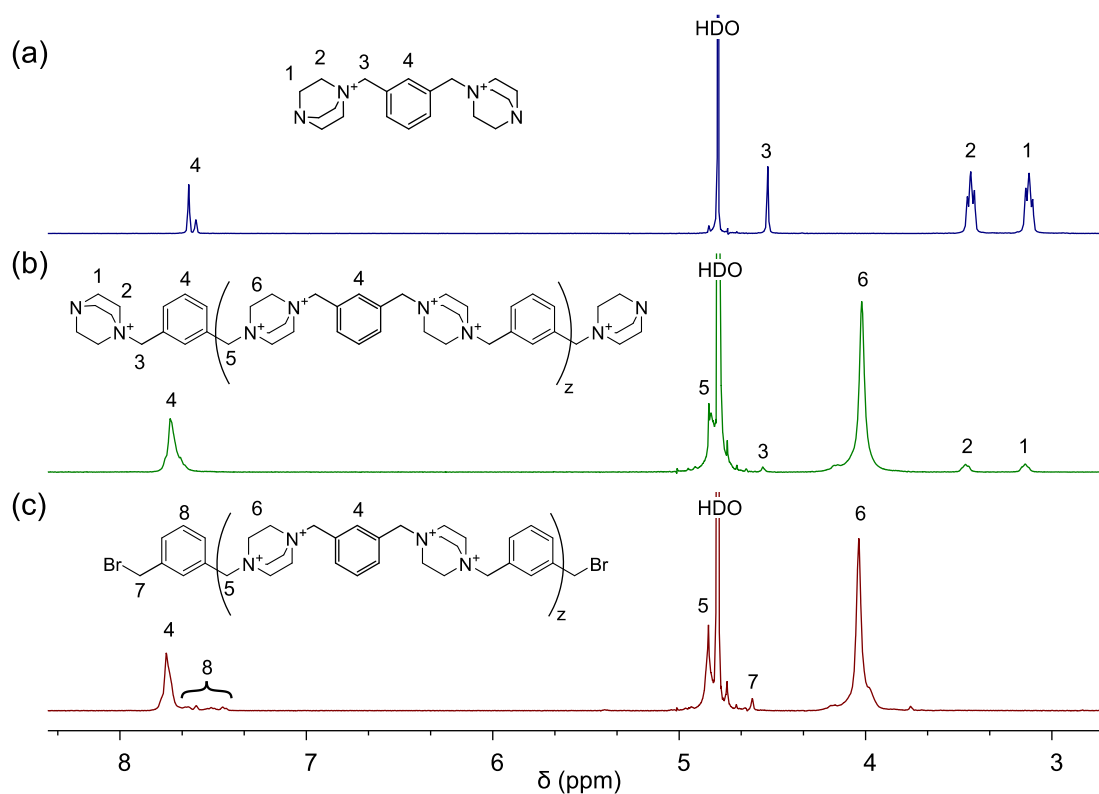
8.4.1. Badania nad reakcją poliaddycji - synteza głównej biblioteki jonenów

W celu dobrania odpowiednich warunków reakcji poliaddycji pomiędzy di-bromkami **15-Cn** i di-aminami **16 - 20**, które pozwoliłyby na jej kontrolę, przeprowadziłem badania nad modelową reakcją pomiędzy **15-C0** i **19** (Schemat 8).



Schemat 8. Modelowa reakcja, która posłużyła do wstępnych badań nad poliaddycją.

Z równania (4) wynika, że w celu otrzymania polimeru o 10 jednostkach powtarzalnych ($z = 10$, Schemat 8) należy zastosować 20% nadmiar molowy di-aminy **15-C0** oraz doprowadzić do całkowitej konwersji grup reaktywnych będących w niedomiarze. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność substratów **15-C0** i **19** oraz polimeru **C0-D-m-D** w wielu rozpuszczalnikach zastosowałem DMSO z niewielkim dodatkiem wody (3 - 6% v/v). Produkty izolowałem poprzez wytrącenie w nadmiarze acetonu. Reakcje poliaddycji arbitralnie prowadziłem w temperaturze 25 °C przez 24 h. Aby zweryfikować czy jest to czas wystarczający do osiągnięcia pełnej konwersji monomerów, przeprowadziłem dwie równoległe reakcje pomiędzy **15-C0** i **19** stosując w jednej 20% nadmiar molowy di-aminy **19**, natomiast w drugiej analogiczny nadmiar di-bromku **19-C0**. Zestawienie widm ^1H NMR surowych produktów tych reakcji wraz w widmem monomeru **19** przestawiłem na Rysunku 32.



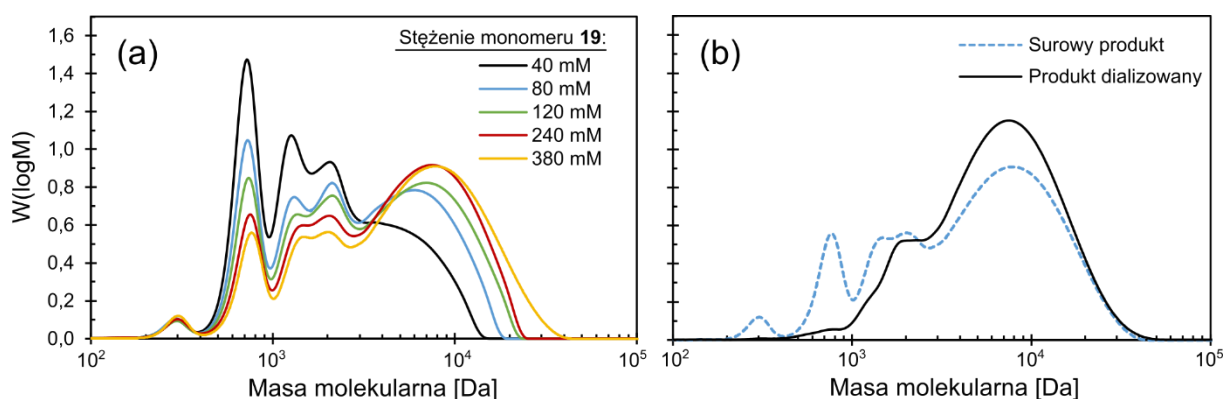
Rysunek 32. Zestawienie widm ^1H NMR (400 MHz, D_2O) (a) di-aminy **19** oraz surowego produktu modelowej poliaddycji prowadzonej z nadmiarem (b) di-aminy **19** lub (c) di-bromku **15-C0**.

Pojawienie się sygnału przy 4,05 ppm świadczy o obecności podwójnie alkilowanej podjednostki DABCO (H-6), potwierdzając powstanie docelowego produktu **C0-D-m-D** (Rysunek 32b i c). Pik przy 4,80 ppm został przypisany grupie benzyłowej (H-5) połączonej z

podwójnie alkilowanym DABCO. Widmo ^1H NMR produktu reakcji prowadzonej w nadmiarze **19** (Rysunek 32b) zawiera sygnały o przesunięciach 3,40 i 3,12 ppm, odpowiadające H-1 i H-2 z monokationu DABCO, obecne również w monomerze **19** (Rysunek 32a). Widmo tego produktu (Rysunku 32b) nie zawiera natomiast sygnałów pomiędzy 7,6 - 7,4 ppm, które są charakterystyczne dla polimeru otrzymanego w reakcji prowadzonej z nadmiarem di-bromku **15-C0** (Rysunek 32c). Piki te odpowiadają H-8 z arylowych grup końcowych. Ponadto, widmo polimeru zakończonego grupami aryłowymi nie zawiera sygnałów przy 3,40 i 3,12 ppm (H-2 i H-1). Obserwacje te są dowodem, iż zastosowanie nadmiaru jednego z monomerów w modelowej reakcji prowadzi do otrzymania polikationu zawierającego grupy końcowe tylko jednego typu.

Analiza dystrybucji masy molekularnej otrzymanych polikationów została wykonana przy pomocy chromatografii wykluczenia (SEC, ang. *size-exclusion chromatography*). Do analizy zastosowano układ rozpuszczalników $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ w stosunku objętościowym 54/23/23 z dodatkiem 0.5 M AcONa, ponieważ grupa badawcza T. E. Long'a wykazała, przy użyciu techniki DLS, że amfifilowe jony nie tworzą agregatów w tych warunkach.²³⁹ Eluent ten był wykorzystany także w pracach innych badaczy do analizy amfifilowych polikationów.^{40,240–243}

Surowy produkt modelowej reakcji przeprowadzonej z zastosowaniem monomeru **19** w stężeniu 40 mM zawierał frakcję o stosunkowo niskiej liczbowo średniej masie molekularnej (M_n) wynoszącej ok. 700 Da, mniejszą frakcję o M_n ok. 1300 Da oraz niewielką frakcję o masie kilku tysięcy Da (Rysunek 33a). Możliwym produktem ubocznym badanej reakcji jest makrocykliczny związek **21** (Schemat 8). Jego masa molowa z uwzględnieniem przeciw jonów bromkowych wynosi 752 g/mol, natomiast bez przeciw jonów 432 g/mol. Mając na uwadze fakt, że eluent zawiera anion octanowy w stężeniu 0,5 M, który prawdopodobnie wypiera Br^- z badanych struktur podczas migracji przez złożę, oraz odniesienie się do wzorca w postaci zasadowej (bez przeciw jonów), masa produktu **21** zadowalająco koreluje z sygnałem odpowiadającym 700 Da.



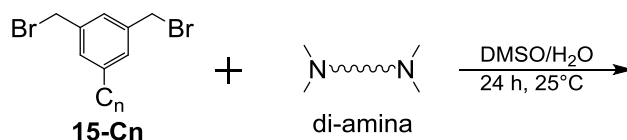
Rysunek 33. (a) dystrybucja masy molekularnej surowych produktów modelowej poliaddycji (Schemat 8) oraz (b) porównanie dystrybucji mas molekularnych surowego produktu otrzymanego dla stężenia monomeru **19** równego 380 mM przed i po dializie.

Niskie stężenie monomerów sprzyja reakcji cyklizacji kosztem poliaddycji, dlatego przeprowadziłem tę reakcję stosując wyższe stężenie. Wyniki SEC przedstawione na Rysunku 33a wskazują na spadek zawartości frakcji o niskiej masie molekularnej wraz ze wzrostem stężenia monomerów oraz wzrost zawartości produktu o masie kilku tysięcy Da. Ponadto położenie maksimum pików odpowiadających polimerowi przesuwają się w kierunku większych mas, co również jest konsekwencją zmniejszającego się udziału reakcji cyklizacji na rzecz polimeryzacji. Stężenie reagentów równe 380 mM było najwyższym przetestowanym przeze mnie ze względu na próg rozpuszczalności substratów w 25 °C. Prowadząc reakcję modelową w wyższej temperaturze, umożliwiającej zwiększenie stężenia substratów, otrzymałem polimeryczny produkt zawierający dodatkowe aldehydowe grupy końcowe. Powstały one najprawdopodobniej w reakcji utleniania Kornblum’a, biegnącej poprzez addycję nukleofilową cząsteczki DMSO do bromku benzyłowego i następczą eliminację w obecności zasady.²⁴⁴

Polimer **C0-D-m-D** oczyściłem z niskocząsteczkowych produktów ubocznych poprzez dializę wobec wody stosując membranę dializacyjną o punkcie odcięcia (MWCO, ang. *molecular weight cut-off*) równym 1 kDa (Rysunek 33b). Tak otrzymany produkt charakteryzował się DP, obliczonym na podstawie widma ^1H NMR, równym 10,6 oraz dyspersyjnością (D_M), oznaczoną przy pomocy SEC, wynoszącą 1,73. Średnia liczbowa masa molekularna oznaczona poprzez SEC ($M_{n, \text{SEC}}$) wynosiła 4,8 kDa, podczas gdy analogiczna wielkość obliczona z widma ^1H NMR ($M_{n, \text{NMR}}$), bazując na DP, wynosiła 4,6 kDa (bez uwzględnienia masy przeciw jonów).

Znając warunki w których modelowa reakcja (Schemat 8) daje pożądaný produkt sprawdziłem, czy reakcje innych układów di-amina - di-bromek w tych samych warunkach pozwolą otrzymać jony zawierające ok. 10 jednostek powtarzalnych. Poliaddycja aminy **19** i bromku **15-C4** w stosunku molowym 1,20 : 1,00 prowadziła do produktu reakcji o DP równym 5,3, natomiast w stosunku molowego 1,10 : 1,00 produkt o DP równym 10,2 (Tabela 1, nr 1 i 2). Różnica w wymaganym stosunku molowym pomiędzy reakcjami aminy **19** z bromkami **15-C0** oraz **15-C4** może wynikać z różnych szybkości formowania się cyklicznych produktów ubocznych względem reakcji prowadzącej do polimerów. W związku z tym reakcję poliaddycji z bromkiem **15-C4** przetestowałem dla każdej diaminy w celu dobrania właściwego stosunku molowego monomerów. Reakcje testowe pomiędzy bromkiem **15-C4**, a aminami **19**, **18**, **17** i **16** wskazały na stosunek molowy 1,10 jako optymalny (Tabela 1, nr 3 - 7), natomiast w przypadku diaminy **20** było to 1,15 : 1,00 (Tabela 1, nr 8 - 10). Ze względu na znacznie niższą rozpuszczalność aminy **18** w układzie DMSO/H₂O reakcje z jej wykorzystaniem prowadziłem w stężeniu 110 mM, natomiast lepsza rozpuszczalność **20** pozwoliła na prowadzenie poliaddycji w stężeniu 530 mM.

Tabela 1. Charakterystyka produktów reakcji testowych pomiędzy 15-C4, a różnymi di-aminami. Struktury di-amin znajdują się na Schemacie 4.



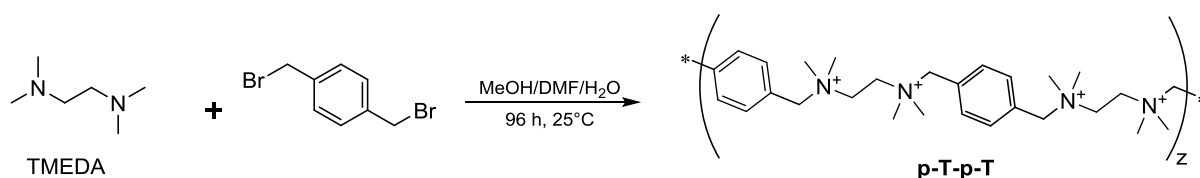
Nr	r ^a	DP ^b	M _n , NMR ^c (kDa)	M _n , SEC ^d (kDa)	di-amina	Produkt
1	1,20	5,3	2,7	2,8	19	C4-D-m-D
2	1,10	10,2	5,2	5,3		
3	1,20	5,9	3,0	2,8	18	C4-D-p-D
4	1,10	9,1	4,6	4,0		
5	1,20	7,4	3,8	4,8	17	C4-T-m-T
6	1,10	13,0	6,7	6,6		
7	1,10	9,5	4,9	5,8	16	C4-T-p-T
8	1,20	5,3	3,5	2,6	20	C4-D-PEG-D
9	1,15	10,8	7,2	7,6		
10	1,10	18,5	12,4	12,3		

^a stosunek molowy di-aminy do di-bromku; ^b stopień polimeryzacji obliczony z widma ¹H NMR; ^c masa molekularna policzona z DP oraz masy r.u. bez przeciw jonów; ^d masa molekularna oznaczona przy pomocy SEC

8.4.2. Badania nad reakcją poliaddycji - synteza jonenów p-T-p-T i p-D-p-D

Polikation **p-D-p-D** o DP równym 11 otrzymałem w sposób analogiczny do jonenów głównej biblioteki poprzez reakcję poliaddycji 1,4-bis(bromometylo)benzenu i 1,10 ekwiwalentu di-aminy **19** w DMSO. W reakcji tej nie zaobserwowałem produktów cyklicznych o niskiej masie molekularnej, co wiąże się prawdopodobnie z trudniejszą cyklizacją sztywnego układu zawierającego dwie grupy DABCO oraz dwie grupy *para*-ksylenu. Z tego względu polimer ten nie wymagał oczyszczenia poprzez dializę.

Reakcja pomiędzy 1,4-bis(bromometylo)benzenem, a di-aminą **17**, prowadząca do **p-T-p-T**, okazała się natomiast bardziej problematyczna ze względu na powstającą znaczną ilość aldehydowych grup końcowych nawet w temperaturze 25 °C. Grupy te są produktami wspomnianej w poprzednim podrozdziale reakcji utleniania Kornblum'a.²⁴⁴ Intrygujące jest, że tylko w jednym układzie reakcyjnym zaobserwowałem taki produkt uboczny, co może być związane z dwoma nakładającymi się efektami - większą podatnością 1,4-bis(bromometylo)benzenu na reakcję utleniania niż 1,3-bis(bromometylo)benzenu, jak i wyższą zasadowością monokationu TMEDA w porównaniu z monokationem DABCO.²¹⁷ W celu uniknięcia potencjalnego wpływu grupy aldehydowej na wyniki badań biologicznych, reakcję tę przeprowadziłem w układzie rozpuszczalników MeOH/DMF 1/1, stosowanym w reakcjach Menshutkin'a.²⁴⁵ Jednakże di-amina **17** okazała się być nierozpuszczalna zarówno w MeOH, jak i w DMF, a odpowiednio duży dodatek wody umożliwiający rozpuszczenie aminy **17** uniemożliwiał rozpuszczenie odpowiedniej ilości 1,4-bis(bromometylo)benzenu. W związku z tym polikation **p-T-p-T** otrzymałem w reakcji TMEDA z 1,4-bis(bromometylo)benzenem (Schemat 9) w MeOH/DMF 1/1 prowadzonej przez 96 godzin w 25 °C. W celu utrzymania homogeniczności mieszaniny reakcyjnej po 8 i 24 godzinach dodałem wodę, której końcowa zawartość wyniosła 65% v/v.



Schemat 9. Synteza jonenu o podstawnikach arylowych w izomerii para.

8.4.3. Synteza i charakterystyka jonenów wykorzystanych w dalszych badaniach

Znając warunki pozwalające otrzymać docelowe jony zrealizowałem cały plan syntezy przedstawiony na Schemacie 4. Otrzymane finalne związki charakteryzowały się DP w zakresie 7,3-13,0 oraz dyspersyjnością w granicach 1,40 - 1,99 (Tabela 2). W przypadku jonenów o łańcuchach bocznych C0, C2, C4 oraz C8 wartości $M_{n, SEC}$ były bardzo zbliżone do $M_{n, NMR}$. Natomiast w przypadku jonenów z łańcuchem bocznym w postaci grupy dodecyłowej (C12; Tabela 2, nr 5, 10, 20 i 25) wartość $M_{n, SEC}$ była około dwukrotnie mniejsza od $M_{n, NMR}$. Różnica ta może wynikać z oddziaływania bardziej hydrofobowych jonenów z fazą stacjonarną zastosowanej kolumny, która była dedykowana dla cząsteczek hydrofilowych. Adsorpcja jonenów C12 mogła spowolnić ich migrację przez złożę zwiększając tym samym czas retencji interpretowany jako pozornie niższa masa molekularna. Wydajność przeprowadzonych poliaddycji była stosunkowo niska (20 - 68%), co wynika głównie ze znacznych strat podczas procesu oczyszczania z wykorzystaniem dializy.

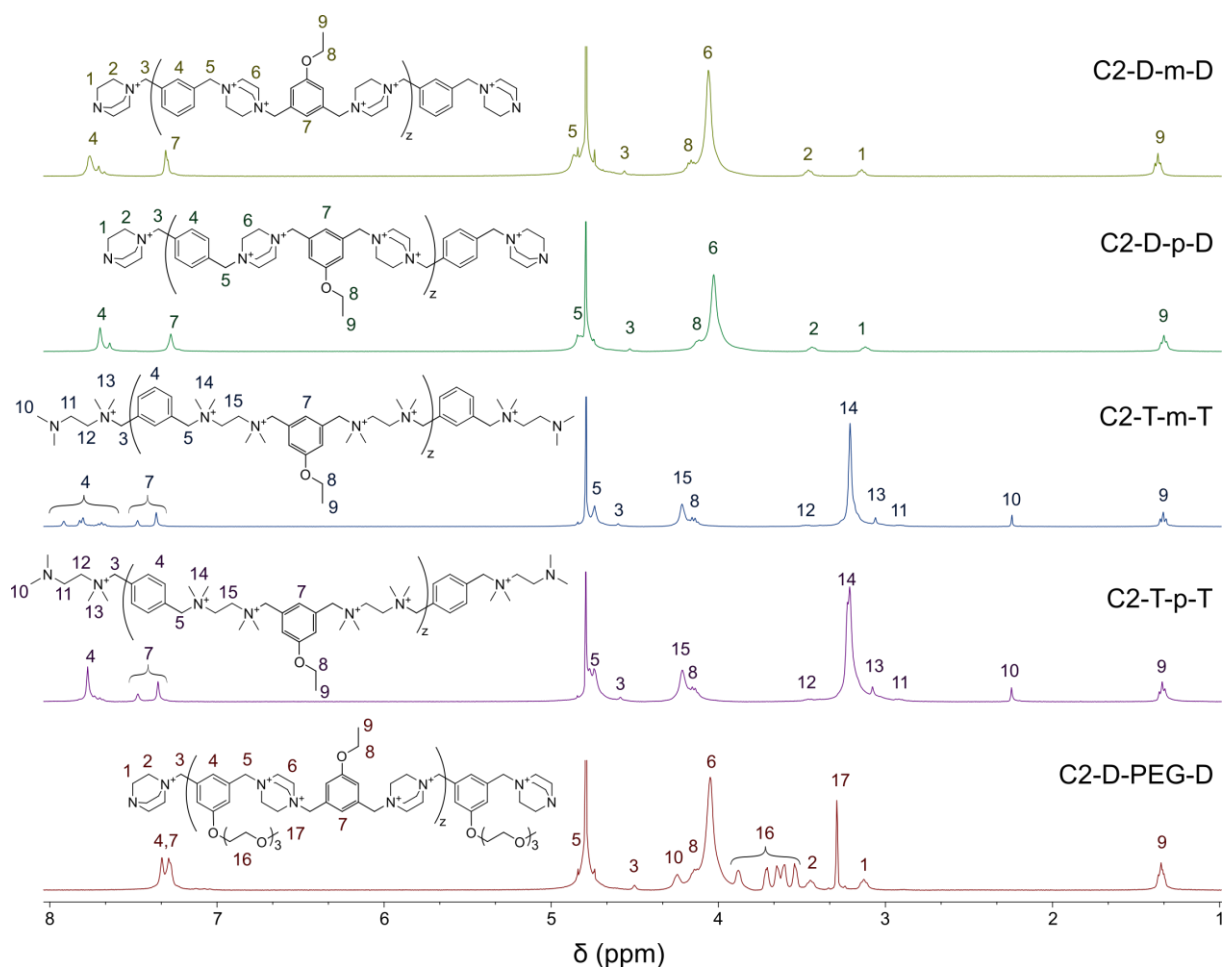
Tabela 2. Charakterystyka biblioteki polimerów użytych do dalszych badań. Struktury polimerów przedstawiono na Schemacie 4 na stronie.

Nr	Polimer	DP ^a	M_n , NMR ^b (kDa)	M_n , SEC ^c (kDa)	M_w (kDa)	$\bar{D}_M$ ^d	Wyd. ^e (%)
1	C0-D-m-D	10,6	4,6	4,8	8,3	1,73	46
2	C2-D-m-D	11,8	5,6	4,6	8,1	1,77	47
3	C4-D-m-D	10,4	5,2	5,3	8,6	1,63	48
4	C8-D-m-D	9,0	5,0	4,5	7,8	1,73	66
5	C12-D-m-D	11,9	7,3	2,3	3,3	1,43	57
6	C0-D-p-D	10,1	4,4	4,4	8,1	1,85	53
7	C2-D-p-D	11,6	5,5	5,2	9,3	1,79	49
8	C4-D-p-D	9,1	4,6	4,0	6,7	1,67	20
9	C8-D-p-D	11,0	6,2	4,1	7,4	1,80	60
10	C12-D-p-D	9,2	5,7	2,3	3,2	1,38	53
11	C0-T-m-T	7,3	3,2	4,0	5,9	1,48	14
12	C2-T-m-T	12,8	6,2	6,9	12,4	1,80	28
13	C4-T-m-T	13,0	6,7	6,7	12,2	1,82	29
14	C8-T-m-T	12,4	7,1	5,5	10,0	1,82	28
15	C12-T-m-T	12,7	7,9	4,9	6,6	1,34	30
16	C0-T-p-T	12,2	5,4	7,3	13,0	1,78	20
17	C2-T-p-T	12,4	6,0	7,5	13,4	1,79	33
18	C4-T-p-T	10,9	5,6	6,7	12,3	1,84	34
19	C8-T-p-T	13,8	7,9	6,5	11,8	1,82	50
20	C12-T-p-T	10,6	6,6	3,3	4,8	1,46	68
21	C0-D-PEG-D	8,6	5,1	4,8	8,4	1,76	40
22	C2-D-PEG-D	8,4	5,4	5,2	8,7	1,68	56
23	C4-D-PEG-D	9,8	6,5	6,9	13,7	1,99	42
24	C8-D-PEG-D	9,8	7,1	6,2	10,7	1,72	28
25	C12-D-PEG-D	7,3	5,7	2,5	3,5	1,40	30
26 ^f	p-D-p-D	13,2	5,7	4,9	10,3	2,11	53
27 ^g	p-T-p-T	10,8	4,8	8,2	30,3	3,70	20

^a stopień polimeryzacji obliczony z widma ¹H NMR; ^b średnia liczbowa masa molekularna policzona z DP oraz masy r.u. bez przeciw jonów; ^c średnia liczbowa masa molekularna wyznaczona przy pomocy SEC; ^d dyspersyjność oznaczona przy pomocy SEC; ^e wydajność reakcji po izolacji produktów; ^f produkt oczyszczono bez zastosowania dializy; ^g synteza w układzie MeOH/DMF/H₂O z wykorzystaniem TMEDA i 1,4-bis(bromometylo)benzenu.

Strukturę otrzymanych polimerów potwierdziłem przy pomocy spektroskopii ¹H NMR. Na Rysunku 34 przedstawiłem widma ¹H NMR wszystkich polikationów zawierających grupę boczną C2. Widma te w pełnym rozmiarze wraz z zaznaczonymi przesunięciami chemicznymi oraz całkami, jako reprezentatywne przykłady widm ¹H NMR otrzymanych jonenów, zamieściłem w Załączniku 2. Widma polikationów zawierających DABCO charakteryzują się sygnałami przy ok 3,14 i 3,45 ppm, pochodzącymi od H-1 i H-2 w podjednostce DABCO grupy

końcowej, a także charakterystyczny sygnał przy ok. 4,05 ppm pochodzący od grupy DABCO wewnątrz łańcucha polimeru (H-6). Natomiast widma polikationów zawierających pochodną TMEDA posiadają sygnały przy ok. 2,24 i 3,05 ppm, pochodzące od grup metylowych z grup końcowych (H-10 i H-13), oraz sygnały przy ok. 2,91 i 3,48 ppm pochodzące od grupy etylenowej w grupie końcowej (H-11 i H-12). Podjednostka TMEDA w łańcuchu głównym charakteryzuje się sygnałem przy 4,22 ppm, pochodzącym od grupy etylenowej pomiędzy dwiema czwartorzędowymi grupami amoniowymi (H-15) oraz sygnałem przy 3,21 ppm pochodzącym od grup metylowych (H-14). Atomy wodoru H-4 przy pierścieniu benzenowym podstawionym dwoma czwartorzędowymi grupami amoniowymi dają sygnał w okolicy 7,92 - 7,67 ppm. Podstawienie dodatkową grupą alkoksylową, będącą grupą elektronodonorową, przesuwa sygnał H-7 w pierścieniu aromatycznym do ok. 7,48-7,28 ppm. Benzyłowe H-3 w grupach końcowych pojawiły się w okolicy 4,60 - 4,53 ppm, a H-5 w łańcuchu głównym przy ok. 4,84 ppm w przypadku polimerów z DABCO oraz ok 4,74 ppm w polimerach z TMEDA.



Rysunek 34. Zestawienie widm ^1H NMR (400 MHz, D_2O) wszystkich otrzymanych polimerów z etoksyłową grupą boczną (widma w pełnym rozmiarze stanowią Załącznik 2).

W celu potwierdzenia składu pierwiastkowego otrzymanych jonenów została wykonana analiza elementarna. Wyniki analizy wykazały w każdym z przypadków zgodny z teoretycznym stosunek zawartości węgla do azotu, a także zawyżoną całkowitą zawartość wodoru i zaniżoną zawartość węgla i azotu. Dobrą zbieżność teoretycznego i eksperymentalnego składu pierwiastkowego otrzymałem zakładając, że joneny, tak jak niektóre czwartorzędowe sole amoniowe, tworzą hydraty. Dodając kolejne cząsteczki wody do struktury monomeru otrzymałem dobrą korelację z wynikami eksperymentalnymi, co potwierdziło wysoką czystość otrzymanych związków. Wyniki analizy elementarnej wraz z informacją o stopniu uwodnienia poszczególnych jonenów znajdują się w części eksperymentalnej niniejszej pracy w sekcji poświęconej syntezie polimerów.

8.4.4. Krytyczne stężenie agregacji oraz zeta potencjał otrzymanych jonenów

W celu lepszego poznania zachowania się otrzymanych przeze mnie jonenów w wodzie, a także zbadania czy można zaliczyć je do surfaktantów, wyznaczyłem CAC stosując metodę pirenową. Polega ona na zastosowaniu pirenu, jako hydrofobowego barwnika fluorescencyjnego charakteryzującego się różnym widmem emisyjnym w środowisku hydrofobowym i hydrofilowym. W wodzie, pod wpływem wzbudzenia światłem o długości 337 nm stosunek intensywności pierwszego (I_1 dla 373 nm) do drugiego (I_3 dla 384 nm) pasma emisji wynosi ok. 2. Natomiast gdy piren znajdzie się w środowisku hydrofobowym wartość ta spada do ok. 1. Zestawiając I_1/I_3 w funkcji stężenia surfaktantu można zaobserwować ostry spadek z 2 do 1 dla pewnej wartości stężenia, świadczący o ulokowaniu się pirenu w hydrofobowym wnętrzu formujących się miceli lub innych agregatów. Wartość ta uznawana jest za CAC.^{246,247} Oznaczenia tej wielkości przeprowadziłem zarówno w czystej wodzie o oporności $\geq 18,2 \text{ M}\Omega$, jak i PBS o pH 7,4.

Z analizy otrzymanych danych wynika, że wszystkie joneny C0, C2 i C4 nie tworzą agregatów w stężeniu poniżej 2 mg/mL. Polikationy C8 i C12 charakteryzują się CAC w zakresie 4 - 1600 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3). Z porównania par analogicznych jonenów z łańcuchami C8 i C12 wyłania się stosunkowo oczywista zależność, że bardziej hydrofobowe joneny C12 charakteryzują się niższym CAC od C8. Drugim wnioskiem, dotyczącym struktury łańcucha głównego jonenów, jest wpływ jego elastyczności i izomerii. Porównując CAC jonenów zawierających DABCO z ich analogami zawierającymi TMEDA (Tabela 3, nr 1 vs 5, 2 vs 6, 3 vs 7 oraz 4 vs 8) dostrzegalna jest wyraźnie lepsza zdolność do agregacji w przypadku sztywniejszych pochodnych DABCO. Porównanie CAC pod kątem wpływu izomerii (nr 1 vs 3, 2 vs 4, 5 vs 7 oraz 6 vs 8) prowadzi natomiast do wniosku, że joneny zawierające podstawnik

meta chętniej agregują w badanych warunkach. Trzecim wnioskiem, jaki można wyciągnąć z wyników zestawionych w Tabeli 3, jest znaczne podniesienie CAC poprzez wprowadzenie do struktury jononów silnie hydrofilowej grupy oPEG (nr 1 vs 9 oraz 2 vs 10). Warto zauważyć, że związek C8-T-p-T, łączący dwie cechy obniżające zdolność do agregacji (elastyczny łańcuch oraz izomeria *para*) nie wykazał CAC w wodzie w badanym zakresie stężeń nawet pomimo obecności silnie hydrofobowej grupy oktyloksylowej (nr 7). Ponieważ cechą charakterystyczną surfaktantów jest zdolność do tworzenia agregatów (miceli w przypadku niskocząsteczkowych surfaktantów), otrzymane wyniki pozwalają zaklasyfikować jonony C8 i C12 do tej grupy substancji. Niezależnie od struktury badanego polimerycznego surfaktantu, związki te wykazały znacznie niższe CAC w środowisku o wysokim stężeniu soli (PBS) w porównaniu do samej wody.

Tabela 3. Krytyczne stężenie agregacji badanych jononów oraz zeta-potencjał powstających agregatów.

Nr	Polimer	CAC ^a [µg/mL]		Zeta-potencjał ^b [mV]	
		H ₂ O	PBS	H ₂ O	PBS
1	C8-D-m-D	360	38	65,0 ± 1,4	14,1 ± 1,6
2	C12-D-m-D	20	≤ 4	67,0 ± 2,7	19,5 ± 2,1
3	C8-D-p-D	1100	49	46,6 ± 1,3	17,3 ± 0,2
4	C12-D-p-D	53	15	60,4 ± 1,0	17,3 ± 1,1
5	C8-T-m-T	1600	600	82,1 ± 3,1	23,6 ± 1,6
6	C12-T-m-T	56	10	97,2 ± 1,7	31,3 ± 2,0
7	C8-T-p-T	> 2000	920	-	18,2 ± 0,9
8	C12-T-p-T	80	16	64,1 ± 0,6	16,9 ± 1,5
9	C8-D-PEG-D	590	65	12,3 ± 2,2	9,55 ± 0,3
10	C12-D-PEG-D	110	≤ 4	13,3 ± 0,6	7,84 ± 1,19

^a zbadane przy pomocy metody pirenowej²⁴⁶ w 25 °C, ^b zbadane przy pomocy DLS w 25 °C

W celu scharakteryzowania powstających agregatów wykonałem pomiary średnicy hydrodynamicznej oraz zeta-potencjału stosując metodę DLS. W badaniach tych zastosowałem stężenie polimerów równe 2 mg/mL, przekraczające wartości CAC. Znaczna większość agregatów charakteryzowała się multimodalnym rozkładem średnicy hydrodynamicznej obliczonej z wykorzystaniem intensywności rozpraszania światła. W związku czym dane te nie są dalej dyskutowane. Na podstawie zmierzonego zeta-potencjału (Tabela 3) jononów można

wysnuć dwa wnioski dotyczące wpływu struktury, mianowicie elastyczne jony (z TMEDA) o izomerii *meta* wykazały znacznie wyższy potencjał elektrokinetyczny od ich sztywnych analogów (zawierających DABCO), podczas gdy w przypadku izomerów *para* różnica taka jest mniej znacząca. Ponadto większość jonów *meta* wykazała wyższy potencjał od ich analogów *para* zarówno w wodzie jak i PBS. Największy wpływ na potencjał elektrokinetyczny agregatów ma dodatkowa grupa oPEG, której obecność kilkukrotnie obniża wartość zeta-potencjału (nr 1 vs 9 oraz 2 vs 10). Wpływ ten najprawdopodobniej wynika z dwóch nakładających się efektów: (i) powinowactwa anionów hydroksylowych do cząsteczki PEG (asymetryczna adsorpcja jonów)²⁴⁸ oraz (ii) zwiększenia odległości pomiędzy naładowaną powierzchnią agregatów, a płaszczyzną poślizgu (grubsza warstwa dyfuzyjna) wynikającą z ograniczonej mobilności cząsteczek wody.²⁴⁹ Podobnie jak w przypadku CAC, stężenie soli wpływa również na zeta-potencjał, w PBS potencjał jest znacząco niższy niż w czystej wodzie, co związane jest z mniejszym promieniem Debye'a.^{249,250}

9. Badania biologiczne otrzymanych jonenów

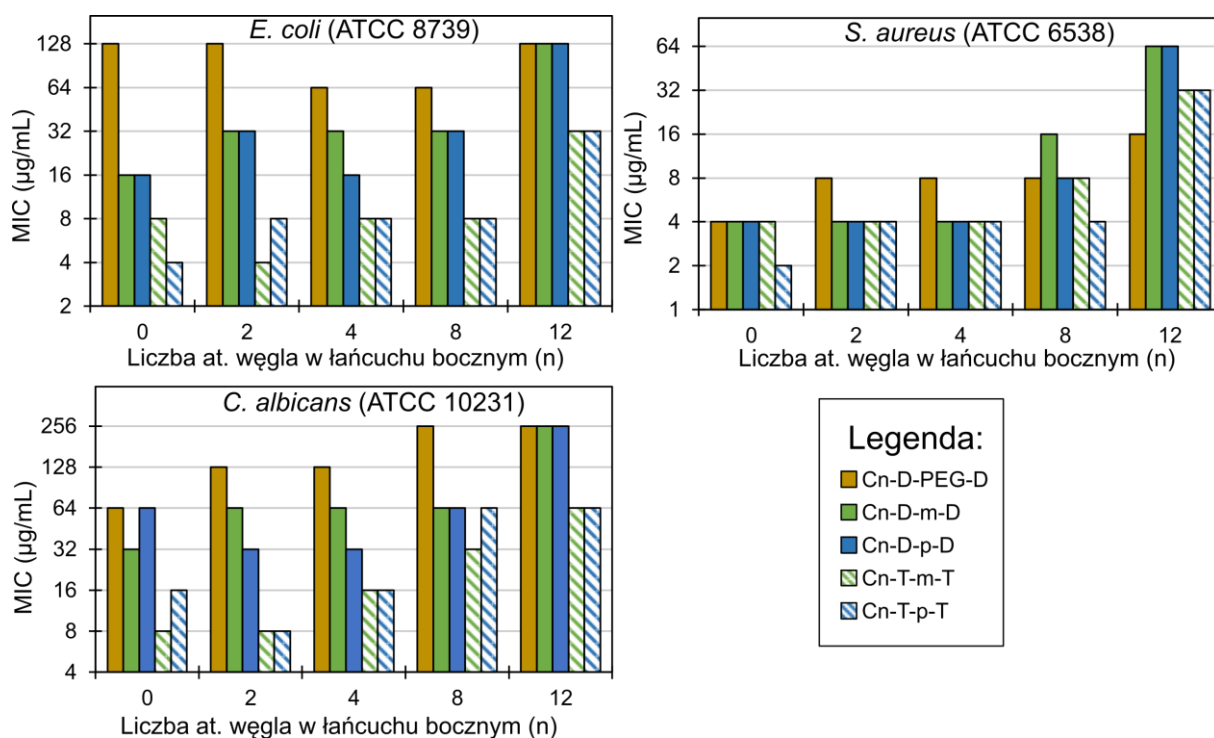
Przeprowadziłem szereg testów biologicznych, aby zrozumieć zależności pomiędzy strukturą i aktywnością otrzymanych jonenów (Tabela 2). Badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych obejmowały oznaczenia MIC, MBC, MFC, a także kinetykę zabijania mikroorganizmów. Zastosowałem do tego celu modelowe szczepy z Amerykańskiej Kolekcji Linii Komórkowych (ATCC, ang. *American Type Culture Collection*). Ponadto wartości MIC zostały również oznaczone dla izolowanych szczepów klinicznych oraz prątków (*Mycobacterium*) we współpracy z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

Wstępne badania nad biokompatybilnością otrzymanych związków obejmowały oznaczenia właściwości hemolitycznych na ludzkich czerwonych krwinkach oraz cytotoksyczności wobec mysich fibroblastów z ATCC. Oba te testy zostały wykonane we współpracy z Zakładem Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej.

9.1. Oznaczenia mikrobiologiczne

9.1.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wobec mikroorganizmów z ATCC

Podstawową wielkością charakteryzującą aktywność czynników przeciwdrobnoustrojowych jest MIC. Wartość tę oznaczyłem dla każdego z otrzymanych jonenów (Tabela 2) wykorzystując modelowe mikroorganizmy o znaczeniu klinicznym. Należały do nich oportunistyczna gram-ujemna bakteria *Escherichia coli*, gram-dodatnia bakteria *Staphylococcus aureus* odpowiedzialna za wiele zakażeń szpitalnych oraz grzyb *Candida albicans* zaliczany do rzędu drożdżaków, odpowiedzialny za zakażenia oportunistyczne (tzw. kandydozy). W badaniach na bakteriach zastosowałem podłoże płynne Mueller-Hinton (MHB, ang. *Mueller-Hinton Broth*), natomiast w przypadku drożdżaków podłoże płynne Sabouraud (SAB, ang. *Sabouraud Broth*). Otrzymane wyniki zaprezentowałem na Rysunku 35.



Rysunek 35. Wyniki oznaczeń MIC wobec modelowym mikroorganizmom z ATCC.

Wśród otrzymanych polikationów znajdują się zarówno bardzo silne (MIC 2 - 8 µg/mL), jak i względnie słabe (MIC 128 - 256 µg/mL) związki przeciwdrobnoustrojowe. Gram-dodatnie bakterie *S. aureus* wykazują największą podatność na działanie jonenów, podczas gdy drożdżaki *C. albicans* są najmniej wrażliwe. Trend ten jest powszechnie obserwowany zarówno dla jonenów,^{39,40,105,110,157,251,252} jak i innych grup polikationów.^{62,88,104,189} Wyższa podatność bakterii gram-dodatnich w stosunku do gram-ujemnych tłumaczona jest w literaturze różnicą w budowie ich otoczki komórkowej. Błona komórkowa bakterii gram-dodatnich otoczona jest grubą ścianą z peptydoglikanu, podczas gdy błona bakterii gram-ujemnych chroniona jest cienką ścianą komórkową oraz dodatkową, zewnętrzną błoną komórkową. Dodatkowa błona komórkowa stanowi trudniejszą barierę do pokonania dla polikationów, niż gruba ściana komórkowa.¹⁷ Natomiast błona komórkowa drożdżaków, w porównaniu do bakterii, zawiera zarówno mniejszą ilość anionowych fosfolipidów, jak i chroniona jest podwójną ścianą złożoną z węglowodanów oraz białek (Rysunek 1).^{17,18}

Dalszą dyskusję nad wpływem poszczególnych parametrów strukturalnych jonenów na MIC podzieliłem na odpowiednie podpunkty dotyczące hydrofobowości, sztywności i izomerii łańcucha głównego oraz wpływu hydrofilowej grupy bocznej.

9.1.1.1. Wpływ hydrofobowości na aktywność przeciwdrobnoustrojową

Najsilniejszą aktywność hamującą wzrost, w obrębie znaczącej większości spośród badanych serii jonenów, wykazują związki nieposiadające alkoksylowych grup bocznych, tj. C0-D-m-D, C0-D-p-D, C0-T-m-T i C0-T-p-T i C0-D-PEG-D (Rysunek 35). Wydłużenie bocznej grupy alkilowej w większości zbadanych przeze mnie przypadków nie wpływa, bądź prowadzi do zwiększenia MIC. Najbardziej hydrofobowe polikationy z grupą dodecyloksylową (C12) charakteryzują się najsłabszą aktywnością w obrębie większości serii jonenów. Z zaprezentowanych wyników można wyciągnąć wniosek, że zwiększenie hydrofobowości cząsteczki jonenu *different center* wywiera raczej negatywny wpływ na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Zaobserwowana tendencja wydaje się nieoczywistą na tle wyników opublikowanych dotychczas w literaturze naukowej. Większość opisanych platform polikationowych (poliwęglany, polimetakrylany, polinorborneny, etc.) wymaga obecności silnie hydrofobowych komponentów w swojej strukturze, które są odpowiedzialne za penetrację hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy fosfolipidowej.^{14,184} Przekłada się to na wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej wraz ze wzrostem hydrofobowości cząsteczki.^{56–58,60,65,78,94,102,150} Jednakże nadmierna hydrofobowość może zmniejszyć aktywność polikationów.^{57,78,94,102} Innym możliwym powodem niższej aktywności nadmiernie hydrofobowych jonenów jest silne oddziaływanie z białkami obecnymi w pożywce wzrostowej mikroorganizmów, w której prowadzone są badania mające na celu oznaczenie MIC.^{64,83,253} W ramach moich prac zaobserwowałem silne zmętnienie pożywek po dodaniu do nich wodnych roztworów jonenów z grupą boczną C8 i C12, czemu towarzyszyło wypadanie ciała stałego. Natomiast w przypadku bardziej hydrofilowych związków zmętnienie nie pojawiało się. Obserwacje te świadczą o silniejszych oddziaływaniach jonenów C8 i C12 z białkami pożywki w porównaniu do jonenów C0, C2 i C4, co może być jedną z przyczyn niższej aktywności hydrofobowych jonenów.

Aby sprawdzić czy oddziaływania jonenów z białkami pożywki są główną przyczyną obserwowanego spadku aktywności hamującej wzrost mikroorganizmów, przeprowadziłem dodatkowe oznaczenia MBC i MFC dla serii Cn-T-p-T. Badania te przeprowadziłem zarówno w pożywkach wzrostowych (MBC_{MHB} i MFC_{SAB}), jak i w buforze fosforanowym o pH 7,4 z dodatkiem chlorku sodu w stężeniu fizjologicznym (PBS, ang. *phosphate-buffered saline*) (MBC_{PBS} i MFC_{PBS}). MBC oraz MFC zdefiniowane są jako najniższe zbadane stężenia potrzebne do zabicia 99.9% mikroorganizmów obecnych w próbce.

Porównując otrzymane wyniki MBC_{MHB} z MIC (Tabela 4) można wyciągnąć wniosek, że względnie hydrofilowe jony C0, C2 i C4-T-p-T wykazują aktywność bakteriobójczą, podczas gdy hydrofobowe C8 i C12-T-p-T są raczej bakteriostatykami. MBC_{MHB} większości hydrofilowych jonenów jest równe MIC, natomiast w przypadku bardziej hydrofobowych większość tych wartości jest kilkakrotnie wyższa od MIC. W przypadku aktywności przeciwko *C. albicans* wszystkie zbadane związki wykazują co najmniej 4-krotnie wyższe MFC_{SAB} od MIC, co świadczy o ich fungistatycznym działaniu.

Tabela 4. Porównanie aktywności hamującej wzrost oraz bakterio- i grzybobójczej jonenów z serii Cn-T-p-T.

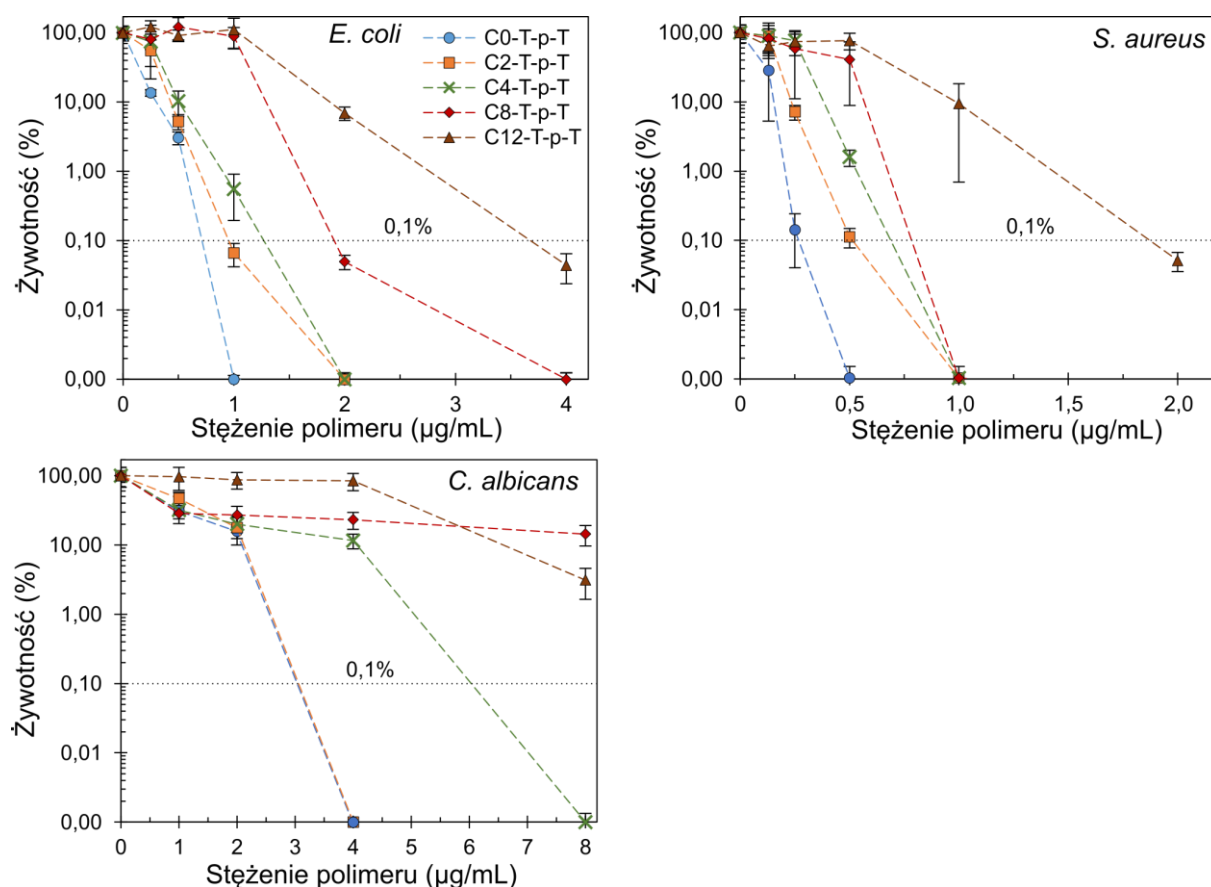
Polimer	MIC ^{a,b} (μg/mL)			MBC _{MHB} ^a (μg/mL) lub MFC _{SAB} ^a (μg/mL)			MBC _{PBS} ^c (μg/mL) lub MFC _{PBS} ^c (μg/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
C0-T-p-T	4	2	16	4	4	64	1	0.5	4
C2-T-p-T	8	4	8	8	4	32	1	1	4
C4-T-p-T	8	4	16	8	4	32	2	1	8
C8-T-p-T	8	4	64	16	8	> 256	2	1	> 16
C12-T-p-T	32	32	64	128	32	> 256	4	2	> 16

^a wielkości oznaczone w pożywkach wzrostowych; ^b wartości z Rysunku 35; ^c wielkości oznaczone w PBS

Po zestawieniu stężeń bakteriobójczych i grzybobójczych oznaczonych w pożywkach (MBC_{MHB} i MFC_{SAB}) z odpowiadającymi im wielkościami oznaczonymi w PBS (MBC_{PBS} i MFC_{PBS}) widoczna jest wyraźnie silniejsza aktywność badanych związków w PBS. Wartości MBC_{MHB} i MFC_{SAB} jonenów C0, C2, C4-T-p-T są 4-8-krotnie wyższe od odpowiadających im MBC_{PBS} i MFC_{PBS} , natomiast dla C8 i C12-T-p-T różnica ta jest 8-32-krotna. Z. Geng i M. G. Finn zaobserwowali ok. 100-krotnie wyższą wartość MIC od MBC_{PBS} dla jonenów będących sulfidowymi pochodnymi bicyklo[3.3.1]nonanu,²⁵³ których hydrofobowość jest znacznie wyższa od jonenów przedstawionych w mojej rozprawie. Wynik ten świadczy o jeszcze niższej aktywności przytoczonych polimerów w pożywce niż w PBS, co jest zgodne z moją obserwacją, że bardziej hydrofobowe polikationy silniej oddziałują ze składnikami pożywki. Wnioski te prowadzą do konkluzji, że badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej w PBS pozwala na odseparowanie wpływu oddziaływania polikationów z białkami obecnymi w pożywce od właściwej aktywności wobec bakterii. Tym samym daje to bardziej miarodajne wyniki będące lepszym odniesieniem dla wyników badań hemolitycznych oraz badań na modelowych dwuwarstwach lipidowych, które prowadzone są w buforach. Z drugiej strony

prezentowane polikationy są rozważane pod kątem zastosowania jako nowe antybiotyki, które działałyby w osoczu krwi zawierającym wiele różnych białek z którymi mogłyby oddziaływać. Wyniki uzyskane w pożywkach wzrostowych są zatem bardziej adekwatne z praktycznego punktu widzenia.

Wszystkie stężenia odnoszące się do aktywności przeciwdrobnoustrojowej (MIC, MBC i MFC), przedstawione w Tabeli 4, rosną lub pozostają na stałym poziomie wraz z wydłużaniem grupy alkoksylowej. Ponadto zależności żywotności bakterii od stężenia polimerów (Rysunek 36), które posłużyły do wyznaczenia MBC_{PBS} i MFC_{PBS} , wskazują również na spadek aktywności. Im dłuższa grupa boczna, tym wyższa żywotność bakterii w danym stężeniu polimerów. Wyniki te jednoznacznie potwierdzają zmniejszenie aktywności badanych związków wraz z wydłużaniem alkilowej grupy bocznej. Podobne trendy były opisane w dwóch pracach innych badaczy^{253,254} dla jonenów *different center* o mniejszej gęstości ładunku dodatniego i znacznie większej hydrofobowości łańcucha głównego. Wyniki przedstawione w mojej rozprawie dowodzą, że zależność ta jest widoczna również dla silnie hydrofilowych układów.



Rysunek 36. Żywotność mikroorganizmów po inkubacji z jonenami w PBS w 37 °C przez 2 godziny.

Jednym z możliwych wytłumaczeń niższej aktywności bakteriobójczej jonenów C8 i C12-T-p-T jest formowanie się agregatów polimerowych, które słabiej oddziałują z błoną komórkową. Jednakże CAC oznaczone w PBS wynosi odpowiednio 920 i 16 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3) i jest znacznie wyższe od MBC_{PBS} które wynosi 4 i 2 $\mu\text{g/mL}$ dla odpowiednio *E. coli* i *S. aureus*. Można przyjąć, że w stężeniu w którym obserwowana jest aktywność bakteriobójcza ilość agregatów jest pomijalnie niska.

Innym prawdopodobnym wyjaśnieniem zaobserwowanego wpływu hydrofobowości na aktywność jonenów jest różny mechanizm destabilizacji błony komórkowej przez jony hydrofilowe i hydrofobowe, dyskutowany w Podrozdziale 7. W literaturze opisano kilka przykładów względnie hydrofilowych jonenów o dużej gęstości ładunku dodatniego wzdłuż łańcucha głównego, które wykazują bardzo silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe.^{39,40,110,182} Jednakże w żadnej z tych prac nie zgłębiano dokładniej mechanizmu ich działania. T. Ikeda i wsp. wykazali zdolność hydrofilowych jonenów do separacji anionowych fosfolipidów w obrębie dwuwarstwy fosfolipidowej i skorelowali tę zdolność z właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi.¹⁰⁹ Analogiczne badania zostały przeprowadzone przez grupę badawczą A. Yaroslavov'a na pochodnych poli(winylo pirydyny).^{161,167,255} W myśl tej teorii, hydrofilowy polikation adsorbując na powierzchni dwuwarstwy złożonej z różnych fosfolipidów najsilniej oddziałuje z anionowymi lipidami, co prowadzi do segregacji składników w obrębie warstwy. Taki rozdział fosfolipidów zmienia właściwości dwuwarstwy prowadząc do zwiększenia jej przepuszczalność. Planując zaprezentowaną bibliotekę jonenów zakładałem, że obecność hydrofobowych grup bocznych umożliwi działanie poprzez dwa mechanizmy - tworzenie fazy anionowych lipidów oraz wbudowanie hydrofobowych fragmentów do wnętrza dwuwarstwy. Spodziewanym efektem wzrostu hydrofobowości było zwiększenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej, jednakże wyniki eksperymentalne wykazały odwrotny trend. Szersza dyskusja różnic w oddziaływaniu badanych przeze mnie względnie hydrofilowych i hydrofobowych jonenów z dwuwarstwą fosfolipidową została przedstawiona w Podrozdziale 10 poświęconym badaniom nad mechanizmem ich działania.

9.1.1.2 Wpływ sztywności jonenów na aktywność przeciwdrobnoustrojową

Wpływ sztywności głównego łańcucha jonenów, zbadany poprzez porównanie aktywności polimerów zawierających fragment DABCO i TMEDA (Schemat 3), jest w pewnym stopniu zależny od rozważanego mikroorganizmu. Znaczna większość elastycznych

jonenów zawierających TMEDA wykazuje 2- do 8-krotnie niższy MIC wobec *E. coli* i *C. albicans* w porównaniu z ich sztywnymi analogami zawierającymi DABCO (Rysunek 35). Wyjątek stanowi para jonenów C8-D-p-D i C8-T-p-T, których MIC wobec *C. albicans* są sobie równe. Natomiast aktywność wobec *S. aureus* większości względnie hydrofilowych jonenów z grupami bocznymi C0, C2 i C4 okazała się być na tym samym poziomie. Dopiero bardziej hydrofobowe związki (C8 i C12) zawierające łącznik w postaci TMEDA wykazują 2-krotnie niższy MIC wobec *S. aureus* od ich analogów z łącznikiem DABCO.

Na podstawie przedstawionych wyników postawiłem hipotezę, że zwiększona elastyczność łańcucha głównego jonenów wywiera pozytywny wpływ na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Efekt ten przypisuję większej swobodzie rotacji elastycznych jonenów przekładający się na większą liczbę możliwych konformacji, jakie cząsteczka może przyjąć. Dzięki temu, gdy cząsteczka polimeru adsorbuje na powierzchni dwuwarstwy fosfolipidowej, oraz na innych strukturach błony komórkowej, może łatwiej przyjąć konformację umożliwiającą silne oddziaływanie. Może to być związane z szeroko dyskutowaną w literaturze zmianą lokalnie amfifilowej konformacji polikationu, jaką wykazuje w roztworze, w uporządkowaną, globalnie amfifilową podczas oddziaływania z dwuwarstwą (Rysunek 5).^{14,17,37,174,256} Ponadto, wyższa elastyczność cząsteczki wydaje się ułatwiać migrację poprzez usieciowaną ścianę komórkową.

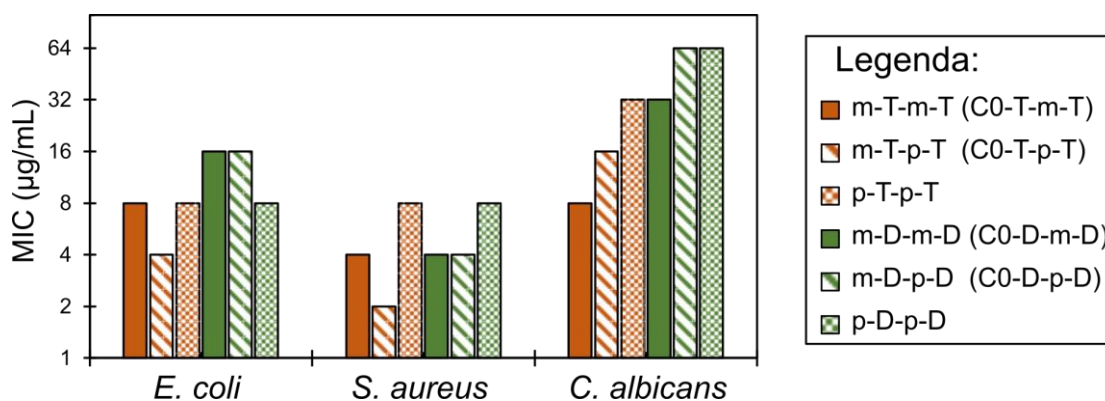
Grupa badawcza Gellman'a wykazała silniejszą aktywność przeciwdrobnoustrojową sztywnych pochodnych nylonu-3⁸⁹ oraz pomijalnie mały wpływ sztywności na aktywność innych pochodnych (Rysunek 24).⁸⁸ Odmienne obserwacje w porównaniu do przedstawionych w ramach mojej rozprawy mogą wynikać z usztywnienia struktury przytoczonych molekuł w ich aktywnej konformacji. Natomiast w badaniach nad peptydami przeciwbakteryjnymi, których postulowany mechanizm działania jest zbliżony do mechanizmu polikationów, wykazano, że wzrost elastyczności cząsteczki wzmacnia ich aktywność przeciwdrobnoustrojową.^{197–199,201}

Poprawa aktywności związków biologicznie czynnych poprzez usztywnienie cząsteczki w konformacji optymalnej dla oddziaływania z celem molekularnym jest strategią wykorzystywaną podczas opracowywania nowych leków.²⁵⁷ Jednakże, ze względu na zbyt niski stan obecnej wiedzy dotyczącej polikationów i peptydów przeciwdrobnoustrojowych, zastosowanie analogicznej strategii jest niemożliwe. W związku z tym wydaje się, że na razie optymalnym podejściem jest pozwolenie, aby cząsteczka mogła sama dopasować się do tak złożonego celu, jakim jest błona komórkowa.

9.1.1.3 Wpływ izomerii jonenów na aktywność przeciwdrobnoustrojową

Na podstawie otrzymanych przeze mnie wyników MIC można stwierdzić, że izomeria fragmentu arylowego w łańcuchu głównym ma niewielki wpływ na właściwości przeciwbakteryjne badanych amfifilowych jonenów. Znaczną większość par jonenów *meta/para* w obrębie głównej biblioteki jonenów charakteryzuje MIC o takiej samej wartości (Rysunek 35, porównanie słupków zielonych pełnych z niebieskich pełnymi oraz zielonych w paski z niebieskimi w paski). Natomiast w przypadku par wykazujących 2-krotne różnice w MIC można zauważyć, że zmiana izomerii z *meta* na *para* nie pogarsza aktywności wobec *S. aureus*, a w przypadku *C. albicans* izomery *meta* jonenów C0 są aktywniejsze od ich analogów *para*.

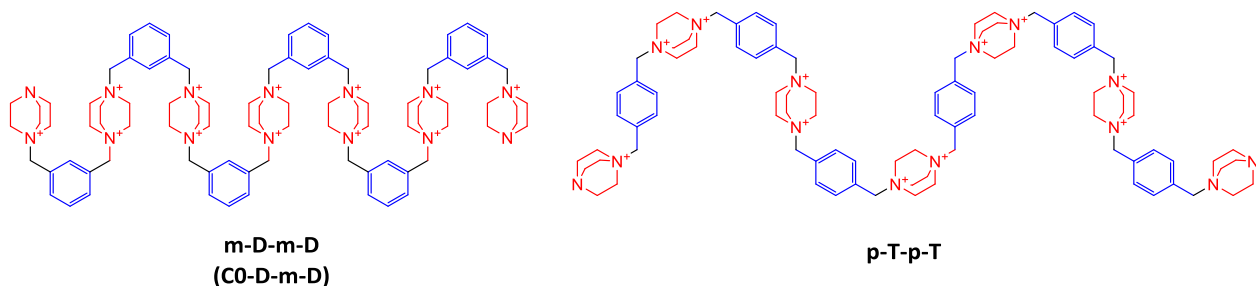
W celu nieco szerszego zbadania wpływu izomerii oznaczyłem MIC jonenów p-T-p-T i p-D-p-D (Schemat 4), a otrzymane wyniki zestawilem, dla ułatwienia dyskusji, z wynikami dla pozostałych polimerów nieposiadających grup bocznych (Rysunek 37). Najlepiej widoczny trend występuje w przypadku aktywności wobec *C. albicans* - jony zawierające grupy aryłowe tylko o izomerii *meta* wykazały najniższy MIC, podczas gdy jony o izomerii *para* najwyższy. Na *S. aureus* również najslabiej działają jony zawierające tylko izomer *para*. Natomiast wpływ izomerii na aktywność wobec *E. coli* nie tworzy żadnej widocznej zależności.



Rysunek 37. Wyniki oznaczeń MIC jonenów bez alkilowych grup bocznych wobec modelowym mikroorganizmom. Część wyników została zaczerpnięta z Rysunku 35.

Dyskutowane jony bez grup alkoksylowych (Rysunek 37) charakteryzują się względnie niską hydrofobowością. Jedynym ich fragmentem hydrofobowym jest grupa aryłowa w łańcuchu głównym otoczona hydrofilowymi czwartorzędownymi solami amoniowymi. Aby grupa ta mogła skutecznie oddziaływać z hydrofobowym wnętrzem dwuwarstwy fosfolipidowej, jony muszą przybrać konformację pozwalającą na

odseparowanie domen hydrofobowych i hydrofilowych (globalnie amfifilowa konformacja). Wydaje się to być mało prawdopodobne w przypadku jonenów o grupach arylowych tylko w izomerii *para* i możliwe dla jonenów o izomerii *meta* (Rysunek 38).



Rysunek 38. Schematyczne przedstawienie potencjalnie najbardziej amfifilowych konformacji jonenów bez bocznych grup alkilowych. Na przykładzie jonenów z DABCO. Fragmenty hydrofilowe zaznaczono na czerwono, hydrofobowe na niebiesko.

Konformacje przedstawione na Rysunku 38 są uproszczeniem prezentującym możliwe ustawienie podstawników, które nadaje cząsteczce globalnie amfifilowy charakter. W roztworze wodnym cząsteczka m-D-m-D, ze względu na oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy gęsto rozmieszczonymi grupami kationowymi, prawdopodobnie występuje głównie w konformacji liniowej. Jednakże podczas kontaktu z dwuwarstwą fosfolipidową może eksponować hydrofobowe grupy aryłowe do wnętrza dwuwarstwy. Obserwowana wyższa aktywność jonenów *meta* wobec *S. aureus* i *C. albicans*, w porównaniu z ich analogami *para*, może wynikać zarówno z omówionej amfifilowości, jak i z możliwości przyjęcia bardziej zwartej konformacji ułatwiającej migrację przez ścianę komórkową.

9.1.1.4 Wpływ grupy oPEG na aktywność przeciwdrobnoustrojową

W celu określenia wpływu grupy oPEG na aktywność badanych jonenów należy porównać ze sobą wyniki otrzymane dla serii Cn-D-PEG-D oraz Cn-D-m-D (Rysunek 35, brązowe oraz pełne zielone słupki). Obecność tej grupy prowadzi do wzrostu MIC jonenów C0, C2, C4 i C8 wobec *E. coli* z zakresu 16-32 µg/mL do 64-128 µg/mL, oraz nie wpływa na aktywność jonenów C12. Podobna zależność występuje dla aktywności wobec *C. albicans*, jednakże obserwowane różnice w wartościach MIC są tutaj mniejsze. MIC wobec *S. aureus* charakteryzuje się odmienną zależnością, jony C0 obu serii wykazują taką samą aktywność, jony C2 i C4-D-m-D są aktywniejsze od ich analogów z grupą PEG, podczas gdy C8 i C12-D-m-D są mniej aktywne od PEGylowanych odpowiedników.

Z otrzymanych przeze mnie danych wynika, że dodatkowa silnie hydrofilowa grupa boczna w postaci fragmentu oPEG obniża aktywność przeciwdrobnoustrojową jonenów. Wniosek ten jest zbieżny z wynikami literaturowymi otrzymanymi dla innych polikationów do których wbudowano silnie hydrofilowe fragmenty w postaci oligomerycznych łańcuchów PEG'u,^{71,73,77,100} glikozydów,^{100,178,189,190} grup hydroksylowych^{64,87} oraz grup amidowych.^{79,81,191} Obniżona aktywność jonenów zawierających grupę PEG może być efektem trzech nakładających się czynników: (i) niższego zeta-potencjału (Tabela 3, nr 1 i 2 vs 9 i 10) osłabiającego oddziaływanie elektrostatyczne z dwuwarstwą fosfolipidową, (ii) większej średnicy hydrodynamicznej wpływającej na dyfuzję polimeru poprzez ścianę komórkową oraz (iii) zwiększonej hydrofilowości utrudniającej oddziaływanie z hydrofobowym wnętrzem dwuwarstwy fosfolipidowej.

Obserwowane różnice we wpływie grupy oPEG na aktywność wobec różnych mikroorganizmów mogą być efektem różnic w budowie struktur otaczających komórki. Bakterie gram-ujemne (*E. coli*) są chronione dodatkową zewnętrzną błoną komórkową (Rysunek 1), przez którą cząsteczka polikationu musi przejść, aby zadziałać na wewnętrzną błonę komórkową. Błona fosfolipidowa stanowi poważną przeszkodę dla dużych, hydrofilowych cząsteczek,²¹ co może być powodem znacznie niższej aktywności jonenów z silnie hydrofilową grupą oPEG.

Gruba ściana komórkowa bakterii gram-dodatnich (*S. aureus*) może działać jak sito molekularne utrudniając dotarcie większych cząsteczek do błony komórkowej.¹⁸³ Może to tłumaczyć brak wpływu grupy oPEG na aktywność jonenu C0 oraz niższą aktywność C2 i C4. Związek C0-D-PEG-D, zawierający tylko krótki fragment oPEG jako grupę boczną, może swobodnie dyfundować przez ścianę komórkową. Natomiast dyfuzja jonenów zawierających zarówno grupę oPEG jak i grupę etoksylową lub butoksylową (C2 lub C4) jest utrudniona. Wy tłumaczenie to jednakże nie obejmuje eksperymentalnego faktu jakim jest silniejsza aktywności polimerów C8 i C12-D-PEG-D w porównaniu do ich odpowiedników bez grupy oPEG. Efekt ten może mieć podłoże w optymalizacji równowagi hydrofilo-lipofilowej: polikationy C8-D-m-D oraz C12-D-m-D są nadmiernie hydrofobowe, aby oddziaływać z błoną komórkową *S. aureus*, natomiast dodatkowa grupa oPEG przesuwą tę równowagę w kierunku hydrofilowości aktywując cząsteczkę polimeru.

Spadek aktywności wobec *C. albicans* może być również przypisany osłabieniu oddziaływań z dwuwarstwą fosfolipidową oraz trudnością w migracji przez grubą, dwuwarstwową ścianę komórkową.¹⁸

9.1.2. Aktywność przeciwko szczepom klinicznym bakterii, w tym *Mycobacterium*

Do badań nad aktywnością otrzymanych jonenów wobec lekoopornych szczepów klinicznych oraz prątków (*Mycobacterium*), w tym prątków gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*), wytypowałem cztery związki: C0-D-p-D, C0-T-p-T, C8-D-p-D oraz C8-T-p-T. Taki dobór jonenów pozwolił mi na szersze badania nad wpływem elastyczności oraz hydrofobowości na aktywność przeciwdrobnoustrojową. Ponadto badaniom aktywności wobec szczepów klinicznych zostały poddane także jony C0-D-PEG-D oraz C2-D-PEG-D ze względu na ich obniżoną cytotoksyczność, dyskutowaną szerzej w Podrozdziale 9.2.

9.1.2.1 Szczepy kliniczne nie będące *Mycobacterium*

Wartości MIC wybranych związków zostały oznaczone dla kilku lekoopornych szczepów bakterii. Należały do nich dwa szczepy *Klebsiella pneumoniae* produkujące metallo- β -laktamazę New Delhi (NDM, ang. *New Delhi metallo- β -lactamase*) oraz β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL, ang. *extended-spectrum β -lactamases*), nadające bakteriom oporność na wiele antybiotyków β -laktamowych. Oporny na wankomycynę szczep *Enterococcus faecium* (VRE, ang. *vancomycin-resistant E. faecium*), oporny na metycylinę szczep *Staphylococcus aureus* (MRSA, ang. *methicillin-resistant S. aureus*), a także szczepy *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*. Wyniki tych oznaczeń (Tabela 5) świadczą o braku aktywności jonenów zawierających grupę C8 wobec izolowanych szczepów klinicznych (MIC > 512 $\mu\text{g/mL}$), w przeciwieństwie do bardziej hydrofilowych jonenów C0 (MIC 16 – 256 $\mu\text{g/mL}$). Związek C0-T-p-T wykazał najniższe wartości MIC wobec VRE oraz MRSA, wynoszące odpowiednio 16 i 32 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$ wobec *K. pneumoniae* (NDM), *P. aeruginosa* i *A. baumannii*, oraz 128 $\mu\text{g/mL}$ wobec *K. pneumoniae* (ESBL). Natomiast usztywniony jonen C0-D-p-D wykazał bardzo słabą aktywność przeciwko bakteriom *K. pneumoniae* oraz brak aktywności wobec pozostałych bakterii.

Tabela 5. Aktywność wybranych jonenów przeciwko szczepom klinicznym

Polimer	MIC (µg/mL)					
	<i>K. pneumoniae</i> ^a (NDM)	<i>K. pneumoniae</i> ^a (ESBL)	VRE ^{b,c}	<i>P. aeruginosa</i> ^a	MRSA ^{d,b}	<i>A. baumannii</i> ^a
C0-D-p-D	512	256	>512	>512	>512	>512
C0-T-p-T	64	128	16	64	32	64
C8-D-p-D	>512	>512	>512	>512	32	>512
C8-T-p-T	>512	>512	>512	>512	>512	>512
CIP ^e	>64	64	>64	>64	>64	>64

^a bakteria gram-ujemna; ^b bakteria gram-dodatnia; ^c oporny na wankomycynę szczep *E. faecium*; ^d oporny na metycylinę szczep *S. aureus*; ^e ciprofloksacyna (CIP)

Warto podkreślić, że aktywność zbadanych jonenów przeciwko MRSA (Tabela 5) jest niższa niż przeciwko *S. aureus* z ATCC (Rysunek 35). Biorąc pod uwagę odmienne mechanizmy działania antybiotyków β -laktamowych i jonenów, przypuszczam, że obserwowany spadek aktywności jonenów ma inne podłoże, niż mechanizm oporności na metycylinę. Może być to wynikiem odmiennej budowy ściany oraz składu błony komórkowej różnych szczepów bakterii tego samego gatunku.

Przedstawione wyniki potwierdzają, że zaobserwowana na bakteriach z ATCC (Rysunek 35) wyższa aktywności bardziej hydrofilowych jonenów (C0 vs C8) z bardziej elastycznym łańcuchem główny (TMEDA vs DABCO) ma odzwierciedlenie również w przypadku innych gatunków i szczepów bakterii. Podkreśla to istotność wniosków z poprzednich podrozdziałów mojej pracy - obok hydrofobowości grup bocznych należy uwzględniać także sztywność łańcucha głównego jonenów podczas planowania struktur nowych, aktywnych związków.

Badania przeprowadzone na najslabiej cytotoksycznych PEGylowanych jonenach C0-D-PEG-D i C2-D-PEG-D wykazały ich aktywność przeciwko siedmiu izolowanym klinicznie MRSA i jednym VRE (MIC 32 µg/mL), oraz brak aktywności wobec bakterii gram-ujemnym.

9.1.2.2 *Mycobacterium*

Wyniki badań nad aktywnością wybranych jonenów przeciwko *Mycobacterium* przedstawiłem w Tabeli 6. Oba jony C8, a także C0-T-p-T wykazują porównywalną aktywność wobec prątków gruźlicy (*M. tuberculosis*), natomiast C0-D-p-D działa słabiej na te mikroorganizmy. W przypadku aktywności wobec *M. terrae* oba polimery zawierające TMEDA w łańcuchu głównym (C0-T-p-T i C8-T-p-T) wykazują MIC na poziomie 8 µg/mL,

podczas gdy polikationy zawierając DABCO są słabiej aktywne. Natomiast wobec *M. avium* wszystkie zbadane związki wykazują brak lub bardzo słabą aktywność.

Tabela 6. Aktywność wybranych jonenów przeciwko prątkom.

Polimer	MIC (µg/mL)				
	<i>M. tuberculosis</i> H37RV	<i>M. tuberculosis</i> 210 (INH resistant)	<i>M. tuberculosis</i> 192 (INH susceptible)	<i>M. terrae</i>	<i>M. avium</i>
C0-D-p-D	32	64	64	16	512
C0-T-p-T	16	16	32	8	256
C8-D-p-D	16	16	32	32	>512
C8-T-p-T	16	16	32	8	>512
INH ^a	≤0.0625	2	≤0.0625	64	64
RMP ^b	0.5	16	0.5	4	32

^a izoniazyd; ^b ryfampicyna

Pierwszym wnioskiem płynącym z powyższych wyników jest fakt, że oktylowa grupa boczna (C8) nie pogarsza aktywności jonenów przeciwko *M. tuberculosis*, co jest zaskakujące w kontekście aktywności przeciwko innym badanym mikroorganizmom. Grupa C8 nie obniża również aktywności elastycznego polikationu zawierającego TMEDA (C0-T-p-T vs C8-T-p-T) wobec *M. terrae*, lecz działa negatywnie na aktywność usztywnionego polikationu z DABCO (C0-D-p-D vs C8-D-p-D). Negatywny wpływ usztywnienia cząsteczki widoczny jest również porównując aktywności jonenów C0-D-p-D z C0-T-p-T.

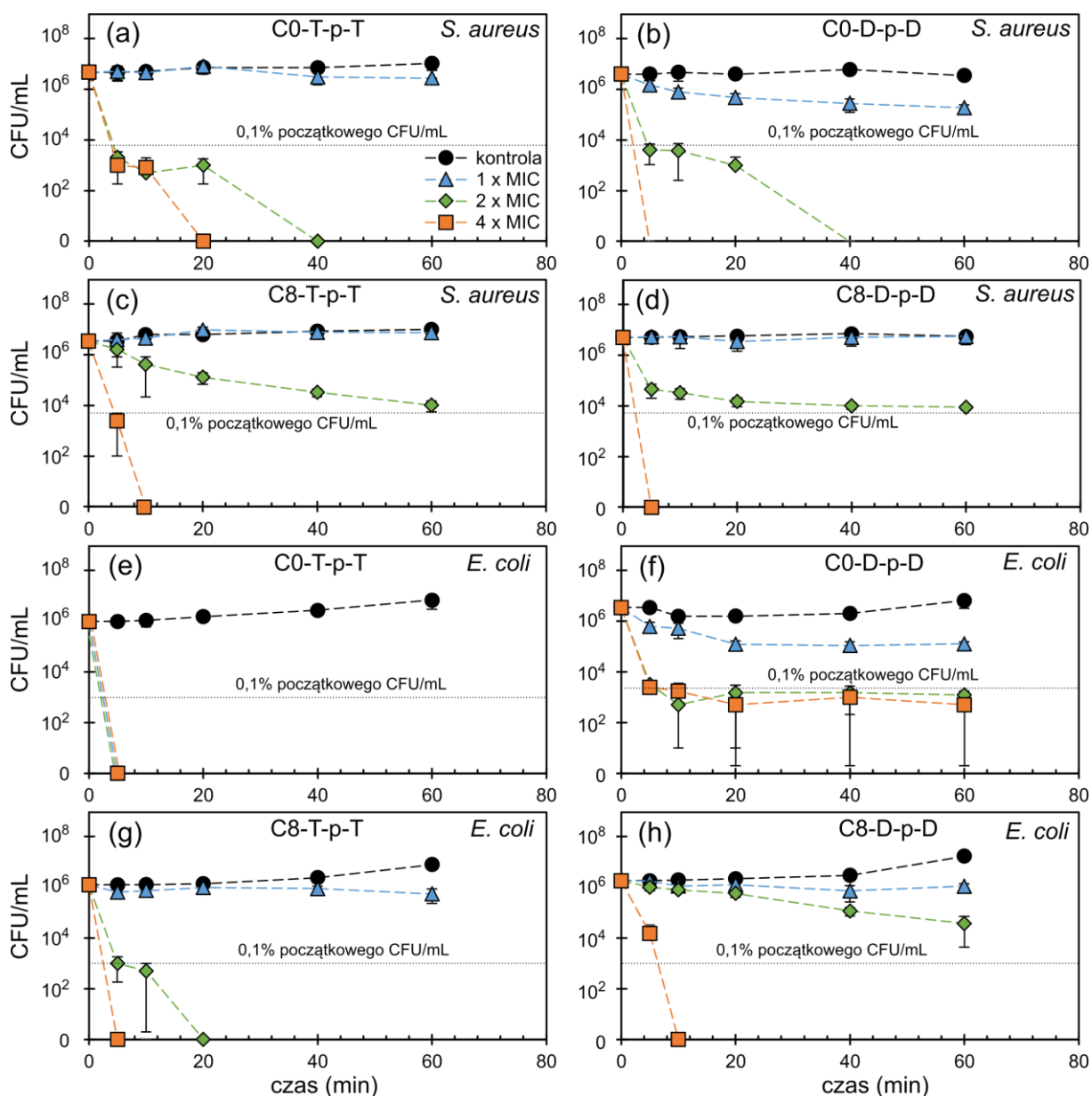
Możliwym podłożem odmiennego wpływu hydrofobowości jonenów na aktywność wobec prątków, w porównaniu do innych bakterii, jest różnica w strukturze ściany komórkowej. W przeciwieństwie do innych mikroorganizmów, które wykorzystałem podczas moich badań, zewnętrzna część ściany *Mycobacterium* składa się z kwasów mikołowych i zaadsorbowanych na nich lipidów nadających jej silnie hydrofobowy charakter.^{258,259} Cecha ta może ułatwiać migrację cząsteczek C8-T-p-T i C8-D-p-D do wewnętrznej błony komórkowej, lecz w żaden sposób nie daje się odnieść do wysokiej aktywności C0-T-p-T. W ramach mojej pracy nie sprawdziłem, czy badane jony wpływają na integralność błony komórkowej *Mycobacterium*. W literaturze również nie odnalazłem dowodów na ten typ mechanizmu w odniesieniu do innych polikationów oraz AMPs dla tej grupy mikroorganizmów. Głębsze badania nad mechanizmem działania SMAMPs wobec *Mycobacterium* dalece wykraczają poza zakres mojej rozprawy doktorskiej. Jednakże otrzymane dane eksperymentalne prowadzą do interesującej konkluzji, iż podczas planowania struktur jonenów aktywnych wobec prątkom

należy rozważać struktury o innej równowadze hydrofili-lipofilowej, niż prowadząc badania w kierunku aktywności na pozostałe mikroorganizmy.

9.1.3. Kinetyka zabijania bakterii *S. aureus* i *E. coli* z ATCC

W ramach mojej pracy zbadalem kinetykę zabijania *S. aureus* ATCC 6538 i *E. coli* ATCC 8739 przez wybrane jony. Do badań tych wytypowałem C0-T-p-T, C0-D-p-D, C8-T-p-T, C8-D-p-D, C2-D-m-D i C2-D-PEG-D, co umożliwiło mi zbadanie wpływu hydrofobowości, sztywności oraz grupy PEG na szybkość działania tych związków. Do sprawdzenia wpływu grupy PEG wybrałem jony z grupą etoksyłową ze względu na najniższą cytotoksyczność tego związku, omówioną w podrozdziale poświęconym biokompatybilności (Podrozdział 9.2.). Związek C2-D-PEG-D wykazał bardzo słabą aktywność wobec *E. coli* (Rysunek 35), w związku z czym badania kinetyczne nad wpływem oPEG'u przeprowadziłem tylko na bakterii *S. aureus*. Kinetykę zabijania bakterii oznaczyłem stosując polimery w stężeniach będących wielokrotnością MIC (1, 2, 4 x MIC). Wyniki badań nad wpływem hydrofobowości oraz sztywności przedstawiłem na Rysunku 39, natomiast wyniki dla wpływu grupy PEG przedstawiłem na Rysunku 40. Interpretując wyniki tych badań należy pamiętać, że wartości MIC są różne dla różnych polimerów wobec różnych mikroorganizmów (Rysunek 35).

W przypadku aktywności wobec *S. aureus* polimery C0-T-p-T, C8-T-p-T i C8-D-p-D w stężeniu 1 x MIC nie zmniejszają znacząco liczby jednostek tworzących kolonię (CFU, ang. *colony forming unit*) względem kontroli (Rysunek 39a, c i d), natomiast C0-D-p-D (Rysunek 39b) po 60 minutach redukuje CFU o 95%. W stężeniu 2 x MIC jony C0-T-p-T i C0-D-p-D już po 5 minutach inkubacji redukują CFU do poniżej 0,1% wartości początkowej (Rysunek 39a i b). Działanie jony C8 w tym stężeniu jest znacząco wolniejsze (Rysunek 39c - d), gdyż żywotność *S. aureus* spada do poziomu bliskiego 0,1% dopiero po upływie 60 minut. W stężeniu 4 x MIC wszystkie cztery polimery redukują żywotność *S. aureus* o 99,9% już po 5 minutach inkubacji.



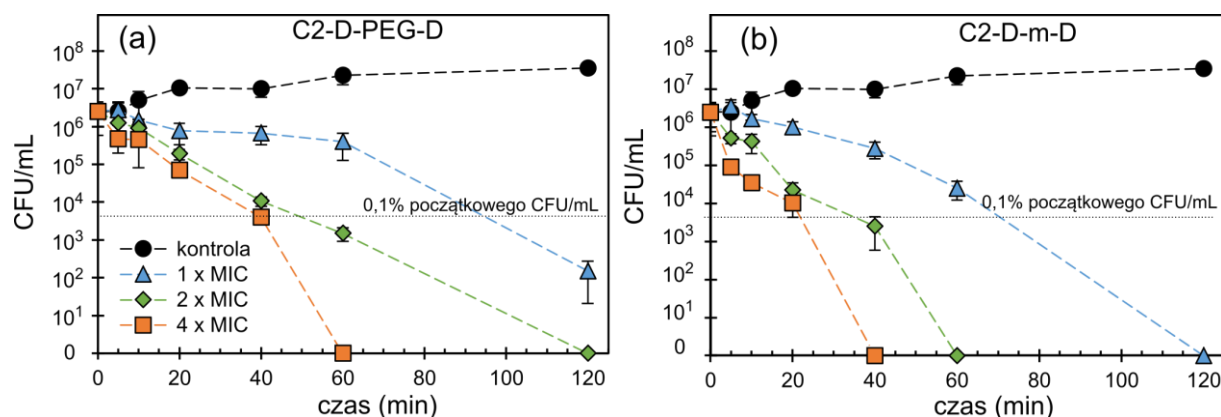
Rysunek 39. Kinetyka zabijania *S. aureus* (a-d) oraz *E. coli* (e-h) przez C0-T-p-T (a, e), C0-D-p-D (b, f), C8-T-p-T (c, g) i C8-D-p-D (d, h). Porównanie wpływu sztywności i hydrofobowości jonenów. Badania wykonano w pożywce wzrostowej MHB.

W przypadku aktywności wobec *E. coli* (Rysunek 39e-f) można zaobserwować, że jonen C0-T-p-T wykazuje bardzo silne i szybkie działanie bakteriobójcze. Już po 5 minutach inkubacji w stężeniu równym 1 x MIC wyeliminował wszystkie bakterie obecne w próbce (Rysunek 39e). Natomiast związek C0-D-p-D po 60 minutach inkubacji w stężeniu 1 x MIC zmniejsza CFU o ok 97%, a w stężeniach 2 i 4 x MIC po 5 minutach o ponad 99,9% (Rysunek 39f). W przeciwieństwie do jonenów C0, jony C8 wykazały tylko bakteriostatyczne działanie w stężeniu równym 1 x MIC (Rysunek 39g i h). W stężeniu 2 x MIC polimer C8-T-p-T po 5

minutach zabił ok. 99,9% bakterii, podczas gdy C8-D-p-D w tym samym stężeniu nawet po 60 minutach nie doprowadził do takiego efektu.

Można zauważyć, że jony bez hydrofobowej grupy bocznej (C0) wykazują szybsze działanie bakteriobójcze w stężeniu równym 2 x MIC w porównaniu z jonami z grupą oktoksylową (C8) (Rysunek 39). Jest to zgodne z wynikami przedstawionymi w Tabeli 4 z których wynika, że hydrofobowe jony (C8 i C12) wykazują działanie bakteriostatyczne, natomiast bardziej hydrofilowe (C0, C2 i C4) działanie bakteriobójcze. Analizując wyniki kinetyki zabijania pod kątem wpływu sztywności łańcucha głównego doszedłem do wniosku, że parametr ten wydaje się nie mieć znaczącego wpływu na aktywność wobec *S. aureus* (Rysunek 39a vs. b i c vs. d). Natomiast w przypadku aktywności wobec *E. coli* jony zawierające bardziej elastyczny linker TMEDA wykazały szybsze bakteriobójcze działanie w stężeniach bliższych wartości MIC niż polimery z DABCO (Rysunek 39e vs. f i g vs. h).

Wyniki kinetyki zabijania *S. aureus* przez C2-D-PEG-D i C2-D-m-D (Rysunek 40) wskazują, że dodatkowa grupa oPEG nie obniża znacząco szybkości bakteriobójczego działania. Oba polimery w stężeniu równym 1 x MIC po 120 minutach inkubacji obniżają CFU poniżej 0,1% wartości początkowej, a w stężeniu 2 x MIC efekt ten został osiągnięty po odpowiednio 60 i 40 minutach dla C2-D-PEG-D i C2-D-m-D. Wyniki te świadczą o fakcie, że MBC_{MHB} tych jonenów jest równe ich wartości MIC.



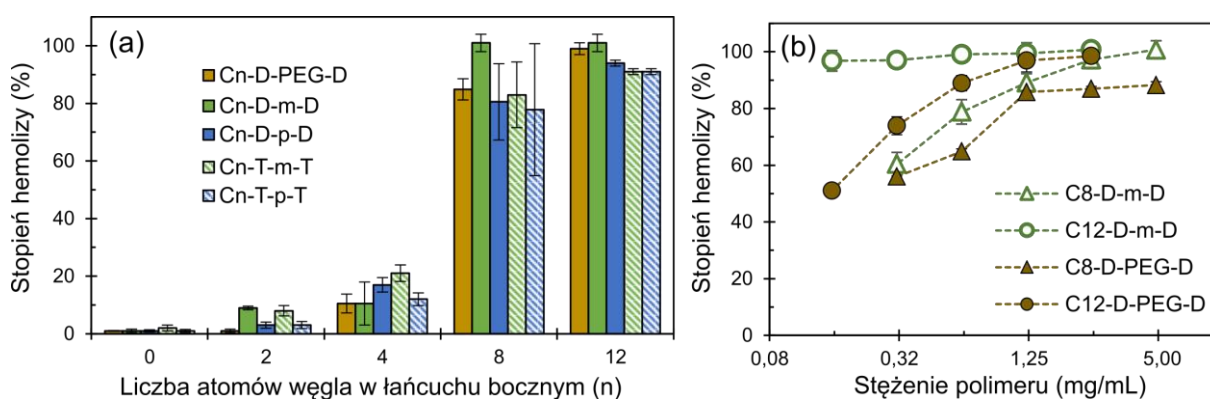
Rysunek 40. Kinetyka zabijania *S. aureus* w pożywce wzrostowej MHB. Porównanie wpływu dodatku grupy oPEG.

9.2. Badania biokompatybilności

9.2.1. Właściwości hemolityczne

Podstawowym testem służącym do wstępnej oceny biokompatybilności związków bakteriobójczych o błonowym mechanizmie działania jest oznaczenie właściwości hemolitycznych. Najpopularniejszym parametrem używanym do ilościowego porównania tych właściwości pomiędzy różnymi związkami jest HC_{50} .¹⁴ Jednakże ze względu na bardzo słabe właściwości hemolityczne względnie hydrofilowych jonenów,^{39,40,110} a także wyniki własnych wstępnych badań w tym kierunku, aktywność hemolityczna wszystkich z otrzymanych związków została zbadana tylko dla względnie wysokiego stężenia wynoszącego 5 mg/mL. Stężenie to jest kilkuset-krotnością średniej wartości MIC tych polimerów. Wyjątek stanowią jony C12, które zostały zbadane w stężeniu 2,5 mg/mL ze względu na ich słabszą rozpuszczalność w PBS pH 7,4, w którym przeprowadzone zostały oznaczenia.

Otrzymane wyniki (Rysunek 41a) wskazują, że tylko hydrofobowość jonenów wywiera zauważalny i systematyczny wpływ na ich właściwości hemolityczne. Najbardziej hydrofilowe związki nieposiadające alkoksylowego łańcucha bocznego (C0) powodują hemolizę na poziomie 1-2%, jony z grupą C2 na poziomie 3-10%, a z grupą C4 w zakresie 11-21%. Dalsze wydłużenie łańcucha alkilowego powoduje skokowy wzrost stopnia hemolizy - jony C8 powodują rozpad ok. 80% erytrocytów, a jony C12 niemal 100%. Pozostałe badane parametry strukturalne, tj. elastyczność i izomeria łańcucha głównego polimerów oraz dodatek hydrofilowej grupy oPEG, wydają się nie mieć wpływu na właściwości hemolityczne w stężeniu polimerów 5 mg/mL.



Rysunek 41. (a) Wyniki badań właściwości hemolitycznych otrzymanych jonenów w stężeniu 5 mg/mL (dla $n = 0, 2, 4, 8$) lub 2,5 mg/mL (dla $n = 12$); (b) zależność stopnia hemolizy od stężenia wybranych jonenów.

Silny wzrost właściwości hemolitycznych amfifilowych jonenów wraz ze wzrostem hydrofobowości cząsteczki jest spodziewanym efektem, który był już opisywany dla wielu innych typów polikationów.^{56,58,60,65,78,94,95,102,150,260} Błona komórkowa erytrocytów składa się głównie z PC, będących zwitterjonowymi lipidami, oraz niewielkiej ilości anionowych fosfolipidów (Rysunek 1). Z tego powodu cząsteczka polikationu bardzo słabo oddziałuje elektrostatycznie z powierzchnią erytrocytu i tylko związki o silnie hydrofobowych ugrupowaniach są w stanie zaburzyć strukturę dwuwarstwy lipidowej zbudowanej z PC.^{14,17}

W celu dokładniejszego poznania wpływu ugrupowania oPEG na właściwości hemolityczne jonenów zbadano także zależność stężeniową stopnia hemolizy polimerów C8-D-m-D, C12-D-m-D, C8-D-PEG-D oraz C12-D-PEG-D (Rysunek 41b). Otrzymane wyniki wskazują na obniżenie właściwości hemolitycznych jonenów z oPEG w porównaniu do analogów bez tej grupy. Stopień hemolizy indukowany przez C12-D-m-D utrzymuje się na stałym poziomie bliskim 100% wraz ze spadkiem stężenia polimeru do 160 µg/mL, podczas gdy jonen C12-D-PEG-D w tym samym stężeniu powoduje lizę ok. 50 % erytrocytów. W przypadku jonenów z grupą C8 różnice te są mniejsze, ale również widoczne w całym zakresie zbadanych stężeń. Zaobserwowany w ramach mojej pracy pozytywny wpływ na biokompatybilność, w kontekście hemolityczności, dodatkowej nienaładowanej hydrofilowej grupy, był również opisywany przez innych badaczy dla innych typów polikationów.^{71,73,100}

Intrygującą obserwacją jest odwrotność wpływu wydłużania alkilowego łańcucha bocznego jonenów na ich właściwości hemolityczne (Rysunek 41a) w porównaniu do wpływu na właściwości przeciwdrobnoustrojowe (Rysunki 35 i 36 oraz Tabela 4). Najaktywniejsze mikrobiologicznie jony C0 powodują najniższą hemolizę, natomiast jony C12 wykazujące najslabsze działania przeciwdrobnoustrojowe są jednocześnie najsilniej hemolityczne. W literaturze zostały opisane polikationy, których aktywność przeciwbakteryjna wykazuje paraboliczny przebieg wraz ze wzrostem hydrofobowości, podczas gdy właściwości hemolityczne rosną monotonicznie wraz z tym parametrem (Rysunek 17).^{57,78,94,102,260} Autorzy tych prac wyznaczyli w ten sposób optymalne HLB swoich polikationów pod kątem selektywności działania. Wyniki otrzymane w ramach mojej rozprawy prowadzą do wniosku, że optymalne pod kątem selektywności HLB jonenów jest osiągnięta już dla najbardziej hydrofilowych spośród zbadanych przeze mnie struktur.

9.2.2. Cytotoksyczność

9.2.2.1. Wpływ hydrofobowości serii Cn-T-p-T

Badania na linii komórkowej mysich fibroblastów L929 przy pomocy testu XTT całej serii Cn-T-p-T miały na celu zbadanie wpływu hydrofobowości na cytotoksyczność jonenów. W testach XTT używa się pożywki Eagle'a z modyfikacją Dulbecco (DMEM; ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) wzbogaconej o płodową surowicę bydlęcą (FBS; ang. *fetal bovine serum*) 10% v/v w celu symulowania warunków *in vivo*. Ze względu na zaobserwowany przeze mnie oraz innych badaczy spadek aktywności przeciwbakteryjnej amfifilowych polikationów w obecności pożywek wzrostowych MHB i SAB zawierających białka, postanowiłem przeprowadzić dodatkowe, porównawcze oznaczenia cytotoksyczności w środowisku bez dodatku FBS zawierającego znaczną ilość białek. Przedstawione wartości IC_{50} uzyskałem poprzez dopasowanie danych eksperymentalnych do równania Hill'a opisującego zależność dawka-odpowiedź (Podrozdział 4, równanie (1)). Dopasowanie przykładowych wyników do równania przedstawiłem w Punkcie 17.2.

Wartości IC_{50} otrzymane w oznaczeniach prowadzonych według standardowego protokołu z dodatkiem FBS mieszczą się w granicach 15,4 - 31,6 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 7). Najniższą cytotoksyczność wykazał jonen z grupą boczną C8, jednakże wynik ten jest trudny do interpretacji ze względu na znaczną ilość kłaczkowatego osadu powstałego po dodaniu FBS do roztworów jonenów C8 i C12-T-p-T. Wyniki oznaczeń bez dodatku FBS dały IC_{50} o niższej wartości mieszczącej się w przedziale od 9,6 do 16,1 $\mu\text{g/mL}$. Obserwowane różnice mogą być związane z silnym oddziaływaniem badanych jonenów z białkami znajdującymi się w FBS. Najwyższy wskaźnik selektywności, zdefiniowany jako stosunek IC_{50} do MIC, wykazał C0-T-p-T, którego wartość wynosi 5,1 w przypadku *E. coli* i 10,3 dla *S. aureus*. Wartości te są niestety zbyt niskie, aby polimer ten mógł być rozważany jako potencjalny nowy antybiotyk.

Tabela 7. Cytotoksyczność jonenów serii Cn-T-p-T wobec komórek linii L929 oznaczona metodą XTT w obecności FBS 10% v/v oraz bez FBS. Czas inkubacji 24 h.

Polimer	MIC ^a ($\mu\text{g/mL}$)		IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		Selektywność IC _{50,(+)FBS} / MIC	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	(+) FBS	(-) FBS	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
C0-T-p-T	4	2	20,5	9,6	5,1	10,3
C2-T-p-T	8	4	22,4	11,4	2,8	5,6
C4-T-p-T	8	4	22,7	16,1	2,8	5,7
C8-T-p-T	8	4	31,6	16,0	4,0	7,9
C12-T-p-T	32	32	15,4	13,9	0,5	0,5

^a wartości z Rysunku 35

Wyniki te potwierdzają, że nawet względnie hydrofilowe jony, które nie wykazują właściwości hemolitycznych, charakteryzują się bardzo silną cytotoksycznością. Brak korelacji pomiędzy wynikami oznaczeń hemolitycznych i XTT wynika z różnego charakteru testów. Test XTT dostarcza informacji o aktywności mitochondrialnej, podczas gdy aktywność hemolityczna o ilości hemoglobiny uwolnionej z erytrocytów. Badane jony hipotetycznie mogą wpływać na żywotność komórek poprzez uszkodzenie mitochondrium, co sugerowałoby wewnątrzkomórkowy mechanizm cytotoksyczności. Istotnym wnioskiem płynącym z tych wyników jest fakt, że rutynowe badania nad nowymi polikationowymi antybiotykami powinny być rozszerzane o badania cytotoksyczności, poza samymi testami hemolityczności.

9.2.2.2. Wpływ grupy oPEG

W celu sprawdzenia wpływu grupy oPEG na cytotoksyczność badanych jonów przeprowadziłem odpowiednie oznaczenia dla serii Cn-D-m-D oraz Cn-D-PEG-D. Wytypowałem do nich tylko polimery o grupach bocznych C0, C2 i C4 ze względu na niską aktywność hemolityczną (Rysunek 41a). Badania te wykonano według standardowego protokołu w pożywce DMEM z dodatkiem FBS 10% v/v.

Zbadane jony z serii Cn-D-m-D charakteryzują się IC_{50} w granicach 13 - 25 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 8), co jest wartością bliską IC_{50} serii Cn-T-p-T (Tabela 7). Natomiast PEGyłowane pochodne okazały się być mniej cytotoksyczne. Jony C0- i C2-D-PEG-D wykazały ponad 6-krotnie wyższe IC_{50} od swoich nie-PEGyłowanego odpowiedników. Dla jonenu C4 poprawa była tylko 2-krotna. W rozważaniu zastosowania polikationów, jako nowe antybiotyki, najważniejszym parametrem jest selektywność ich działania, której wzrost można zaobserwować dla gram-dodatniej bakterii *S. aureus*. Po wbudowaniu grupy oPEG selektywność jonenu C0 zwiększyła się 7,6-krotnie osiągając wartość 25,0, natomiast w przypadku C2 3-krotnie osiągając 18,8. Wartość MIC C0- i C2-D-PEG-D wobec MRSA wyniosła 32 $\mu\text{g/mL}$ (Punkt 9.1.2.1), co daje selektywność wobec tych bakterii odpowiednio 3,1 i 4,7. Selektywność wobec *E. coli* oraz *C. albicans* nie uległa poprawie po wbudowaniu oPEG, a jej wartość mieściła się w granicach odpowiednio 0,7-1,2 i 0,4-1,6.

Tabela 8. Wpływ grupy oPEG na cytotoksyczność jonenów wobec komórek linii L929 oznaczoną metodą XTT z dodatkiem 10% v/v FBS. Czas inkubacji 24 h.

Polimer	MIC ^a (µg/mL)			IC ₅₀ (µg/mL)	Selektywność IC ₅₀ / MIC		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
C0-D-m-D	16	4	32	13	0,8	3,3	0,4
C2-D-m-D	32	4	64	25	0,8	6,3	0,4
C4-D-m-D	32	4	64	23	0,7	5,8	0,4
C0-D-PEG-D	128	4	64	100	0,8	25,0	1,6
C2-D-PEG-D	128	8	128	150	1,2	18,8	1,2
C4-D-PEG-D	64	8	128	50	0,8	6,3	0,4

^a wartości z Rysunku 35

Wyniki te potwierdzają, że cytotoksyczność jonenów może zostać znacząco obniżona poprzez wbudowanie do ich struktury oligomerycznego fragmentu PEG oraz odpowiednią hydrofobowość grupy bocznej - najlepszą biokompatybilnością spośród zbadanych związków wykazał C2-D-PEG-D. Najwyższą selektywnością wobec *S. aureus* ATCC 6538 charakteryzował się C0-D-PEG-D, natomiast wobec MRSA wykazał C2-D-PEG-D. Na podstawie oznaczonych właściwości biologicznych można wyciągnąć wniosek, że struktury jonenów C0-D-PEG-D oraz C2-D-PEG-D stanowią dobry punkt wyjścia do dalszej optymalizacji aktywności jonenów jako SMAMPs.

W porównaniu z opublikowanymi do tej pory polikationami, C0-D-PEG-D i C2-D-PEG-D wykazują porównywalne lub lepsze połączenie wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej oraz umiarkowanej cytotoksyczności. Y. Xu i in. otrzymali polikationowe pochodne polikaprolaktanu modyfikowanego mannozą, który wykazywał bardzo niską cytotoksyczność i hemolityczność (żywotność komórek 88% po inkubacji z polimerem o stężeniu 200 µg/mL; HC₅₀ > 12.5 mg/mL), ale równocześnie stosunkowo niską aktywność wobec bakterii (np. MIC wobec *S. aureus* ATCC 29213 równy 64 µg/mL).¹⁸⁹ Innym przykładem są otrzymane przez E. H. H. Wong i in. gwieżdziste polikationy zawierające jednostki lizyny oraz glukozaminy, które również wykazały dobrą biokompatybilność (żywotność komórek 80% po inkubacji z polimerem o stężeniu 100 µg/mL; HC₅₀ > 10 mg/mL) przy umiarkowanej aktywności wobec bakterii gram-dodatnich (np. MIC równe 32 µg/mL, 32 µg/mL i 16 µg/mL przeciwko odpowiednio MRSA, *S. aureus* ATCC 29213 i *E. faecalis* OG1RF).¹⁷⁸ Natomiast poliwęglanowe jony otrzymane przez J. P. K. Tan i in. nie wykazały toksyczności wobec ludzkich fibroblastów w stężeniach do 1000 µg/mL przy jednoczesnym MIC wobec *S. aureus* ATCC 29737 równym 31 µg/mL.¹⁰⁴

10. Badania nad mechanizmem działania

Według obecnego stanu wiedzy mechanizm bakteriobójczego działania polikationów, w tym jonenów, opiera się głównie na zaburzeniu integralności błony komórkowej prowadzącym do zwiększenia jej przepuszczalności. W celu dokładniejszego zrozumienia opisanych w poprzednim rozdziale zależności struktura-aktywność przeprowadziłem badania mające na celu ocenę zdolności jonenów do interakcji z błoną komórkową, a w szczególności z dwuwarstwą fosfolipidową. W badaniach tych zastosowałem zarówno całe komórki bakterii *S. aureus* ATCC 6538 i *E. coli* ATCC 8739, jak i LUVs o składzie lipidowym odpowiadającym komórkom bakteryjnym oraz erytrocytom. Zastosowałem pochodne PC, PE i PG (Rysunek 2a) posiadające po jednej reszcie kwasu palmitynowego oraz oleinowego, oznaczone dalej jako odpowiednio POPC, POPE i POPG. Użyta przeze mnie CL, zawierająca cztery reszty kwasu oleinowego, oznaczona jest w dalszej części tekstu jako TOCL.

10.1. Badania na komórkach bakterii

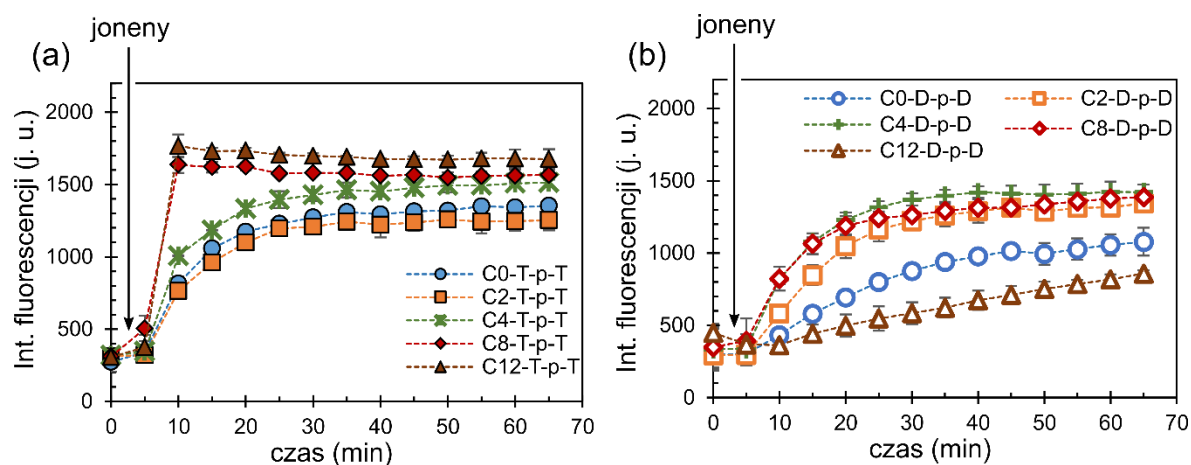
10.1.1. Depolaryzacja błony komórkowej *S. aureus*

Badania nad wpływem jonenów na polaryzację błony komórkowej *S. aureus* przeprowadziłem z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego DiSC₃(5). Depolaryzacja jest związana z migracją jonów, głównie kationów sodowych i potasowych, przez błonę komórkową. Zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej pociąga za sobą jej stopniową depolaryzację, co przejawia się wzrostem fluorescencji użytego barwnika. Metodę tę szerzej opisałem w Punkcie 5.1.1. Z pewnym przybliżeniem można przyjąć, że wzrost obserwowanej fluorescencji jest proporcjonalny do poziomu depolaryzacji błony komórkowej.^{25,140}

Do oznaczeń tych wytypowałem dwie serie jonenów - Cn-T-p-T i Cn-D-p-D - w celu sprawdzenia, czy względny poziom depolaryzacji indukowanej przez te związki koreluje z ich właściwościami przeciwbakteryjnymi wobec *S. aureus*. Zastosowałem stężenie polimerów wynoszące 1 µg/mL, które odpowiada MBC_{PBS} większości z polimerów z serii Cn-T-p-T (Tabela 4).

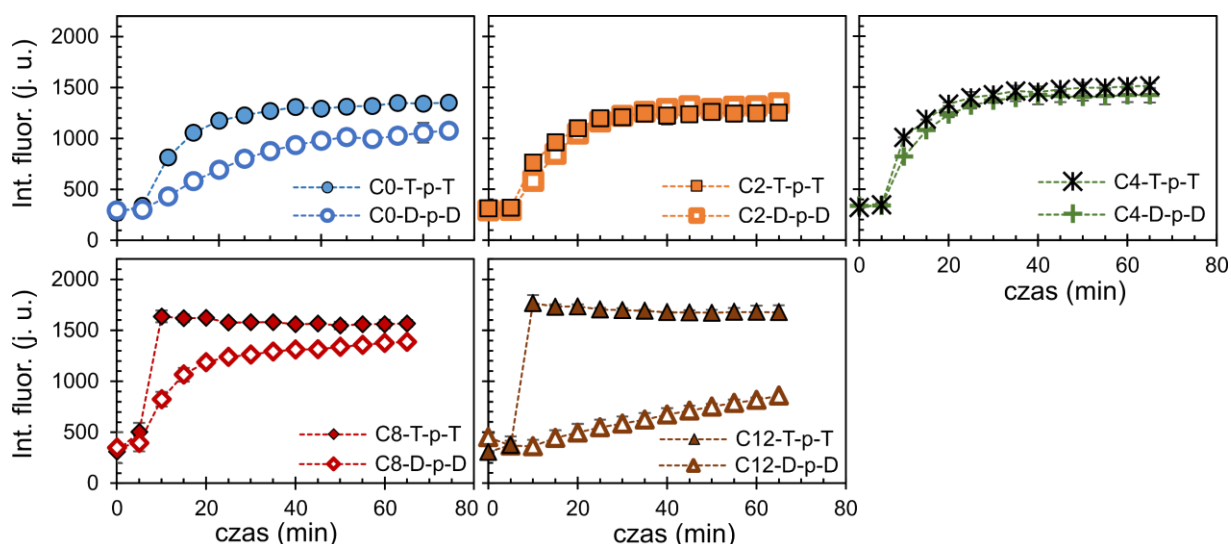
Zestawienie wyników, pozwalające porównać wpływ hydrofobowości na zdolność jonenów do depolaryzacji błony komórkowej przedstawiłem na Rysunek 42. W przypadku serii Cn-T-p-T najwyższy poziom depolaryzacji został osiągnięty dla C12-T-p-T, a najniższy dla C2-T-p-T. Natomiast MIC jonenu C0-T-p-T jest najniższy dla całej serii, dla jonenów C2, C4 i C8-T-p-T utrzymuje się na stałym poziomie, a dla C12-T-p-T jest znacznie wyższy (Rysunek 35). Wyniki te wskazują na brak korelacji pomiędzy MIC jonenów, a ich zdolnością do

depolaryzacji błony komórkowej. Dla serii Cn-D-p-D także można zaobserwować brak korelacji pomiędzy MIC, a depolaryzacją.



Rysunek 42. Badania depolaryzacji błony komórkowej *S. aureus* ATCC 6538 inkubowanego z jonenami (a) giętkimi lub (b) sztywnymi o stężeniu 1 $\mu\text{g/mL}$ w PBS w 37 °C przy pomocy barwnika DiSC₃(5). Strzałką zaznaczono moment dodania jonenu.

W celu porównania wpływu elastyczności łańcucha głównego wyniki przedstawione na Rysunek 42 zaprezentowałem w postaci Rysunek 43. Pary jonenu C2-T-p-T i C2-D-p-D oraz C4-T-p-T i C4-D-p-D wykazują bardzo zbliżoną kinetykę depolaryzacji błony komórkowej oraz takie same MIC wobec *S. aureus*. Natomiast wyniki dla pozostałych par polimerów wskazują na silniejszą i szybszą depolaryzację indukowaną przez polimery zawierające łącznik TMEDA (Cn-T-p-T), niż ich analogi z linkerem DABCO (Cn-D-p-D). Obserwacja ta jest zgodna z wyższą aktywnością przeciwko *S. aureus* jonenu C0, C8 i C12-T-p-T w porównaniu z odpowiednio C0, C8 i C12-D-p-D.



Rysunek 43. Badania depolaryzacji błony komórkowej *S. aureus* ATCC 6538. Powtórzenie wyników z Rysunek 42 w celu porównania wpływu elastyczności łańcucha głównego na depolaryzację.

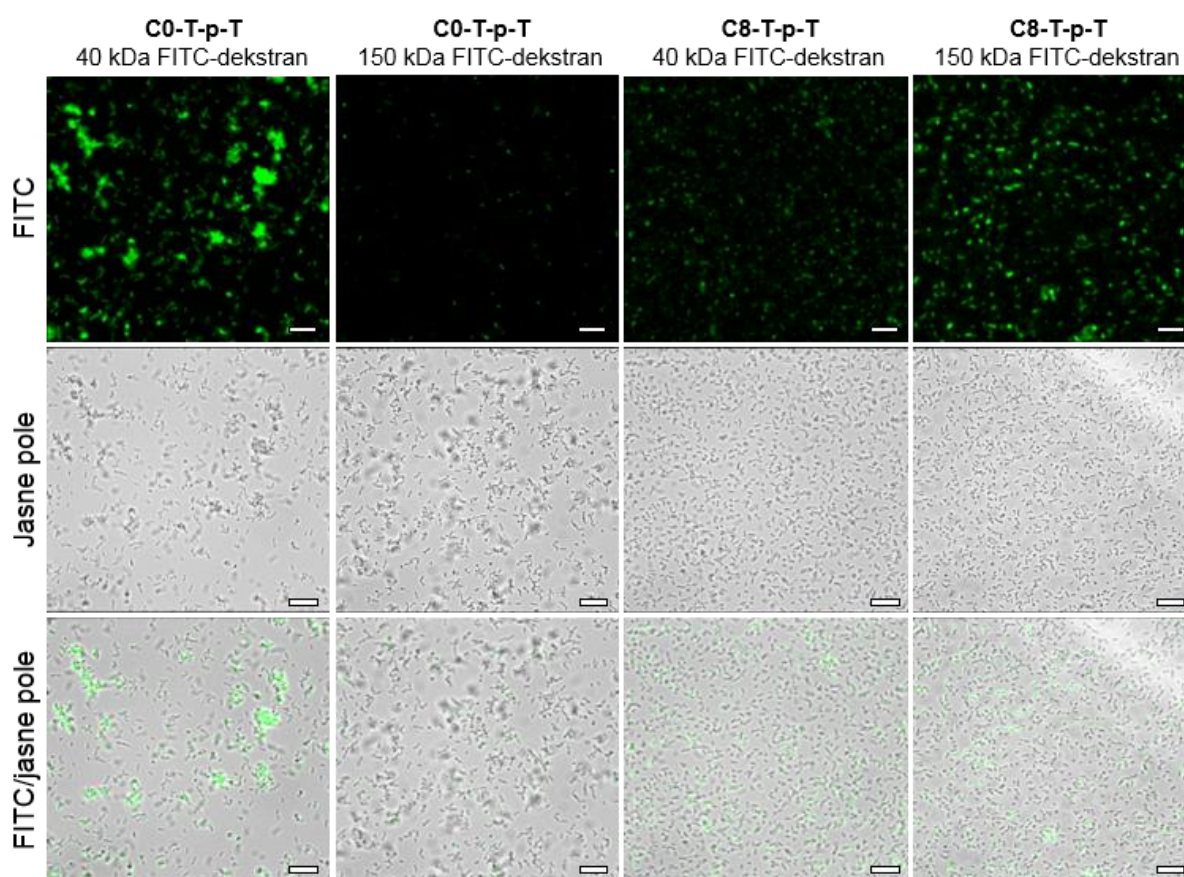
Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują na brak wyraźnej globalnej korelacji pomiędzy właściwościami przeciwbakteryjnymi jonenów, a ich zdolnością do indukowania depolaryzacji błony komórkowej. Pewnych logicznych korelacji można doszukać się porównując jony elastyczne (Cn-T-p-T) i usztywnione (Cn-D-p-D), jednakże różnica poziomów depolaryzacji dla polimerów C0 i C8 (Rysunek 43) wydaje się zbyt mała, żeby tłumaczyć różnice w aktywności przeciwbakteryjnej. Wyniki te mogą świadczyć o fakcie, że sama depolaryzacja błony komórkowej, będąca skutkiem uwolnienia kationów K^+ i Na^+ o niewielkiej średnicy hydrodynamicznej (0.12 - 0.20 nm),¹³⁹ nie jest procesem warunkującym aktywność przeciwko gram-dodatniej bakterii *S. aureus*.

10.1.2. Badania z wykorzystaniem FITC-dekstranu oraz fluorescencyjnego mikroskopu skaningowego

Aby zaobserwować zmiany przepuszczalności błony komórkowej *E. coli* ATCC 8739 indukowane przez hydrofilowy i hydrofobowy jonen, przeprowadziłem eksperymenty z FITC-dekstran o masie cząsteczkowej 40 i 150 kDa (Podpunkt 5.1.3.). Jako reprezentatywny przykład hydrofilowego oraz hydrofobowego jonenu użyłem odpowiednio C0-T-p-T i C8-T-p-T w stężeniu 16 $\mu\text{g/mL}$. Badania te polegały na inkubacji komórek bakterii z odpowiednim FITC-dekstranem i jonenem przez dwie godziny w PBS. Po tym czasie bakterie były przemywane kilkukrotnie świeżym PBS i oglądane pod mikroskopem fluorescencyjnym. Zastosowałem

stężenie bakterii 10^4 -razy większe od stężenia użytego w badaniach mikrobiologicznych, co umożliwiło mi wykonanie zdjęć mikroskopowych.

Po inkubacji bakterii z FITC-dekstranem bez dodatku jonenów (kontrola negatywna) nie zaobserwowałem fluorescencji w badanej próbce, co świadczy o całkowitym odmyciu barwnika. Natomiast po inkubacji bakterii z FITC-dekstranem i badanymi związkami, w próbce można było zaobserwować wyraźną fluorescencję doskonale ko-lokalizowaną z komórkami bakterii widzianymi w jasnym polu (Rysunek 44). Obserwacje te są związane z akumulacją FITC-dekstranu wewnątrz komórek bakterii, co świadczy o zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej *E. coli* dla dużych, hydrofilowych molekuł pod wpływem testowanych jonenów.



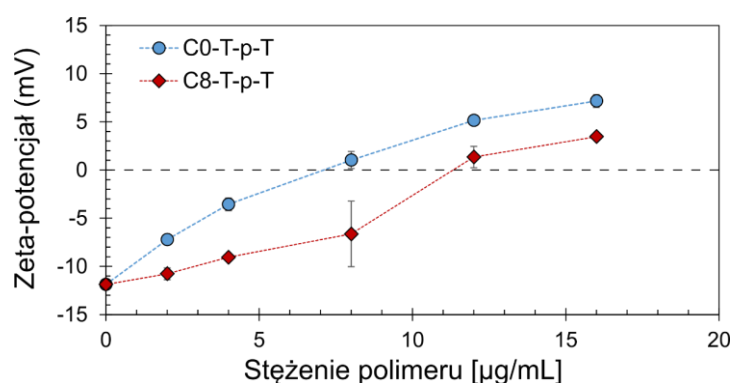
Rysunek 44. Zdjęcia mikroskopowe *E. coli* ATCC 8739 inkubowanej z FITC-dekstran o masie cząsteczkowej 40 kDa i 150 kDa (150 $\mu\text{g/mL}$) w obecności C0-T-p-T i C8-T-p-T (16 $\mu\text{g/mL}$) w PBS pH 7,4 w 37 $^{\circ}\text{C}$ przez 2 h. Pasek skali odpowiada 10 μm .

W przypadku inkubacji bakterii z jonenem C0-T-p-T silna fluorescencja obserwowana była tylko dla FITC-dekstranu o masie 40 kDa, podczas gdy dla masy 150 kDa świeciły tylko pojedyncze komórki. Natomiast po inkubacji z C8-T-p-T fluorescencja była widoczna zarówno dla FITC-dekstranu 40 kDa jak i 150 kDa. Wyniki te prowadzą do wniosku, że promień porów wytworzonych przez C0-T-p-T mieści się w zakresie 9 - 17 nm, co odpowiada FITC-dekstranowi o masach odpowiednio 40 kDa i 150 kDa, natomiast pory powstałe na skutek C8-T-p-T mają promień większy niż 17 nm. Ponadto, z przedstawionych zdjęć mikroskopowych z jasnego pola wynika, iż C0-T-p-T, w przeciwieństwie do C8-T-p-T, powoduje silną agregację komórek bakteryjnych.

10.1.3. Zmiana zeta-potencjału bakterii pod wpływem jonenów

Zaobserwowana agregacja *E. coli* (Rysunek 44) zainspirowała mnie do zbadania wpływu C0-T-p-T i C8-T-p-T na zeta-potencjał tych bakterii. Otrzymane wyniki, zaprezentowane na Rysunek 45, wskazują na skuteczniejszą neutralizację ujemnego potencjału powierzchni komórek przez C0-T-p-T niż C8-T-p-T.

Zależność ta może być wytłumaczeniem dla różnicy w zdolności do agregacji komórek bakteryjnych przez te dwa jony - neutralizując zeta-potencjał cząstek tworzących koloid prowadzi się do ich agregacji. Należy tutaj podkreślić, że nie jest możliwe bezpośrednie porównanie wyników mikroskopowych z zeta-potencjałem pod kątem stężeń polimerów. Badania przy pomocy DLS wymagały znacznie mniejszej gęstości zawiesiny bakterii niż badania mikroskopowe.



Rysunek 45. Zeta-potencjał komórek *E. coli* inkubowanych przez 1 h w PBS w 25 °C z wybranymi polimerami.

10.2. Badania na liposomach

Znacząca większość z proponowanych w literaturze mechanizmów działania biobójczego polikationów oraz AMPs dotyczy ich interakcji z fosfolipidowym fragmentem błony komórkowej – dwuwarstwą fosfolipidową. W ramach mojej rozprawy doktorskiej również zbadałem wpływ wybranych parametrów strukturalnych jonenów na ich oddziaływanie z samą dwuwarstwą, w nadziei na głębsze zrozumienie otrzymanych wyników biologicznych. Jako modelowe dwuwarstwy lipidowe mikroorganizmów i erytrocytów zastosowałem LUVs, które imitowały swoim składem lipidowym błony komórkowe bakterii oraz RBCs. Odpowiednikiem dwuwarstwy fosfolipidowej RBCs były liposomy złożone z POPC, a dwuwarstwy bakterii komercyjny ekstrakt lipidowy z *E. coli* (EcLE, ang. *E. coli Total Lipid Extract*). Ekstrakt ten, według informacji producenta, zawiera 57,5% PE, 15,1% PG, 9,8% CL oraz 17,6% niezidentyfikowanych substancji. Aby lepiej poznać i zrozumieć wpływ poszczególnych składników ekstraktu na podatność dwuwarstwy na działanie jonenów przeprowadziłem dodatkowe badania na liposomach o dobrze zdefiniowanym składzie lipidowym, mianowicie POPC/POPG 4/1, POPC/TOCL 4/1, POPE/POPG 4/1 i POPE/TOCL 4/1. Składy te były wykorzystywane już przez innych badaczy do symulowania składu dwuwarstwy fosfolipidowej komórek bakteryjnych.^{90,127,129,152,197}

10.2.1. Metodyka badań na liposomach.

Badania nad wpływem jonenów na przepuszczalność dwuwarstwy fosfolipidowej dla niskocząsteczkowych i hydrofilowych związków przeprowadziłem przy pomocy LUVs wypełnionych roztworem barwnika fluorescencyjnego – kalceiny (Rysunek 12). Stężenie zamkniętego w liposomach roztworu kalceiny wynosiło 40 mM. Jest to stężenie, przy którym barwnik wykazuje samo-wygaszenie fluorescencji (ang. *self-quenching*). Uszkodzenie dwuwarstwy stanowiącej LUVs powoduje wyciek kalceiny z ich wnętrza, rozcieńczenie barwnika i w konsekwencji wzrost fluorescencji. Aby poznać intensywność fluorescencji odpowiadającej całkowitemu uwolnieniu barwnika (kontrola pozytywna, 100% wypływ kalceiny) potraktowałem LUVs roztworem Tritonu-X100, natomiast spontaniczną ucieczkę barwnika (kontrola negatywna, 0% wypływu kalceiny) zmierzyłem poprzez inkubację LUVs w samym PBS pH 7,4. W Podpunkcie 16.2. niniejszej rozprawy przedstawiłem zależność wykorzystaną do obliczenia względnego wypływu kalceiny w czasie, a także przykładowe wykresy ilustrujące zastosowaną transformację wyników.

Adsorpcję jonenów na powierzchni dwuwarstwy fosfolipidowej zbadałem poprzez pomiar zeta-potencjału LUVs inkubowanych z polimerami przy pomocy DLS (Rysunek 13).

Pomiary te pozwoliły mi również na sprawdzenie w jakim stopniu jony wpływają na agregację liposomów.

10.2.1.1. Przygotowanie i charakterystyka LUVs

Liposomy o średnicy ok. 100 nm przygotowałem poprzez ekstruzję wodnej zawiesiny wielowarstwowych liposomów (MUV, ang. *multi-lamellar vesicles*) przez filtr membranowy o średnicy porów 100 nm. Do badań za pomocą DLS zawiesina ta została otrzymana poprzez uwodnienie filmu lipidowego w roztworze PBS pH 7,4, natomiast do badań z wykorzystaniem kalceiny film uwodniłem 10 mM buforem fosforanowym o pH 7,4 zawierającym 40 mM kalceiny. Do eksperymentów DLS roztwór LUVs został użyty bezpośrednio po ekstruzji, natomiast LUVs z kalceiną zostały oczyszczone z wolnego barwnika przy pomocy chromatografii wykluczenia.

Otrzymane LUVs scharakteryzowałem przy pomocy DLS określając ich średnicę hydrodynamiczną oraz zeta-potencjał (Tabela 9). Badania te wykazały bardzo zbliżony rozkład wielkości otrzymanych liposomów, których PDI było niższe niż 0,100. Zeta potencjał LUVs z POPC miał znacząco niższą wartość bezwzględną od liposomów symulujących błony komórkowe bakterii, których potencjał powierzchni mieścił się w granicach -17,1 do -24,3 mV. Charakterystyka liposomów z kalceiną oraz bez wykazała, że nie różnią się one znacząco pod kątem średnicy hydrodynamicznej, PDI ani zeta-potencjału.

Tabela 9. Charakterystyka badanych liposomów w PBS pH 7,4 przy pomocy DLS.

Skład liposomów	D_h^a (nm)	zeta-potencjał (mV)
POPC	$124,0 \pm 48,1$	$-5,0 \pm 2,3$
POPC/POPG 4/1	$132,0 \pm 45,3$	$-23,3 \pm 0,4$
POPE/POPG 4/1	$141,9 \pm 53,2$	$-19,7 \pm 0,7$
POPE/TOCL 4/1	$130,1 \pm 43,6$	$-17,1 \pm 0,8$
POPC/TOCL 4/1	$169,7 \pm 70,8$	$-17,3 \pm 2,0$
EcLE ^b	$131,5 \pm 44,0$	$-24,3 \pm 0,5$

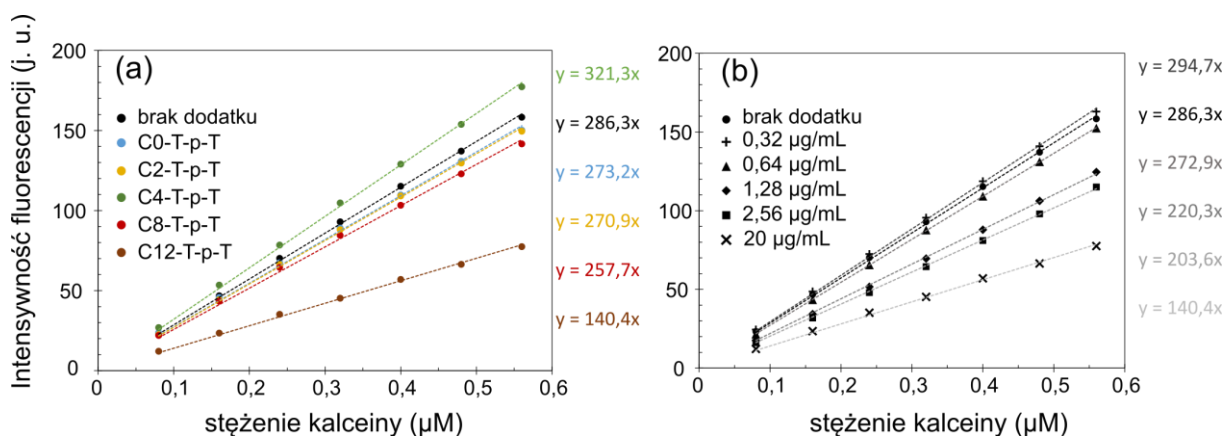
^a średnica hydrodynamiczna obliczona po intensywności rozpraszania; ^b komercyjny ekstrakt lipidowy z *E. coli* (EcLE, ang. *E. coli lipid extract*)

Wszystkie badania na liposomach przedstawione w niniejszej rozprawie, jeżeli nie zazaczyłem inaczej, wykonałem w PBS pH 7,4 w 25 °C stosując stężenie lipidów równe 7,6 mg/mL (10 µM zakładając masę molową lipidów równą masie POPC).

10.2.1.2. Wpływ badanych jonów na fluorescencję kalceiny

Kalceina zawiera w swojej strukturze sześć kwaśnych wodorów (grupy karboksylowe oraz fenole) i w warunkach prowadzonych przeze mnie badań występowała w postaci multiwalentnego anionu jako sól sodowa. Tego typu związki mogą tworzyć w roztworze wodnym silne pary jonowe z polikationami prowadzące do lokalnego zwiększenia stężenia barwnika i jego samowygaszenia.²⁶¹ Z drugiej strony, badania interakcji liposomów z polikationami są rutynowo prowadzone w PBS zawierającym chlorek sodu w stężeniu fizjologicznym, tj. ok. 130 mM. W tak wysokim stężeniu soli para jonowa polikation-kalceina jest rozdzielona, dzięki czemu wpływ większości polikationów opublikowanych przez innych badaczy na fluorescencję kalceiny jest pomijalnie mały. Jednakże, w celu uniknięcia potencjalnych błędów w interpretacji wyników sprawdziłem czy badane jony wpływają na właściwości fluorescencyjne tego barwnika w środowisku przeprowadzanych oznaczeń (PBS pH 7,4, 25°C).

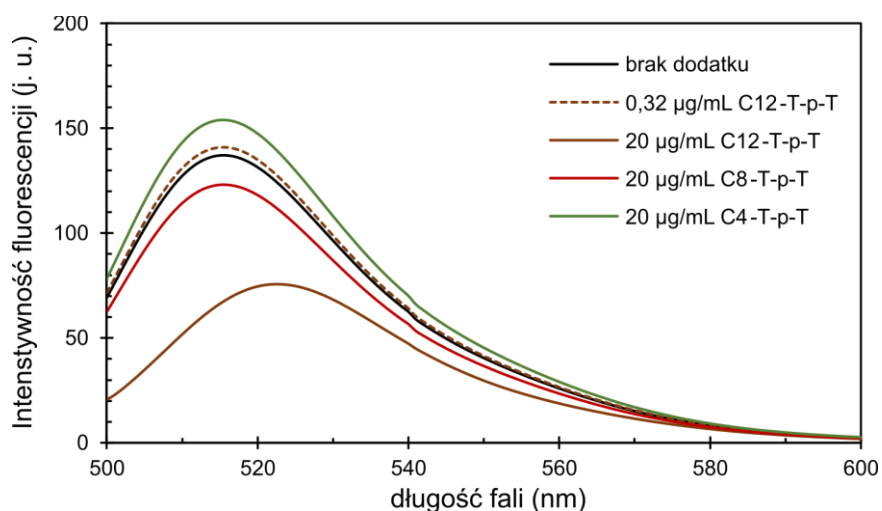
Krzywe wzorcowe dla kalceiny wykonane w samym PBS oraz z dodatkiem Cn-T-p-T w stężeniu 20 µg/mL wskazują na silne wygaszenie fluorescencji przez C12-T-p-T, oraz słabsze wygaszenie przez C8-T-p-T (Rysunek 46a). Dopiero w niskim stężeniu C12-T-p-T, równym 0,64 µg/mL, intensywność fluorescencji kalceiny osiąga 95% wartości dla samej kalceiny (Rysunek 46b).



Rysunek 46. (a) wpływ jonów z serii Cn-T-p-T w stężeniu 20 µg/mL oraz (b) jonenu C12-T-p-T w różnych stężeniach na fluorescencję kalceiny. Pomiary przeprowadzono w PBS pH 7,4 w temperaturze 25 °C, $\lambda_{\text{ex}}=490$ nm, $\lambda_{\text{em}}=515$ nm.

Widmo wzbudzeniowe kalceiny w obecności C12-T-p-T o stężeniu 20 µg/mL charakteryzuje się maksimum przesuniętym w kierunku czerwieni (Rysunek 47), co może świadczyć o agregacji barwnika prowadzącej do samowygaszenia.²⁶¹ Wynik ten nie jest

oczywisty, ponieważ ze względu na hydrofilowy charakter kalceiny jej akumulacja w hydrofobowym wnętrzu agregatów polimerowych jest bardzo mało prawdopodobna. Agregacja kalceiny przez hydrofobowy jonen może być związana ze specyficzną kombinacją oddziaływań hydrofobowych oraz elektrostatycznych, ale dokładne zgłębienie natury tego zjawiska wykracza poza zakres mojej rozprawy.



Rysunek 47. Widma emisyjne kalceiny o stężeniu $0,56 \mu\text{M}$ w PBS pH 7,4 w 25°C w obecności wybranych jonenów, $\lambda_{\text{ex}}=490 \text{ nm}$.

W celu uwzględnienia częściowego wygaszania fluorescencji kalceiny w obecności badanych jonenów zdefiniowałem współczynnik wygaszania (A) jako stosunek współczynnika kierunkowego krzywej wzorcowej samej kalceiny i krzywej otrzymanej dla kalceiny w obecności danego związku. Wyznaczone współczynniki A zestawilem w Tabeli 10. Wartości poniżej 1,10 nie uwzględniłem w obliczeniach jako pomijalnie mały wpływ na wynik końcowy. Do obliczenia procentowego wpływu kalceiny z LUVs pod wpływem jonenów wygaszających fluorescencję barwnika używałem zmierzonej wartości fluorescencji pomnożonej przez odpowiedni współczynnik A (Podpunkt 16.2).

Tabela 10. Współczynnik A dla zbadanych jonenów.

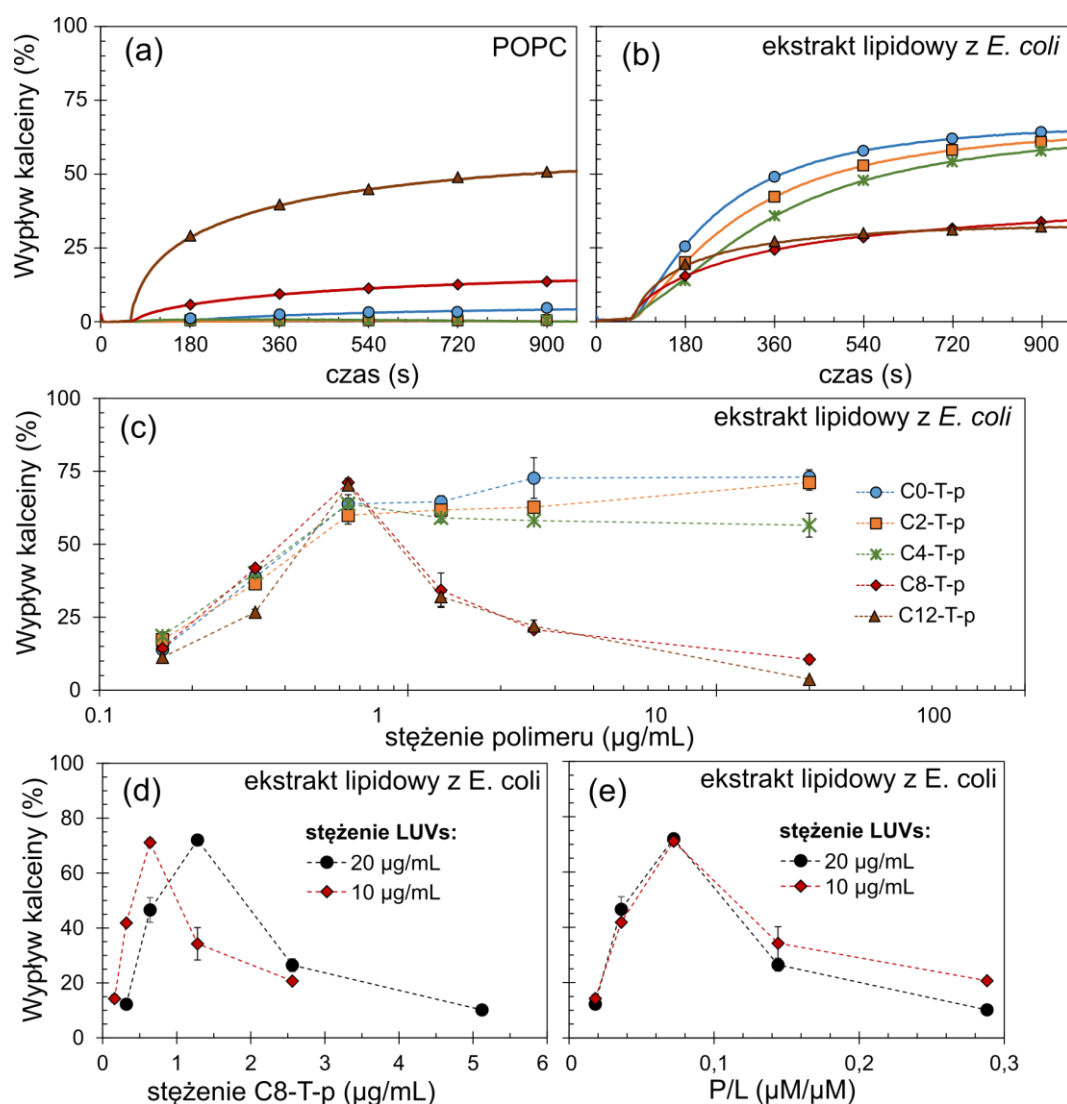
Polimer	Stężenie (µg/mL)	A
C12-T-p-T	20,00	2,04
	2,56	1,41
	1,28	1,30
C8-T-p-T	20,00	1,11
C8-D-m-D	2,56	1,32
	1,28	1,23
C8-D-PEG-D	2,56	1,19
	1,28	1,16

10.2.2. Wpływ hydrofobowości jonenów na oddziaływanie z liposomami

Aby poznać wpływ hydrofobowości jonenów na interakcję z dwuwarstwą fosfolipidową, co pomogłoby lepiej zrozumieć zaobserwowane trendy aktywności biologicznych (Rysunek 35, Rysunek 41, Tabela 4), przeprowadziłem badania nad jonenami z serii Cn-T-p-T.

10.2.2.1. Badania na liposomach z kalceiną

Wstępne badania wpływu jonenów Cn-T-p-T na integralność dwuwarstwy fosfolipidowej złożonej z POPC lub EcLE przeprowadziłem na odpowiednich LUVs z kalceiną stosując stężenie polimerów równe 1,28 µg/mL. Stężenie to jest zbliżone do wartości MBC_{PBS} tych związków wobec *E. coli*. W przypadku LUVs z POPC znaczący wyciek kalceiny zaobserwowałem tylko dla najbardziej hydrofobowych jonenów C8 i C12 (Rysunek 48a). Dwuwarstwa POPC, ze względu na zwitterionowy charakter fosfatydylocholiny, posiada tylko niewielki powierzchniowy ładunek ujemny (Tabela 9), co jest powodem słabego oddziaływania elektrostatycznego z jonenami. W związku z tym tylko względnie hydrofobowe jony mogą wbudować się w nią poprzez oddziaływania hydrofobowe prowadząc do zwiększenia jej przepuszczalności. Natomiast dla liposomów z EcLE zaobserwowałem odwrotny trend – bardziej hydrofilowe jony (C0, C2 i C4-T-p-T) powodują większy wyciek kalceiny od ich hydrofobowych odpowiedników (C8 i C12-T-p-T) (Rysunek 48b). Obserwacje te są zgodne z wynikami badań biologicznych – bardziej hydrofobowe jony są aktywniejsze wobec liposomów POPC oraz erytrocytów (Rysunek 41), podczas gdy hydrofilowe jony wykazały silniejszą aktywność wobec liposomów z EcLE oraz bakterii (Rysunek 35, Rysunek 36). Pomimo dobrej korelacji z wynikami biologicznymi zaobserwowany wzrost aktywności wobec liposomów z EcLE wraz ze spadkiem hydrofobowości polikationów jest wynikiem intrygującym na tle doniesień literaturowych.

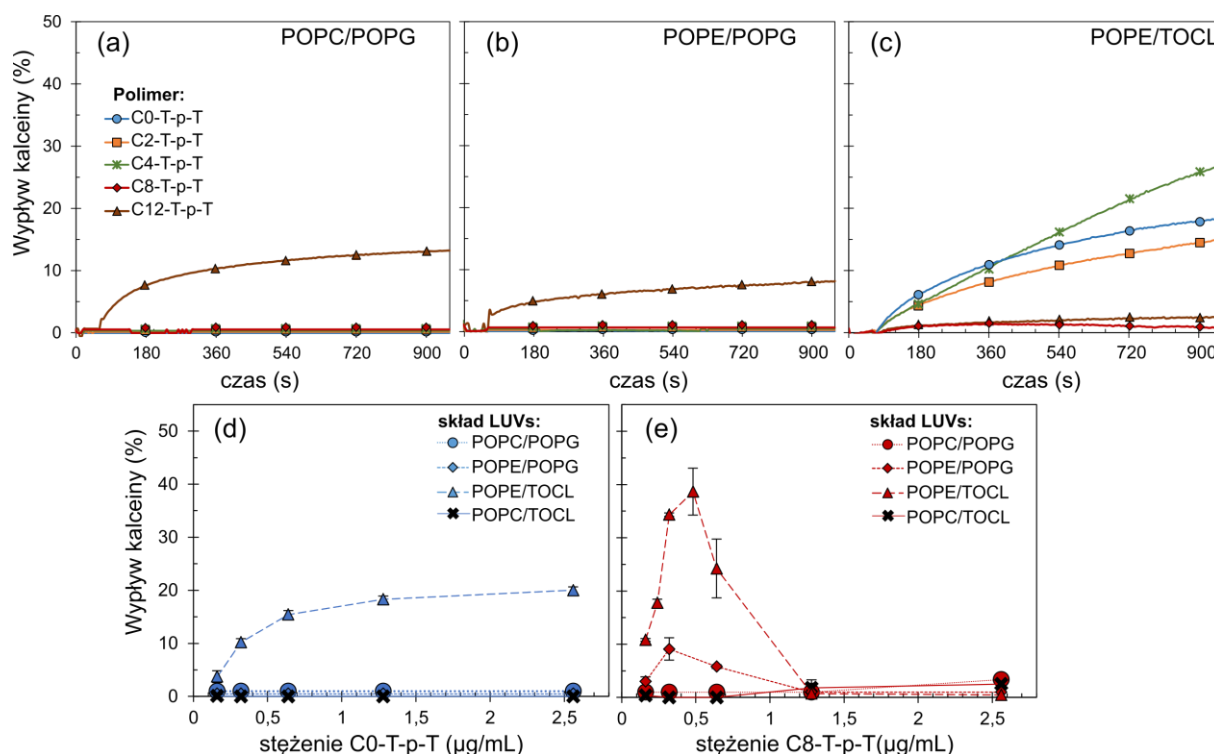


Rysunek 48. Wpływ kalceiny z LUVs (stężenie lipidów 7,6 $\mu\text{g/mL}$, ca. 10 μM) złożonych z (a) POPC i (b) EcLE inkubowanych z jonenami w stężeniu 1,28 $\mu\text{g/mL}$ (joneny dodano w 60 sekundzie); (c) wpływ kalceiny z LUVs złożonych z EcLE po 900 s inkubacji z jonenami w różnych stężeniach. Porównanie wypływu kalceiny w obecności C8-T-p-T dla różnego stężenia lipidów w (d) skali stężenia polimeru oraz (e) P/L (w przeliczeniu na liczbę jednostek powtarzalnych). Legenda w (c) obejmuje również (a) i (b). Znaczniki w (a) i (b) zostały dodane dla poprawienia czytelności i nie odpowiadają punktom eksperymentalnym, które były rejestrowane co 5 sekund.

Aby lepiej poznać charakter tej nieoczekiwanej zależności zbadalem w jaki sposób poziom wypływu kalceiny po inkubacji z jonenami zmienia się wraz ze stężeniem tych związków. Względna ilość uwolnionej kalceiny po 900 sekundach inkubacji w różnych stężeniach jonenów przedstawiłem na Rysunek 48c. Dla stężeń jonenów w zakresie 0,16 – 0,64 $\mu\text{g/mL}$ poziom wypływu kalceiny rośnie w podobny sposób wraz ze stężeniem dla wszystkich badanych związków. Inkubacja liposomów z jonenami C0, C2 i C4-T-p-T w stężeniu wyższym

niż 0,64 $\mu\text{g/mL}$ nie prowadzi do znaczącej zmiany wpływu kalceiny. Natomiast wraz ze wzrastającym stężeniem C8-T-p-T i C12-T-p-T zaobserwowałem nieoczekiwany spadek ilości uwolnionej kalceiny. W celu lepszego zrozumienia tego zjawiska zbadałem dodatkowo wpływ kalceiny pod wpływem C8-T-p-T stosując stężenie lipidów wynoszące 20 μM (Rysunek 48d). Otrzymane wyniki, zestawione z wynikami dla stężenia lipidów 10 μM w skali P/L (Rysunek 48e) w przeliczeniu na jednostkę powtarzalną polimerów, wykazały, że nieoczekiwane zmniejszenie poziomu wpływu kalceiny wraz ze zwiększaniem stężenia hydrofobowych jonenów jest związane z P/L, a nie z samych stężeniem jonenów. Na podstawie tych wyników postawiłem hipotezę, że jony C8 i C12-T-p-T dla P/L wyższego od ok. 0,08 pokrywają powierzchnię LUVs zbudowanych z EcLE zmniejszając tym samym ich przepuszczalność (uszczelnienie dwuwarstwy lipidowej).

Przedstawione powyżej obserwacje wydają się nieoczywiste w świetle istniejących doniesień literaturowych: (i) wysoka zdolność względnie hydrofilowych polikationów do zwiększenia przepuszczalności dwuwarstwy fosfolipidowej z EcLE, porównywalna z ich hydrofobowymi odpowiednikami, oraz (ii) spadek aktywności hydrofobowych jonenów wobec liposomów z EcLE powyżej pewnego P/L. Aby sprawdzić czy i w jaki sposób skład lipidowy dwuwarstwy fosfolipidowej wpływa na te efekty przeprowadziłem badania na liposomach o dobrze zdefiniowanym składzie fosfolipidowym (Tabela 9). Dla stężenia jonenów 1,28 $\mu\text{g/mL}$ nie obserwowałem znaczącego wpływu kalceiny z liposomów POPC/POPG i POPE/POPG dla niemal wszystkich związków z serii Cn-T-p-T poza C12-T-p-T (Rysunek 49a i b). Sytuacja uległa znaczącej zmianie po podmianie anionowego lipidu z POPG na TOCL. Najwyższy poziom wpływu kalceiny z liposomów POPE/TOCL zaobserwowałem dla względnie hydrofilowych jonenów C0, C2 i C4-T-p-T, natomiast bardziej hydrofobowe C8 i C12-T-p-T wykazują niemal zerową aktywność (Rysunek 49c).



Rysunek 49. Wpływ kalceiny z LUVs (stężenie lipidów 7,6 μg/mL, ca. 10 μM) złożonych z (a) POPC/POPG 4/1, (b) POPE/POPG 4/1 i (c) POPE/TOCL 4/1 inkubowanych z jonenami w stężeniu 1,28 μg/mL. Wpływ kalceiny z LUVs o różnym składzie lipidowym po 900 s inkubacji z (d) C0-T-p-T i (e) C8-T-p-T. Legenda w (a) obejmuje również (b) i (c). Znaczniki w (a-c) zostały dodane dla poprawienia czytelności i nie odpowiadają punktom eksperymentalnym, które były rejestrowane co 5 sekund.

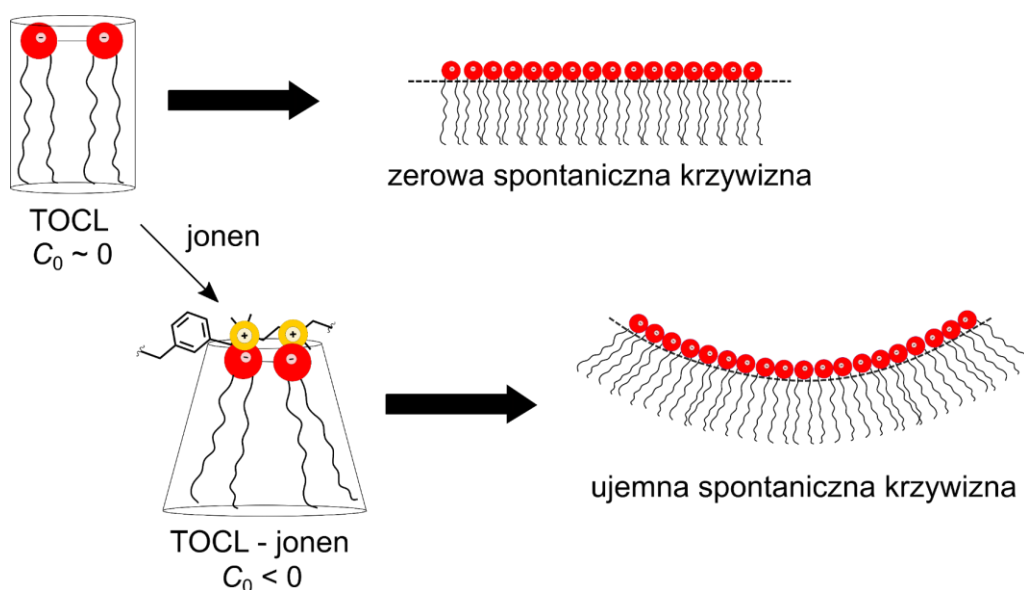
Badania zależności wypływu kalceiny z liposomów o zdefiniowanym składzie lipidowym od stężenia polimerów przeprowadziłem dla C0-T-p-T i C8-T-p-T, jako reprezentatywnych przykładów jonenów hydrofilowych oraz hydrofobowych. Polimer C0-T-p-T wykazuje aktywność tylko wobec liposomów z POPE/TOCL i aktywność ta rośnie wraz ze wzrostem stężenia tego związku (Rysunek 49d). Polimer C8-T-p-T (Rysunek 49e), podobnie do C0-T-p-T, również wykazuje najwyższą aktywność wobec liposomów POPE/TOCL, lecz zależność stężeniowa tej aktywności charakteryzuje się maksimum i ma przebieg zbliżony do obserwowanego dla LUVs z EcLE (Rysunek 48c). Aktywność C8-T-p-T wobec liposomów zawierających POPG, jako anionowy lipid zamiast TOCL, była znacząco niższa lecz także wykazywała zbliżony przebieg stężeniowy. Po zamianie zwitterionowego POPE, o ujemnej krzywiznie, na również zwitterionowy POPC o krzywiznie bliskiej zeru (Rysunek 2b i c), aktywność C8-T-p-T wobec takich LUVs znacząco spadła. Wpływ kalceiny

z liposomów z POPC/POPG i POPC/TOCL zaobserwowałem dopiero dla stężenia C8-T-p-T równego 20 $\mu\text{g/mL}$ i wynosił on odpowiednio 14% i 16% (dane nie pokazane na wykresach).

Wysoka podatność LUVs zawierających lipidy o ujemnej krzywiznie wewnętrznej na destabilizację przez peptydy przeciwbakteryjne oraz polikationy była już opisywana przez innych badawczy.^{25,124,262,263} Wyniki, które otrzymałem w ramach niniejszej rozprawy wskazują, że podobny efekt występuje również w przypadku jonenów. A. Stulz i wsp. wykazali wyższą podatność liposomów zawierających TOCL, w porównaniu z POPG, na działanie kationowych pochodnych polinorbornenu posiadających zwiększoną liczbę grup kationowych w jednostce powtarzalnej.¹²⁹ Analogiczne zachowanie zaobserwowano także dla AMPs.^{127,128} Wyniki te są zgodne z danymi otrzymanymi przeze mnie. Jest to przesłanką ku hipotezie, że hydrofilowe polikationy o gęsto rozmieszczonych grupach kationowych wzdłuż łańcucha polimerowego destabilizują dwuwarstwę fosfolipidową głównie poprzez oddziaływanie z kardiolipiną. W ramach mojej pracy (i) otrzymałem wyniki, które świadczą o kluczowym znaczeniu obecności TOCL w dwuwarstwie dla aktywności błonowej względnie hydrofilowych jonenów, oraz (ii) zaobserwowałem odmienny wpływ hydrofilowych i hydrofobowych jonenów na przepuszczalność dwuwarstwy zawierającej POPE w różnych warunkach P/L. W dwóch kolejnych akapitach przedstawiłem hipotezy wyjaśniające omówione wyniki eksperymentalne.

Kardiolipina jest dimerycznym, anionowym fosfolipidem składającym się z dwóch podjednostek kwasu fosfatydylowego połączonych poprzez cząsteczkę gliceryny (Rysunek 2a). Fosfolipidy te charakteryzują się niemal zerową krzywizną, która ulega przekształceniu w ujemną pod wpływem oddziaływania z biwalentnymi kationami metali (M^{2+}), jak np. Ca^{2+} i Mg^{2+} (Rysunek 3). Zmiana krzywizny tłumaczona jest poprzez formowanie się pary jonowej kardiolipina- M^{2+} (szerzej opisane w Podpunkcie 1.2.1.).²⁶⁻²⁸ Zjawisko to było przypisane przez innych badaczy zwiększeniu przepuszczalności dwuwarstwy złożonej z TOCL pod wpływem kationów Ca^{2+} i Mg^{2+} ,²⁸ a także zwiększeniu podatności takiej dwuwarstwy na działanie niskocząsteczkowych polikationów w obecności Ca^{2+} .²⁶⁴ Na podstawie wyników otrzymanych w ramach niniejszej rozprawy oraz doniesień literaturowych sformułowałem hipotezę mającą na celu wyjaśnienie mechanizmu działania hydrofilowych jonenów. W myśl tej hipotezy, hydrofilowe jony o dużej gęstości rozmieszczenia grup kationowych wzdłuż łańcucha głównego, np. C0-T-p-T, oddziałują z częścią hydrofilową TOCL w podobny sposób w jaki M^{2+} , tworząc kompleks TOCL-jonen charakteryzujący się ujemną krzywizną wewnętrzną (Rysunek 50). W konsekwencji listek dwuwarstwy fosfolipidowej bogatej w TOCL pod

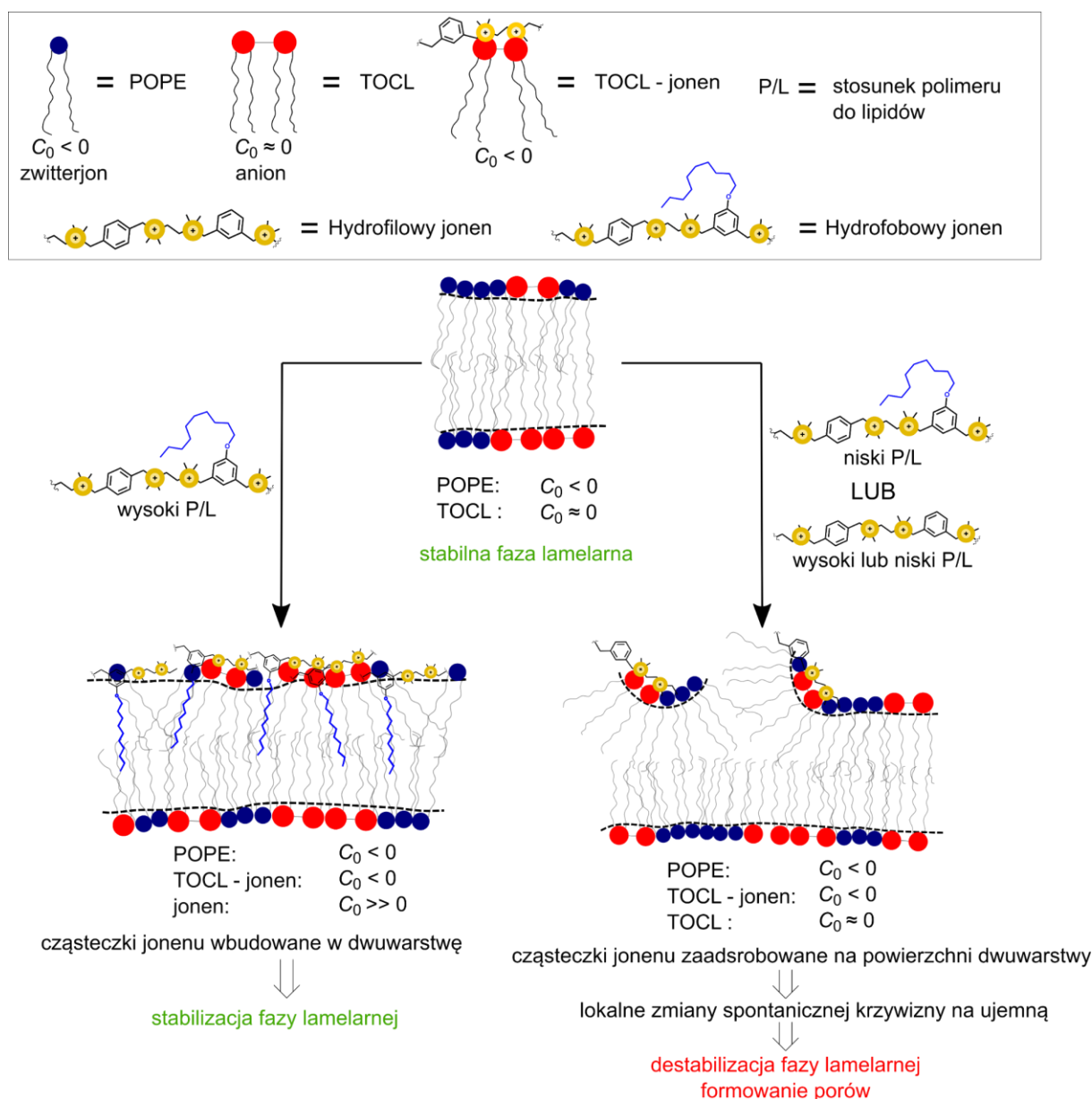
wpływem jonenów odgina się w kierunku fazy wodnej (ujemna spontaniczna krzywizna), prowadząc do destabilizacji fazy lamelarniej L dwuwarstwy i promowania odwrotnej fazy heksagonalnej H_{II} , co ostatecznie może doprowadzić do powstawania porów w poprzek dwuwarstwy. Argumentem przemawiającym za tą hipotezą jest brak aktywności C0-T-p-T wobec liposomów z POPC/TOCL, w przeciwieństwie do POPE/TOCL. Znaczna ilość POPC o zerowej krzywiznie stabilizuje fazę L dwuwarstwy pomimo obecności pewnej ilości kompleksu TOCL-jonen. Natomiast POPE o ujemnej krzywiznie nie może kompensować ujemnej krzywizny tego kompleksu.



Rysunek 50. Postulowany mechanizm działania hydrofilowych jonenów w oparciu o zmianę krzywizny wewnętrznej TOCL z zerowej na ujemną.

Zmniejszenie ilości uwolnionej kalceiny z liposomów zawierających POPE, po przekroczeniu pewnego P/L dla C8-T-p-T i C12-T-p-T, może wynikać z silnego oddziaływania tych jonenów z dwuwarstwą fosfolipidową prowadzącego do uszczelnienia liposomów. Zgodnie z tą hipotezą, hydrofobowe jony, w przeciwieństwie do hydrofilowych, mogą poza oddziaływaniem elektrostatycznym zakotwiczać się głęboko w hydrofobowym wnętrzu dwuwarstwy. Tego typu interakcje zostały wykazane w symulacjach metodami dynamiki molekularnej dla pochodnych poli(allilotrimetyloaminy).²⁶⁵ Rozważane tutaj hydrofobowe jony C8-T-p-T i C12-T-p-T posiadają znacznie rozbudowaną grupę hydrofilową w porównaniu z ich łańcuchem alkilowym, co sprawia, że mogą być traktowane jako surfaktanty o silnie dodatniej wewnętrznej krzywiznie. W myśl tych rozważań, takie polimery mogłyby stabilizować fazę lamelną kompensując ujemną krzywiznę wewnętrzną POPE, prowadząc do dwuwarstwy o zerowej spontanicznej krzywiznie (Rysunek 51). Podobny mechanizm

stabilizacji fazy lamelarniej dwuwarstwy fosfolipidowej był już proponowany dla niektórych peptydów przeciwdrobnoustrojowych.^{112,266} Rozważana stabilizacja dwuwarstwy wymaga odpowiednio wysokiego P/L (Rysunek 48), a co za tym idzie odpowiedniej ilości cząsteczek jonenu na powierzchni liposomu. Obserwowany próg P/L dla aktywności membranowej hydrofobowych jonenów można wytłumaczyć poprzez współistnienie dwóch efektów. Pierwszym jest działanie podobne do niskocząsteczkowych surfaktantów kationowych połączone z oddziaływaniem z TOCL, które ma miejsce dla niskiego P/L. Natomiast drugim, w wysokim P/L, rozważana kompensacja spontanicznej krzywizny dwuwarstwy. Względnie hydrofilowe jony C0, C2 i C4-T-p-T mogą oddziaływać tylko z hydrofilowymi fragmentami fosfolipidów, ze względu na brak odpowiednio hydrofobowej grupy bocznej, i nie są w stanie wejść do hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy. W związku z tym nie następuje kompensacja ujemnej krzywizny wewnętrznej POPE i kompleksów TOCL-jonen, co objawia się jako brak spadku aktywności membranowej dla wysokiego P/L. Brak efektu stabilizacyjnego w przypadku liposomów zawierających głównie POPC, o zerowej krzywiznie wewnętrznej, potwierdza hipotezę, że podstawą tego zjawiska jest kompensacja ujemnej krzywizny wewnętrznej.



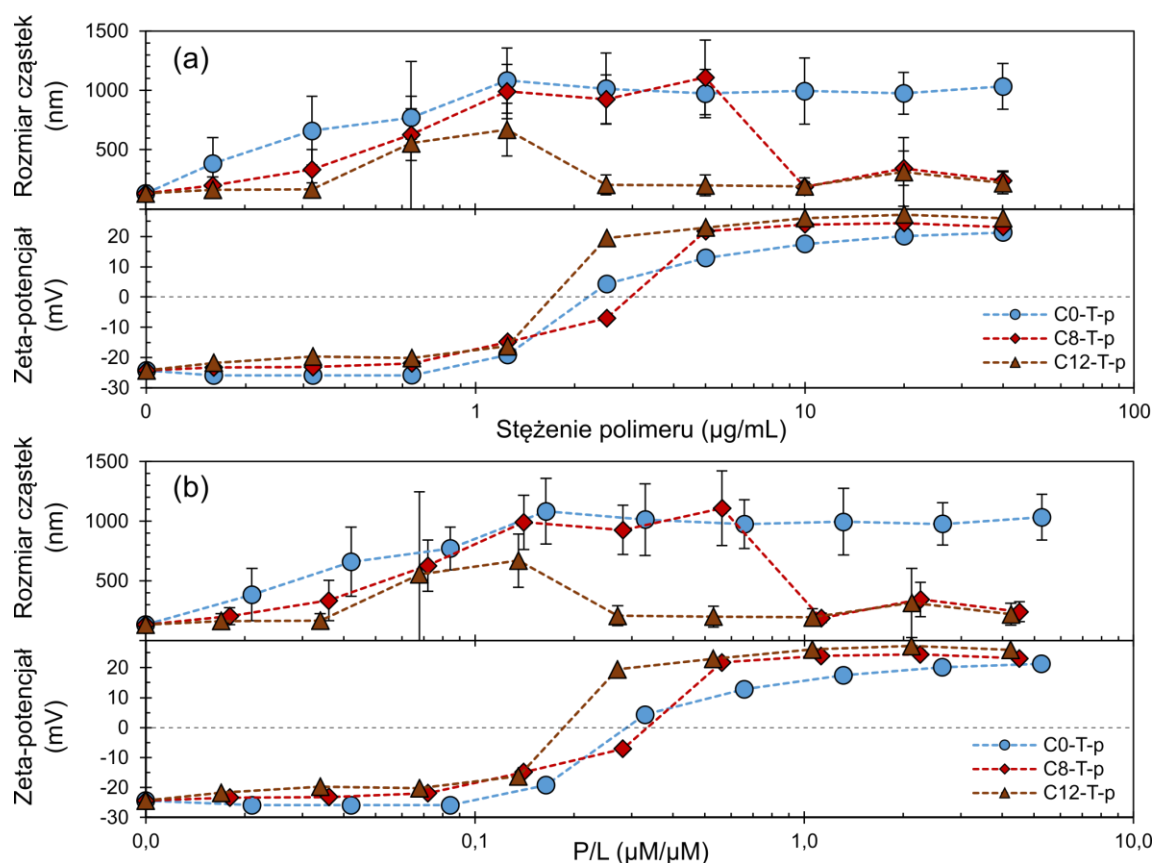
Rysunek 51. Wizualizacja proponowanego wytłumaczenia obserwowanej stabilizacji liposomów, na przykładzie dwuwarstwy złożonej z POPE/TOCL 4/1, przez hydrofobowe jony dla wysokiego P/L.

10.2.2.2. Badania na liposomach z wykorzystaniem DLS

Wykorzystując technikę DLS sprawdziłem wpływ hydrofilowego jonenu C0-T-p-T oraz dwóch hydrofobowych jonów C8-T-p-T i C12-T-p-T na zeta-potencjał i średnicę hydrodynamiczną LUVs. Aby zminimalizować zmiany próbki w czasie następujące w trakcie wykonywania pomiarów DLS, pomiary wykonałem po 2-godzinnej inkubacji LUVs z jonenami w PBS pH 7,4 w 25 °C. Rozmiar cząstek w całej rozprawie przedstawiłem jako średnicę hydrodynamiczną obliczoną z danych intensywności rozpraszania światła. Dla większości

wykonanych pomiarów obserwowałem mono-modalny rozkład wielkości cząstek (część przykładowych surowych danych przedstawiłem jako Załącznik 3), natomiast dla rozkładów bimodalnych przedstawiłem tylko dane dla pików o większej intensywności. Słupki błędów na wykresach rozmiaru cząstek odpowiadają szerokości dystrybucji średnicy hydrodynamicznej, natomiast na wykresach zeta-potencjału odpowiadają odchyleniu standardowemu dla trzech pomiarów. Słupków błędów mniejszych niż znaczniki punktów eksperymentalnych nie przedstawiłem.

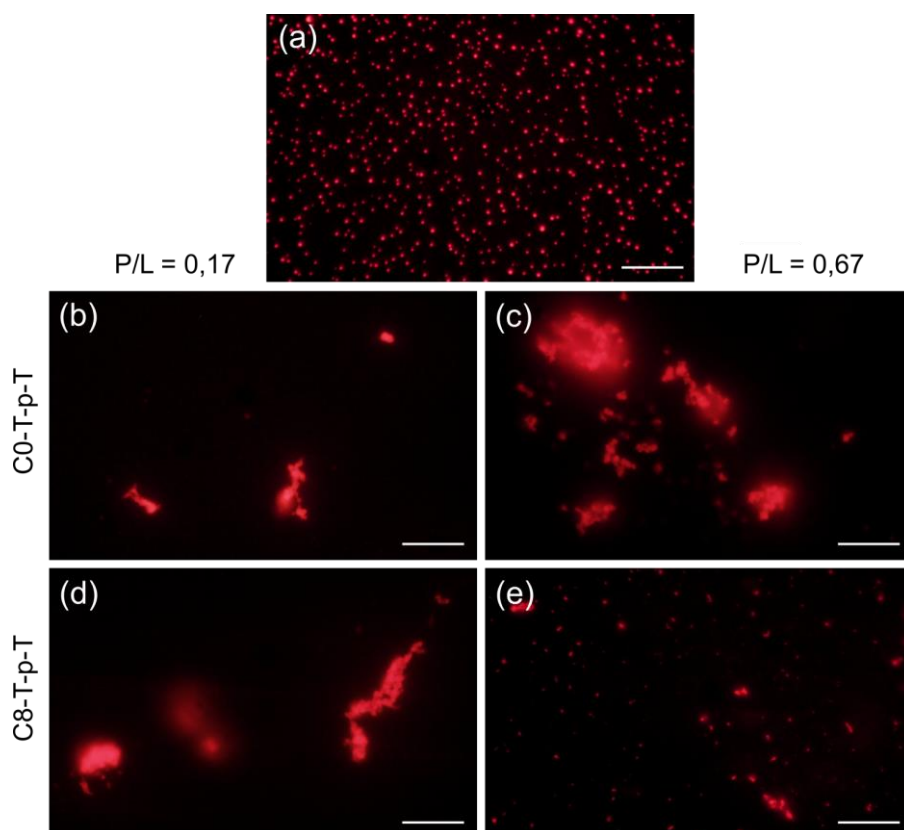
Średnica hydrodynamiczna liposomów z EcLE po inkubacji z C0-T-p-T wzrasta wraz ze wzrostem stężenia tego polimeru, aż do 1,28 $\mu\text{g/mL}$, osiągając ok. 1000 nm (Rysunek 52a). Dalszy wzrost stężenia nie wpływa znacząco na rozmiar cząstek w całym badanym zakresie stężeń (do 40 $\mu\text{g/mL}$). Joneny C8 i C12-T-p-T również indukują wzrost rozmiaru cząstek wraz ze wzrostem stężeniem polimeru, lecz po przekroczeniu pewnego progowego stężenia następuje spadek rozmiaru cząstek do wartości bliskiej początkowej. Próg ten wynosił 1,28 $\mu\text{g/mL}$ i 5,12 $\mu\text{g/mL}$ dla odpowiednio C12-T-p-T i C8-T-p-T. Zmiany zeta-potencjału wraz ze stężeniem jonenów mają ogólnie zbliżony przebieg dla wszystkich badanych związków. Zeta-potencjał LUVs z C12-T-p-T w stężeniu 2,56 $\mu\text{g/mL}$ oraz z C8-T-p-T w stężeniu 5,12 $\mu\text{g/mL}$ osiąga silnie dodatnie wartości wynoszące ok. 20 mV. Zależność zeta-potencjału LUVs w funkcji stężenia C0-T-p-T charakteryzowała się najbardziej łagodnym przebiegiem. Wartość 20 mV zostaje osiągnięta dopiero w 40 $\mu\text{g/mL}$ C0-T-p-T. Te same wyniki przedstawiłem w skali P/L na Rysunek 52b. Jonen C12-T-p-T zmieniał zeta-potencjał lipidów na dodatni przy P/L w zakresie 0,14 - 0,27, C8-T-p-T w zakresie 0,28 - 0,56, a C0-T-p-T w zakresie 0,16 - 0,33. Wartości te zgrubnie odpowiadają zawartości anionowych fosfolipidów w zastosowanym ekstrakcie lipidowym *E. coli*, wynoszącym ok 25% w/w. Wynik ten prowadzi do roboczej hipotezy o stechiometrii oddziaływania. Jedna jednostka powtarzalna jonenów, zawierająca cztery grupy kationowe, oddziałuje z jedną cząsteczką anionowego fosfolipidu.



Rysunek 52. Rozmiar cząstek jako średnica hydrodynamiczna, oraz zeta-potencjał LUVs (stężenie lipidów 7,6 µg/mL, ca. 10 µM) zbudowanych z EcLE po 2-godzinnej inkubacji z wybranymi jonenami w PBS pH 7,4 w 25 °C; (a) wyniki w skali stężenia polimeru, (b) wyniki w skali P/L. Uzyskane dystrybucje wielkości cząstek stanowią Załącznik 3.

Zaobserwowana agregacja LUVs przez hydrofilowy C0-T-p-T w środowisku o wysokim stężeniu soli ($C_{NaCl} = 130 \text{ mM}$) oraz brak zdolności do stabilizacji LUVs w wysokim P/L nie są oczywistymi wynikami. W związku z tym postanowiłem zweryfikować, czy wyniki otrzymane przy pomocy DLS nie są artefaktem wynikającym ze zdolności C0-T-p-T do rozpraszania światła. W tym celu przygotowałem LUVs barwione przy pomocy czerwieni nilu, która jest silnie hydrofobowym barwnikiem fluorescencyjnym lokującym się w hydrofobowym wnętrzu dwuwarstwy fosfolipidowej. Eksperymenty przeprowadziłem w sposób analogiczny do badań DLS, mianowicie barwione LUVs inkubowałem przez 2 h z C0-T-p-T i C8-T-p-T w P/L równym 0,17 i 0,67. W badaniach tych zastosowałem ok. 80 razy większe stężenie lipidów niż w badaniach DLS w celu uzyskania gęstości obserwowanych obiektów odpowiedniej dla mikroskopii. Zdjęcia preparatów po inkubacji z C0-T-p-T potwierdzają agregację liposomów dla obu testowanych wartości P/L (Rysunek 53). Inkubacja z C8-T-p-T stosując P/L równe 0,17 również doprowadziła do powstania widocznych dużych agregatów, podczas gdy zastosowanie

P/L równego 0,67 doprowadziło do powstania znacznie mniejszych agregatów wokół których widoczne są cząstki o rozmiarach zbliżonych do samych LUVs. Obserwacje te potwierdzają wiarygodność wyników otrzymanych przy pomocy DLS. Powstające aglomeraty liposomów z jonenami są heterogeniczne pod względem rozmiarów i kształtów, oraz na ile pozwoliła stwierdzić rozdzielczość mikroskopu, cechują się ziarnistą strukturą.



Rysunek 53. Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe liposomów (stężenie lipidów 625 $\mu\text{g/mL}$, ca. 820 μM) z EcLE barwionych czerwienią nilu (a) przed inkubacją z jonenami oraz po inkubacji z (b, c) C0-T-p-T lub (d, e) C8-T-p-T w PBS pH 7,4 w 25 $^{\circ}\text{C}$ stosując P/L równe (b, d) 0,17 lub (c, e) 0,67. Pasek skali odpowiada 10 μm .

Dyskutowane wyniki jednoznacznie świadczą o zdolności obu badanych polimerów do agregacji liposomów w P/L bliskim punktowi izoelektrycznemu, a także stabilizacji LUVs przez C8-T-p-T w wysokim P/L oraz braku takiej zdolności w przypadku C0-T-p-T. Silniejszą zdolność do agregacji liposomów przez bardziej hydrofilowe polikationy, w porównaniu do ich hydrofobowych analogów, zaobserwowali również inni badacze dla pochodnych nylonu-3¹¹²

oraz kationowych peptydów penetrujących błony komórkowe.²⁶⁶ Jednakże w przytoczonych pracach wyniki te nie były szerzej przedyskutowane.

Amfifilowe polikationy zawierające silnie hydrofobowe grupy adsorbują na powierzchni liposomów neutralizując ładunek ich powierzchni. Prowadzi to do destabilizacji układu koloidalnego i formowania się agregatów. W odpowiednio wysokim P/L, gdy odpowiednio dużo cząsteczek polikationu zaadsorbuje na powierzchni liposomów, ładunek ten staje się silnie dodatni i koloidalna zawiesina liposomów staje się ponownie stabilna (Rysunek 13).^{161,162,165} Badane przeze mnie jony C8 i C12-T-p-T również wykazują takie właściwości (Rysunek 52). Warto zauważyć, że obserwowana zdolność C0-T-p-T do agregacji liposomów naśladujących błonę komórkową *E. coli*, w szerokim przedziale P/L, doskonale odzwierciedla agregację komórek *E. coli* indukowaną tym polimerem (Rysunek 44). Zestawiając wyniki DLS (Rysunek 52a) z wynikami uzyskanymi dla liposomów z kalceiną (Rysunek 48) można zauważyć, że w stężeniu jonenów 1,28 µg/mL, w którym średnica obserwowanych cząstek osiąga swoją maksymalną wartość, spada wpływ kalceiny indukowany C8-T-p-T, natomiast wpływ dla C0-T-p-T osiąga swoje *plateau*. Prowadzi to do wniosku, że liposomy obecne w agregatach powstałych na skutek działania tych dwóch polimerów różnią się między sobą pod względem integralności ich dwuwarstwy fosfolipidowej, w przypadku C0-T-p-T dwuwarstwa jest przepuszczalna dla kalceiny, a w przypadku C8-T-p-T nie. Natomiast C12-T-p-T wyraźnie stabilizuje liposomy w stężeniu powyżej 1,28 µg/mL uwzględniając zarówno ich rozmiar, jak i integralności dwuwarstwy fosfolipidowej.

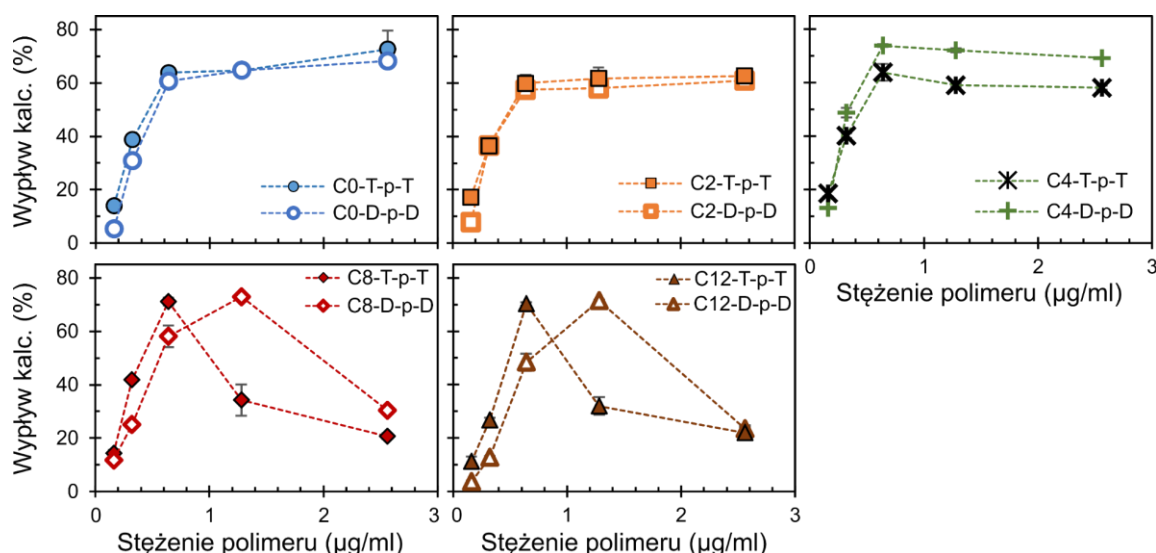
Opisane obserwacje są spójne z proponowanym przeze mnie mechanizmem działania przedstawionym na Rysunek 51. Zarówno hydrofilowe jak i hydrofobowe jony dla niskich wartości P/L indukują lokalne formowanie się fazy heksagonalnej w dwuwarstwie fosfolipidowej, która odpowiada za agregowanie się liposomów oraz wyciek kalceiny. Dla wysokich wartości P/L bardziej hydrofobowe jony wbudowują się do dwuwarstwy przy pomocy hydrofobowych grup alkilowych stabilizując jej ciągłość oraz zmieniając ładunek na silnie dodatni. Natomiast hydrofilowe jony, nieposiadające takich grup, mogą oddziaływać tylko z hydrofilowymi głowami lipidów. W związku z tym, nie są w stanie kompensować ujemnej krzywizny wewnętrznej powstających kompleksów TOCL-jonen, co tłumaczy brak powrotu średnicy hydrodynamicznej liposomów do pierwotnej wartości nawet dla wysokiego P/L.

10.2.3. Wpływ elastyczności łańcucha głównego jonenów na oddziaływanie z liposomami.

Drugim parametrem mającym znaczący wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową jest elastyczność łańcucha głównego (Rysunek 35, Tabela 5), w związku z czym sprawdziłem w jaki sposób wpływa ona na indukowanie wypływu kalceiny z LUVs. W badaniach tych zastosowałem LUVs zbudowane z EcLE oraz dwie serie jonenów - sztywne Cn-D-p-D oraz elastyczne Cn-T-p-T.

Otrzymane wyniki, zaprezentowane na Rysunek 54, świadczą o niewielkim wpływie elastyczności łańcucha głównego na badaną aktywność jonenów z grupą boczną C0 i C2. Natomiast w przypadku wyższych stężeń jonenów C4 pochodna zawierający DABCO okazała się być nieznacznie aktywniejszy od swojego analogu z TMEDA. Dla najniższego badanego stężenia, tj. 0,16 µg/mL, jony C0, C2 i C4-T-p-T powodowały wyższy wyciek kalceiny w porównaniu do ich analogów z DABCO. Jednakże obserwowane różnice wydają się być zbyt małe, aby można było uznać tę obserwację za wiarygodne wyjaśnienie 4-krotnej różnicy w MIC wobec *E. coli* (Rysunek 35). W przypadku jonenów z grupami bocznymi C8 i C12, które wykazują zdolność do uszczelniania LUVs złożonych z EcLE, zaobserwowałem znaczące różnice pomiędzy polimerami sztywnymi i elastycznymi. Dla C8-D-p-D oraz C12-D-p-D maksimum wycieku kalceiny przypadało na wyższe stężenia polikationów, niż miało to miejsce dla ich analogów zawierających TMEDA. Przesunięcie to może świadczyć o odmiennej stechiometrii oddziaływania tych związków z anionowymi lipidami.

Przedstawione wyniki wskazują na inną przyczynę słabszej aktywności przeciwbakteryjnej sztywniejszych jonenów, niż samo oddziaływanie z dwuwarstwą fosfolipidową.



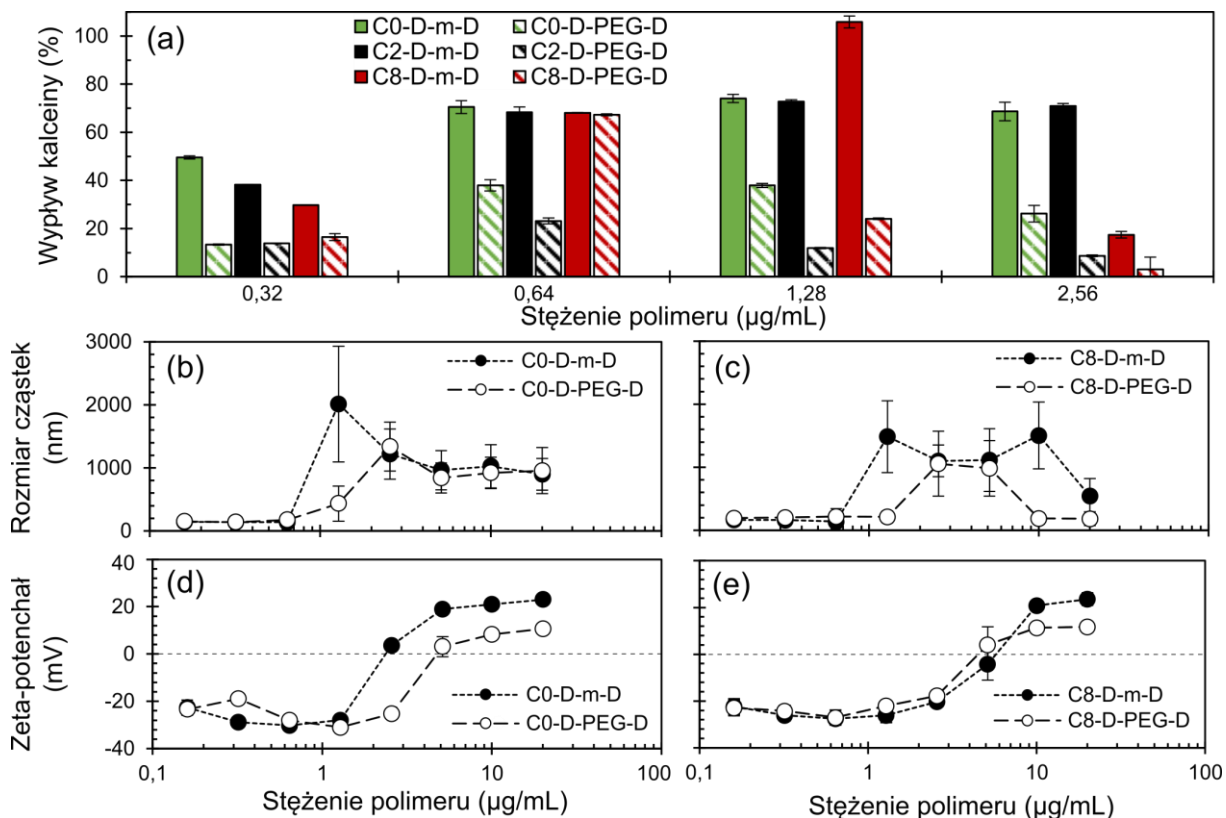
Rysunek 54. Wpływ kalceiny z LUVs (stężenie lipidów 7,6 µg/mL, ca. 10 µM) złożonych z EcLE po 900 s inkubacji z jonami w PBS pH 7,4 w 25 °C. Porównanie aktywności jonów elastycznych (Cn-T-p-T) z sztywnymi (Cn-D-p-D). Wyniki dla serii Cn-T-p-T pochodzą z Rysunek 48.

10.2.4. Wpływ dodatkowej hydrofilowej grupy bocznej (oPEG) na oddziaływanie jonów z liposomami.

Dodatkowa, oligomeryczna grupa PEG wbudowana w strukturę badanych jonów obniża ich aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz cytotoksyczność, co wykazałem w ramach moich badań poprzez porównanie aktywności serii Cn-D-m-D i Cn-D-PEG-D (Rysunek 35). W celu poznania w jaki sposób dodatkowa grupa oPEG wpływa na oddziaływanie jonów z dwuwarstwą fosfolipidową przeprowadziłem badania na LUVs zbudowanych z EcLE.

Jony z serii Cn-D-PEG-D powodują mniejszy wyciek kalceiny z LUVs w porównaniu z serią Cn-D-m-D (Rysunek 55a). Pomiar DLS wykazały, że jony C0-D-m-D, C0-D-PEG-D, C8-D-m-D oraz C8-D-PEG-D w stężeniu do 0,64 µg/mL nie powodują znaczących zmian w średnicy hydrodynamicznej ani zeta-potencjale badanych LUVs (Rysunek 55b-e). Natomiast jony Cn-D-m-D w stężeniu powyżej 0,64 µg/mL, a także Cn-D-PEG-D w stężeniu powyżej 1,28 µg/mL, powodują silną agregację liposomów. W przypadku C8-D-m-D i C8-D-PEG-D w stężeniach powyżej odpowiednio 10 µg/mL i 5 µg/mL następował spadek średnicy hydrodynamicznej świadczący o stabilizacji liposomów. Zmiana zeta-potencjału wraz ze stężeniem ma różny przebieg dla jonu C0-D-m-D i C0-D-PEG-D (Rysunek 55d), natomiast przebiegi dla C8-D-m-D i C8-D-PEG-D są do siebie zbliżone (Rysunek 55e). Dla najwyższych

stężeń jonenów Cn-D-m-D zeta potencjał LUVs osiąga wartość ok. +24 mV, natomiast dla jonenów Cn-D-PEG-D ok. +12 mV.



Rysunek 55. Wyniki badań na LUVs (stężenie lipidów 7,6 µg/mL, ca. 10 µM) z EcLE w PBS pH 7,4 w 25 °C; (a) wypływ kalceiny po 900 s inkubacji z jonenami; (b, c) rozmiar cząstek, jako średnica hydrodynamiczna, oraz (d, e) zeta potencjał LUV po 2-godzinnej inkubacji z jonenami.

Wyniki te są analogiczne do wyników otrzymanych dla innych serii jonenów, dyskutowanych w punktach 10.2.2 i 10.2.3., co świadczy o uniwersalnym charakterze efektu uszczelniania i stabilizacji LUVs przez jony z hydrofobową grupą boczną po przekroczeniu pewnego P/L, a także brakiem stabilizacji liposomów przez jony bez takiej grupy. Obserwowany słabszy wyciek kalceiny przez jony z grupą oPEG doskonale odpowiada niższej aktywności tych związków wobec *E. coli*, w porównaniu z analogami bez tej grupy. Efekt ten może wynikać zarówno ze słabszego oddziaływania elektrostatycznego jonenów Cn-D-PEG-D z dwuwarstwą fosfolipidową, jak i utrudnionej penetracji hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy. Polimer C8-D-PEG-D stabilizuje LUVs w szerszym zakresie stężeń niż C8-D-m-D (Rysunek 55c), co może być związane z efektem sterycznym grup PEG. Oba

polikationy w podobnym stopniu neutralizują ładunek powierzchni liposomu, lecz adsorpcja C8-D-PEG-D dostarcza silnie hydrofilowych grup PEG, które utrudniają aglomerację. Podobny efekt był dyskutowany przez innych badaczy w przypadku liposomów zawierających PEGyłowane lipidy.²⁵⁰ Niższy zeta-potencjał liposomów pokrytych jonenami Cn-D-PEG-D jest skutkiem ekspozycji grup oPEG. Obserwacja ta jest zgodna z pomiarami zeta-potencjału przeprowadzonymi na liposomach zawierających niewielką ilość PEGylowanych fosfolipidów.^{250,267} W jednej z przytoczonych prac²⁵⁰ autorzy wykazali, że zaledwie 2% dodatku lipidów z grupą PEG zmienia zeta-potencjał kationowych liposomów z +34 mV do +5 mV.

11. Podsumowanie

Ze względu na stosunkowo rozległy i wielowątkowy charakter moich badań postanowiłem podsumować najważniejsze dokonania i wnioski w postaci punktów.

1. Wykazałem, że zwiększanie liczby Me₂-L-PEU_{r,u} w obrębie jednej cząsteczki znacząco zwiększa jej podatność na reakcję eliminacji Hofmanna. Wyniki te świadczą o silnie addytywnym efekcie indukcyjnym czwartorzędowych grup amoniowych. Pociąga to za sobą ważną, z zarówno praktycznego punktu widzenia jak i poszerzania wiedzy podstawowej, implikację, że pochodne L-PEI w postaci czwartorzędowych soli amoniowych ulegają rozpadowi już w delikatnie zasadowych warunkach (punkt 8.1.).
2. Zaprojektowałem i zsyntetyzowałem bibliotekę 27 nowych polikationów, które różniły się między sobą podstawnikiem alkoksylowym (hydrofobowością) i obecnością silnie hydrofilowej grupy oPEG, a także sztywnością i izomerią łańcucha głównego. Zoptymalizowałem reakcję poliaddycji, która pozwoliła na syntezę polimerów różniących się planowanymi parametrami strukturalnymi przy zachowaniu zbliżonego DP oraz rodzaju grup końcowych. Otrzymane związki scharakteryzowałem przy pomocy spektroskopii ¹H NMR, SEC i analizy elementarnej, a w przypadku najbardziej hydrofobowych pochodnych wyznaczyłem ich CAC oraz zmierzyłem zeta-potencjał tworzonych agregatów (podr. 8).
3. Wykazałem, że zwiększaniu hydrofobowości grupy bocznej dyskutowanych jonenów, o wysokiej gęstości czwartorzędowych grup amoniowych wzdłuż łańcucha głównego polimeru, towarzyszy obniżenie ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Zależność tę

udokumentowałem w postaci wyników oznaczeń MIC oraz MBC i MFC zarówno w pożywkach wzrostowych jak i buforze, przeprowadzonych na szczepach mikroorganizmów z ATCC (podr. 9.1.1.1), a także oznaczeń MIC wobec szczepów klinicznym (podr. 9.1.2.1) oraz wyników badań nad kinetyką zabijania bakterii (podr. 9.1.3). Wniosek ten jest nieoczywistym odkryciem w świetle istniejących doniesień literaturowych dotyczących innych typów polikationów. Zależność aktywności hemolitycznej od hydrofobowości miała natomiast odwrotny przebieg i rosła wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego (podr. 9.2.1). Wyniki oznaczeń aktywności wobec komórek mysich fibroblastów nie wskazują na istotny wpływ hydrofobowości na cytotoksyczność.

4. Izomeria łańcucha głównego, w znaczeniu izomerii strukturalnej pierścienia aryłowego, jonenów o alkoksylowej grupie bocznej nie wpływa w znaczący sposób na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową i hemolityczną. Natomiast w przypadku jonenów bez grup bocznych pochodne o izomerii wyłącznie *para* wykazują najsłabszą aktywność wobec *S. aureus* i *C. albicans*, a najmocniejsze okazały się o izomerii *meta*. Jako hipotetyczne wyjaśnienie tego faktu eksperymentalnego zaproponowałem możliwość przyjęcia amfifilowej konformacji przez jony *meta* podczas oddziaływania z dwuwarstwą fosfolipidową (podr. 9.1.1.3).
5. Zwiększona sztywność łańcucha głównego jonenów znacząco obniża aktywność wobec *E. coli* i *C. albicans* oraz wywiera stosunkowo niewielki wpływ na aktywność wobec *S. aureus* z ATCC (podr. 9.1.1.2). Zależność ta potwierdziła się również w badaniach na szczepach klinicznych (podr. 9.1.2.1). Wykazanie istotnego wpływu elastyczności łańcucha głównego jonenów na aktywność przeciwdrobnoustrojową, zaraz obok hydrofobowości, jest ważnym elementem nowości naukowej mojej pracy doktorskiej.
6. Hydrofobowość badanych jonenów nie wpływa znacząco na aktywność wobec *Mycobacterium*, a wpływ elastyczności widoczny jest tylko dla najbardziej hydrofilowego polimeru (podr. 9.1.2.2). Wnioskiem z tego jest konieczność dokładnego zbadania zależności struktura-aktywność wobec prątków, ponieważ może mieć odmienny charakter od innych mikroorganizmów. Badania te są ważnym elementem nowości naukowej mojej rozprawy.
7. Obecność w cząsteczce jonenu silnie hydrofilowego fragmentu oPEG mocno obniża aktywność wobec *E. coli* oraz *C. albicans*, natomiast w przypadku aktywności wobec *S.*

aureus wpływ ten jest umiarkowany (podr. 9.1.1.4). Jednakże dodatek tej grupy pozytywnie wpływa na biokompatybilność zarówno pod względem aktywności hemolitycznej jonenów C8 i C12 (podr. 9.2.1), jak i cytotoksyczności jonenów C0, C2 i C4 (podr. 9.2.2.2), a także selektywność działania zdefiniowaną jako IC_{50}/MIC . Ponadto szersze badania mikrobiologiczne wykazały skuteczność działania jonenów z grupą oPEG wobec MRSA, a także szybkość działania wobec *S. aureus* porównywalną z ich odpowiednikami bez tej grupy. Otrzymane pochodne C0 i C2-D-PEG-D są dogodnym punktem wyjścia do projektowania nowych jonenowych SMAMPs o silniejszej aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz obniżonej cytotoksyczności. Jest to ważnym elementem nowości naukowej mojej rozprawy.

8. Przy pomocy barwnika fluorescencyjnego DiSC₃(5) wykazałem, że sam proces depolaryzacji błony komórkowej bakterii *S. aureus* prawdopodobnie nie jest efektem wystarczającym do jej uśmiercenia (podr. 10.1.1). Wniosek ten opieram na braku korelacji pomiędzy aktywnością jonenów, a poziomem depolaryzacji, który indukują. Badania te potwierdziły tylko fakt, że otrzymane przeze mnie związki są w stanie naruszyć integralność błony komórkowej *S. aureus*.
9. Względnie hydrofilowy jonen C0-T-p-T indukuje agregację komórek bakterii *E. coli*, natomiast hydrofobowy C8-T-p-T nie powoduje takiego efektu (podr. 10.1.2). Ponadto C0-T-p-T neutralizuje potencjał elektrokinetyczny powierzchni bakterii efektywniej od C8-T-p-T (podr. 10.1.3). Zaobserwowane wyższe powinowactwo bardziej hydrofilowych jonenów do powierzchni komórki bakterii, prowadzące do ich agregacji, może być roboczym wytłumaczeniem ich silniejszej aktywności przeciwbakteryjnej. Zastosowanie FITC-dekstranu o różnych masach potwierdziło, że otrzymane związki zaburzają strukturę błony komórkowej bakterii *E. coli* (podr. 10.1.2).
10. Hydrofilowy jonen C0-T-p-T powoduje agregację liposomów zbudowanych z EcLE dla całego zbadanego zakresu P/L. Natomiast hydrofobowe jony C8 i C12 również powodują agregację liposomów, jednakże w reżimie wysokiego P/L stabilizują je (podr. 10.2.2.2). Wynik ten w pewnym stopniu jest zgodny z obserwowaną agregacją komórek *E. coli* przez C0-T-p-T oraz brakiem agregacji przez C8-T-p-T.
11. Kardiolipina w połączeniu z fosfolipidami o negatywnej krzywiznie wewnętrznej (np. PE) jest niezbędnym komponentem dwuwarstwy lipidowej, aby wykazywała ona podatność na destruktywne działanie hydrofilowych jonenów (podr. 10.2.2.1).

Obserwacja ta stanowi ważny element nowości naukowej. Jako jej wyjaśnienie zaproponowałem hipotezę według której oddziaływanie jonenów z CL zmienia jej krzywiznę wewnętrzną z niemal zerowej na ujemną, co destabilizuje fazę lamelarną na rzecz odwrotnej fazy heksagonalnej (podr. 10.2.2.1; Rysunek 50).

12. Hydrofobowe jony (C8 i C12) zaburzają integralność dwuwarstwy fosfolipidowej LUVs zbudowanych głównie z lipidów o ujemnej krzywiznie wewnętrznej (POPE) tylko dla niskich wartości P/L. Natomiast w reżimie wysokiego P/L stabilizują dwuwarstwę uszczelniając ją. Efekt ten nie jest obecny w przypadku liposomów zawierających lipidy o zerowej krzywiznie wewnętrznej (POPC) (podr. 10.2.2.1). Na podstawie tych danych zaproponowałem hipotezę tłumaczącą zdolność do stabilizacji dwuwarstwy przez hydrofobowe jony i brak takiej zdolności dla hydrofilowych (podr. 10.2.2.1; Rysunek 51). Stabilizacja ta jest kolejną potencjalną przyczyną niższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej bardziej hydrofobowych jonenów.

V. Część eskperymentalna

12. Wykaz użytych materiałów

W badaniach mikrobiologicznych wykorzystano bakterie z kolekcji ATCC: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231) oraz komórki mysich fibroblastów z linii L929 (ATCC CCL-1).

Pożywki wykorzystane do oznaczeń mikrobiologicznych przygotowano poprzez rozpuszczanie w wodzie Milli-Q komercyjnych pożywek w postaci stałej: Mueller-Hinton Broth (Biocorp), Sabouraud broth zawierająca 2 % dekstrozy (Merck) oraz Mueller-Hinton Agar (Biocorp). Do pracy z fibroblastami wykorzystano DMEM z dodatkiem streptomycyny (Thermo Fisher Scientific) oraz FBS (Thermo Fisher Scientific).

Wodę Milli-Q o oporności $>18\text{ M}\Omega$ otrzymano przy pomocy systemu do oczyszczania wody Millipore (Merck). Liofilizację przeprowadzono przy pomocy liofilizatora stołowego Labconco FreeZone ® 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System. Membrany do dializy z regenerowanej celulozy (Spectra/Por® 7, MWCO 1 kDa) kondycjonowano przed użyciem zgodnie z zaleceniem producenta poprzez płukanie wodą Milli-Q.

Deuterowany wodorotlenek litu otrzymano poprzez 3-krotne rozpuszczenie wodorotlenku litu w wodzie deuterowanej i liofilizację. Przy pomocy miareczkowania alkacymetrycznego oznaczono stechiometrię otrzymanego hydratu deuterowanego wodorotlenku litu ($\text{LiOD} \cdot 2\text{D}_2\text{O}$).

Tabela 11. Wykaz komercyjnie dostępnych związków chemicznych użytych podczas wykonywania pracy.

Nr	Nazwa	czystość	producent
1.	POPC		Avanti Polar Lipids
2.	POPG		Avanti Polar Lipids
3.	POPE		Avanti Polar Lipids
4.	TOCL		Avanti Polar Lipids
5.	<i>E. coli</i> lipid extract		Avanti Polar Lipids
6.	Sephadex G-50 fine		Santa Cruz Biotechnology
7.	Triton X-100	99%	Fischer
8.	Kalceina		Merck
9.	Czerwień Nilu	97%	Roth
10.	$\text{DiSC}_3(5)$	98%	Sigma Aldrich
11.	FITC-dekstran		Sigma Aldrich
12.	Phosphate buffered saline pH 7,4 stock solution (PBS)		Fisher BioReagents TM
13.	D_2O	99.9%	Euroisotop
14.	DMSO-d_6	99.9%	Euroisotop
15.	CDCl_3		Euroisotop
16.	MeOH HPLC		POCH
17.	AcOH HPLC		J. T. Baker
18.	AcONa HPLC		Sigma Aldrich
19.	TMEDA	98%	Apollo Scientific
20.	DABCO	98%	TCI
21.	PMDTA	98%	TCI
22.	HMTETA	97%	Sigma Aldrich
23.	Jodek metylu	99%	Sigma Aldrich
24.	Bromek etylu	99%	TCI
25.	Bromek <i>n</i> -butylu	99%	Sigma Aldrich
26.	Bromek <i>n</i> -oktylu	99%	TCI
27.	Bromek <i>n</i> -dodecylu	98%	Merck
28.	5-hydroksy-izo-ftalanu dimetylu	>97%	Fluorochem
29.	Wodorek litowo glinowy (LAH)	97%	Alfa Aeser
30.	Tribromek fosforu	97%	TCI
31.	α,α' -dibromo- <i>p</i> -ksylenu	98%	TCI
32.	α,α' -dibromo- <i>m</i> -ksylenu	97%	TCI

33.	eteru metylowego trój(tlenku etylenu)	>97%	Santa Cruz Biotechnology
34.	Chlorek tosyłu	98%	Fluorochem
35.	Oksazolina metylowa	98%	Sigma Aldrich
36.	Kwas mrówkowy	98%	Fisher Chemical
37.	Formaldehyd 36-38%	99%	Chempur
38.	Acetonitryl	99%	POCH
39.	Metanol	99%	Chempur
40.	Eter dietylowy	99%	POCH
41.	Tetrahydrofuran	99%	Chempr
42.	Octan etylu	99%	POCH
43.	Dichlorometan	99%	POCH
44.	Heksan	99%	POCH
45.	Etanol	99%	POCH
46.	Dimetylosulfotlenek	99%	POCH
47.	Aceton	99%	POCH
48.	Dimetyloformamid	99%	POCH
49.	Bezwodny K_2CO_3	cz.	POCH
50.	$LiOH \cdot H_2O$	98+%	Merck
51.	Bezwodny Mg_2SO_4	cz.d.a.	POCH
52.	Bezwodny Na_2CO_3	cz.	POCH
53.	NaOH	98%	POCH
54.	Kwas solny 36%	99%	POCH
55.	Kwas siarkowy 95%	99%	POCH
56.	Wodorotlenek sodu	98%	POCH
57.	Piren	98%	Sigma Aldrich

13. Synteza chemiczna

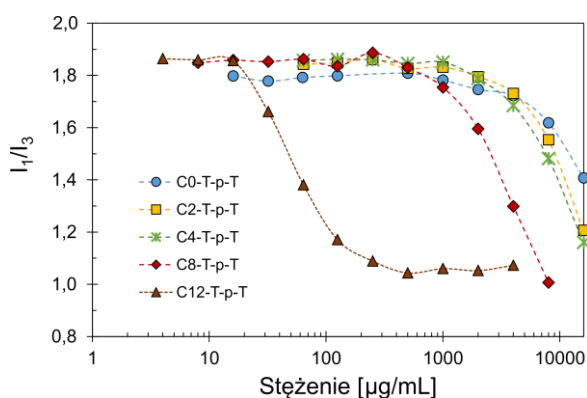
13.1. Analiza otrzymanych związków

Widma 1H i ^{13}C NMR wykonano przy pomocy spektrometru Varian 400 MHz stosując jako rozpuszczalnik D_2O , $CDCl_3$ oraz $DMSO-d_6$. Sygnałem referencyjnym był resztkowy sygnał rozpuszczalnika (na widmach 1H : δ 7,26 dla $CDCl_3$, 4,79 dla D_2O oraz 2,50 dla $DMSO-d_6$; na widmach ^{13}C : δ 77,00 dla $CDCl_3$). W opisie widm 1H NMR polimerów podano liczbę protonów w przeliczeniu na jedną r.u., a w przypadku grup końcowych na jedną grupę końcową. Analizę elementarną wykonano na aparacie Vario EL III CHNS Elemental (analiza wykonana przez dr inż. Elżbietę Świącicką- Füchsel z Katedry Chemii Analitycznej WCh PW). Widma UV-VIS wykonana na spektrofotometrze Cary 3.

Analizę chromatografii wykluczenia (SEC) wykonano we współpracy z dr hab., prof. PW Waldemarem Tomaszewskim z Zakładu Materiałów Wysokoenergetycznych WCh PW. Zastosowano chromatograf cieczowy Agilent 1260 Infinity wyposażony w detektor RID i UV

DAD (detekcję prowadzono dla 268 nm) oraz kolumnę PSS NOVEMA Max 5 μm 300 x 8 mm z prekolumną (PSS GmbH). Jako fazę ruchomą zastosowano układ woda/MeOH/AcOH 54/23/23 (v/v/v%) z dodatkiem 0,5 M AcONa. Układ skalibrowano przy pomocy zestawu wzorców z poli(2-winylopirydyny) o zakresie mas 620 - 539 kDa (PSS GmbH). Próbkę do analizy rozpuszczano w eluencie w stężeniu 5 mg/mL. Objętość nastrzyku na kolumnę wynosiła 20 μL . W trakcie analizy kolumnę termostatowano w temperaturze 50°C, zastosowano przepływ 0.4 mL/min. Masy molekularne M_w i M_n oraz D_M obliczono używając oprogramowania Agilent GPC Addon Rev. B.01.02.

Minimalne stężenie agregacji (CAC) oznaczono wykorzystując metodę pirenową. Do szklanych fiolek dodano acetonowy roztwór pirenu o stężeniu 0,2 mM (10 μL) i pozostawiono na 20 min do odparowania rozpuszczalnika. Następnie, w czystych fiolkach, przygotowano serię 2-krotnych rozcieńczeń polimerów w wodzie Milli-Q lub w PBS. Otrzymane roztwory (1 mL) przeniesiono do fiolek zawierających piren i wytrząsano w 25 °C przez noc. Po inkubacji zmierzono widma emisyjne w zakresie 350 - 500 nm dla wzbudzenia 337 nm (spektrofluorymetr FP-8500, Jasco). Wartość CAC wyznaczono jako punkt przecięcia się dwóch prostych dopasowanych do wykresu zależności I_1/I_3 (intensywność fluorescencji dla pierwszego (373 nm) i trzeciego (384 nm) pasma emisji) od logarytmu z stężenie polimeru - poziomej linii bazowej dla najniższych stężeń polimeru i stycznej do punktu przegięcia. Poniżej zamieszczono przykładowy przebieg zależności I_1/I_3 od stężenia jonenów:



Zeta potencjał agregatów polimerowych zmierzono przy pomocy techniki DLS (aparat Zetasizer Nano, Malvern Instruments). Polimery rozpuszczono w wodzie Milli-Q lub PBS otrzymując roztwory o stężeniu 2 mg/mL. Pomiary przeprowadzono po 24 h inkubacji w 25 °C. Pomiary dla każdej próbki wykonano trzykrotnie.

13.2. Synteza związków niskocząsteczkowych

Bromek 1,4-di(2-bromoetylo)-1,4-diazobicyklo[2.2.2]oktanu (1)

Do roztworu DABCO (5,00 g, 44,6 mmol) w MeCN (150 mL) wkroplono 1,2-dibromoetan (16,76 g, 7,680 mL, 89,2 mmol), a następnie mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 24 h. Powstały osad odfiltrowano, przemyto dwukrotnie MeCN (2 x 50 mL) i wysuszono pod próżnią otrzymując 13,10 g (98%) mono-podstawionego DABCO (**1a**) w postaci białych kryształów.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,28 (t, 6H, $J = 6,0$ Hz), 3,56 (t, 6H, $J = 6,0$ Hz), 3,85 (m, 4H); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 20,32, 44,14, 52,42, 64,09; skł. pierw.: C, 32,17; H, 5,69; N, 9,28%; teoretyczny skł. dla $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{N}_2$: C, 32,03; H, 5,38; N, 9,34%.

Mono-podstawione DABCO (**1a**) (960 mg, 3,2 mmol) rozpuszczono w MeOH (4 mL) i dodano 1,2-dibromoetan (960 mg, 0,44 mL, 5,11 mmol). Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 dni. Następnie odfiltrowano powstały osad, przemyto go kilkukrotnie MeOH (16 mL) i wysuszono pod próżnią otrzymując 1,27 g (79%) finalnego produktu w postaci białych kryształów.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,90 (t, 4H, $J = 5,4$ Hz), 4,16 (t, 4H, $J = 5,4$ Hz), 4,20 (s, 12H); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 19,56, 51,40, 64,65; skł. pierw.: C, 24,14; H, 4,61; N, 5,42%; teoretyczny skł. dla $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{Br}_3\text{N}_2$: C, 24,62; H, 4,13; N, 5,74%.

Bromek 1,4-diwinilo-1,4-diazobicyklo[2.2.2]oktanu (2)

Przykładowa reakcja prowadząca do powstania produktu: Do roztworu pochodnej **1** (500 mg, 0,976 mmol) w wodzie (400 μL) dodano TMEDA (170 mg, 220 μL , 1,464 mmol). Reakcję prowadzono przez 24 h w 70 °C, ochłodzono i zliofilizowano w celu usunięcia wody. Analiza ^1H NMR surowego produktu wykazała, że powstał niemal wyłącznie produkt **2**.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4,28 (s, 12H), 5,81 (m, 2H), 5,97 (m, 2H), 6,63 (m, 2H).

Pochodna 3

Roztwór DABCO (22,7 g, 200 mmol) w MeCN (60 mL) wkroplono w 40 °C do intensywnie mieszanego roztworu di-tosylowanego glikolu etylenowego (25,0 g, 68 mmol) w MeCN (220 mL). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 3 godziny, po czym

ochłodzono do temperatury pokojowej i odfiltrowano powstały osad, który następnie przemyto dwukrotnie MeCN (2 x 20 mL) i wysuszono pod próżnią otrzymując 22,5 g (58%) brunatnego osadu.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 2,31 (s, 6H), 3,13 (t, 12H, $J = 7,2$ Hz), 3,43 (t, 12H, $J = 7,2$ Hz), 3,85 (s, 4 H), 7,30 (d, 4 H, $J = 8$ Hz), 7,62 (d, 4H, $J = 8$ Hz); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 20,56, 44,08, 52,97, 54,86, 125,40, 129,61.

Pochodna 4

Do roztworu **3** (148,8 mg, 0,25 mmol) w MeOH (1 mL) dodano 1,2-dibromoetan (188,0 mg, 86,5 μL , 2 mmol) i całość ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 7 dni. Po tym czasie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, odfiltrowano osad i przemyto MeOH (2 mL), a następnie wysuszono pod próżnią otrzymując 27 mg (16%) osadu. Analiza widma ^1H NMR wykazała, że osad stanowi głównie pochodna **4**, zawierająca aniony bromkowe jako przeciwjon.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,83 (t, 4H), 4,11 (t, 4H), 4,20-4,23 (m, 24H), 4,45 (s, 4H).

Jodek N,N,N,N',N',N'-heksametylo-etyleno-diamoniowy (5)

Do mieszanego roztworu TMEDA (302,2 mg, 390 μL , 2,6 mmol) w MeCN (8 mL) wkroplono jodek metylu (880 mg, 386 μL , 6,2 mmol) w MeCN (2 mL) i pozostawiono mieszaninę na 21 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie odfiltrowano powstały osad, przemyto go trzykrotnie MeCN, a następnie wysuszono pod próżnią otrzymując 884 mg (82%) białego osadu.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,28 (s, 18H), 4,02 (s, 4H); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 54,1, 58,0.

Jodek N,N-dimetylo-bis-(2-N',N',N'-trimetyloamonio-etyleno)-amoniowy (6)

Do naczynia reakcyjnego wyposażonego w magnetyczny element mieszający wprowadzono roztwór PMDTA (300 mg, 361 μL , 1,73 mmol) w MeOH (10 mL), a następnie dodano MeI (1,476 g, 647 μL , 10,4 mmol). Naczynie umieszczono w reaktorze mikrofalowym (CEM Discover LabMate) i zawartość podgrzano do 110 °C. Temperaturę utrzymywano przez 2 h, maksymalna moc promieniowania mikrofalowego wynosiła 50 W. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej odfiltrowano powstały osad, przemyto trzykrotnie metanolem i wysuszono pod próżnią otrzymując 609 mg (57%) białego osadu.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,30 (s, 18H), 3,38 (s, 6H), 4,14 (m, 8H); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 51,9, 54,4, 57,6, 58,4; skł. pierw.: C, 23,84; H, 5,43; N, 6,84%; teoretyczny skł. dla $\text{C}_{12}\text{H}_{32}\text{I}_3\text{N}_3$: C, 24,06; H, 5,38; N, 7,01%,

Jodek N,N,N,N',N',N'',N'',N''',N''',N''',N'''-dekametylo-trietyleno-tetra-amoniowy (7)

Do naczynia reakcyjnego wyposażonego w magnetyczny element mieszający wprowadzono roztwór HMTETA (1,419 g, 622 μL , 2 mmol) w MeOH (10 mL), a następnie dodano MeI (1,476 g, 647 μL , 10,4 mmol). Naczynie umieszczono w reaktorze mikrofalowym (CEM Discover LabMate) i zawartość podgrzano do 110 $^\circ\text{C}$. Temperaturę utrzymywano przez 2 h, maksymalna moc promieniowania mikrofalowego wynosiła 50 W. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej odfiltrowano powstały osad, przemyto trzykrotnie metanolem i rekrytalizowano z mieszaniny EtOH/ H_2O . Następnie otrzymane kryształy rozpuszczono w wodzie, odfiltrowano zanieczyszczenie, a filtrat liofilizowano otrzymując 794 mg (50%) jasnożółtego osadu.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,31 (s, 18H), 3,43 (s, 12H), 4,17 (m, 4H), 4,20 (m, 4H), 4,32 (s, 4H); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 52,2, 54,5, 57,6, 58,2, 58,5; skł. pierw.: C, 23,96; H, 5,40; N, 6,81%; teoretyczny skł. dla $\text{C}_{16}\text{H}_{42}\text{I}_4\text{N}_4$: C, 24,08; H, 5,30; N, 7,02%,

Chlorek 1,2-bis(4-aza-1-azoniabicyklo[2.2.2]okt-1-yl)etanu (8)

Pochodną **3** (415 mg, 0,70 mmol) rozpuszczono w wodzie (2 mL). Roztwór naniesiono na kolumnę wypełnioną żywicą jonowymienną Lewatit® MonoPlus M 500 w postaci chlorkowej (30 g). Jako fazę ruchomą zastosowano wodę, detekcję prowadzono przy pomocy wodnego roztworu AgNO_3 o stężeniu 0,1 M. Frakcje zawierające produkt zebrano i liofilizowano otrzymując 192 mg (85%) białych kryształów.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,25 (t, 12H, $J = 7,0$ Hz), 3,53 (t, 12H, $J = 7,0$ Hz), 3,95 (s, 4H); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 55,0, 53,1, 44,2.

Chlorek 4,4'-(etano-1,3-diyl)bis(1-metylo-1,4-diazabicyklo-[2.2.2]oktano-1,4-diium) (9)

Do roztworu pochodnej **3** (600 mg, 1 mmol) w MeOH (8 mL) dodano MeI (340 mg, 149 μL , 2,4 mmol). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 24 h i ochłodzono. Powstały osad odfiltrowano, przemyto trzykrotnie MeOH i wysuszono pod próżnią. Następnie wykonano podmianę anionów tosyłanowych na chlorkowe stosując procedurę analogiczną do syntezy **8**. Otrzymano 273 (80%) mg produktu.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,38 (s, 6H), 4,10 (t, 12H, $J = 6,8$ Hz), 4,19 (t, 12H, $J = 6,8$ Hz), 4,40 (s, 4H); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 52,4, 52,7, 53,1, 55,4; skł. pierw.: C, 41,92; H, 8,9; N, 11,97%; teoretyczny skł. dla $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{C}_{14}\text{N}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 41,75; H, 8,32; N, 12,17%.

Jodek N,N,N-trimetylo-N-winyloamoniowy (10)

Podwójną sól amoniową **5** (2,5 g, 6,25 mmol) rozpuszczono w wodnym (12,5 mL) roztworze NaOH (0,5 g, 12,5 mmol) i całość ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 godziny. Po tym czasie mieszaninę zatężono na wyparce obrotowej do ok 20-30% objętości i przepuszczono przez kolumnę wypełnioną żywicą jonowymienną (70 g) w postaci chlorkowej. Roztwór zliofilizowano otrzymując produkt zanieczyszczony NaCl. W celu usunięcia soli osad ogrzewano w MeCN (20 mL) w temperaturze wrzenia przez 15 minut, po czym odfiltrowano na gorąco. Przesącz zatężono otrzymując 342 mg (45%) krystalicznego osadu.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3.29 (s, 9H), 5,52 (m, 1H), 5,74 (m, 1H), 6,48 (m, 1H).

Jodek N,N,N,N',N'-pentametylo-N'-winylo-etano-1,2-diamoniowy (11)

Do wodnego (2,5 mL) roztworu **7** (200 mg, 0,25 mmol) dodano wodny (2,5 mL) roztwór $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (12,6 mg, 0,30 mmol) i całość mieszano przez 48 h w temperaturze 25°C. Po tym czasie mieszaninę liofilizowano, a powstały osad dokładnie przemyto MeCN i rozpuszczono w MeOH otrzymując mętny roztwór, który przefiltrowano przez filtr membranowy 0.45 μm . Przesącz częściowo zatężono i ochłodzono do -40°C. Powstałe kryształy odfiltrowano, przemyto zimnym MeOH i wysuszono pod próżnią otrzymując 79 (79%) mg białych kryształów.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,31 (s, 9 H), 3,48 (s, 6 H), 3,92 (m, 2H), 4,23 (m, 2H), 5,84 (dd, 1H, $J = 8,2, 4,6$ Hz), 5,93 (dd, 1H, $J = 15,1, 4,6$ Hz), 6,52 (dd, 1H, $J = 15,1, 8,2$ Hz); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 52,9, 54,2, 58,2, 58,3, 115,9, 139,2,

Chlorek 1-metylo-4-winylo -1,4-diazonia-bicyklo[2.2.2]oktanu (13)

Do wodnego (31 mL) roztworu **9** (660 mg, 1,56 mmol) dodano $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (73 mg, 1,74 mmol) i całość mieszano przez 4 h w temperaturze 25°C. Roztwór następnie liofilizowano, a otrzymany osad macerowano przy pomocy MeCN przez 5 h. Zawiesinę odwirowano, powstały osad przemyto kilkakrotnie MeCN. Frakcje MeCN połączono otrzymując supernatant (I). Osad natomiast rozpuszczono w niewielkiej ilości MeOH, przefiltrowano przez filtr membranowy 0.45 μm , po czym dodano do przesączu taką ilość Et_2O , aby roztwór delikatnie zmętniał. Zawiesinę przechowano w -40°C przez noc, powstałe kryształy odfiltrowano, przemyto zimnym MeOH i wysuszono otrzymując 260 mg (75%) białego osadu.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3,44 (s, 3H), 4,14 (t, 6H, $J = 7,2$ Hz), 4,23 (t, 6H, $J = 7,2$ Hz), 5,81 (m, 1H), 5,94 (m, 1H), 6,61 (m, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 52,9, 53,4, 115,7, 138,8.

Chlorek 1-metylo-4-aza-1-azonia-bicyklo[2.2.2]oktanu (14)

Supernatant (I), otrzymany podczas syntezy pochodnej **13**, zatężono do połowy objętości i przechowywano w -40°C przez noc. Powstałe kryształy odfiltrowano, przemyto zimnym MeCN i wysuszono pod próżnią otrzymując 196 mg (78%) białego osadu.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 2,98 (s, 3H), 3,12 (t, 6H, *J* = 8 Hz), 3,32 (t, 6H, *J* = 8 Hz); ¹³C NMR (400 MHz, D₂O): δ 44,4, 51,7, 54,1.

1-alkilo-3,5-bis(bromometylo)benzen (15-Cn)

Poniżej przedstawiono ogólną procedurę syntezy bromków **15-Cn** na przykładzie pochodnej **15-C8**. Pozostałe pochodne otrzymano w analogiczny sposób.

5-(oktyloksy)izo-ftalan dimetylu (15a-C8): Do roztworu 5-hydroksy-izo-ftalanu dimetylu (7,35 g, 35 mmol) w MeCN (225 mL) dodano K₂CO₃ (19,00 g, 140 mmol), a następnie wkropiono 1-bromooktan (8,1 g, 7,3 mL, 42 mmol). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez noc, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej, przefiltrowano i przesącz zatężono. Otrzymany osad przemyto dwukrotnie zimnym heksanem (3 mL) i wysuszono pod próżnią otrzymując 11,06 g (98%) białych kryształów.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, 3H, *J* = 6,7 Hz), 1,39-1,22 (m, 8H), 1,46 (m, 2H), 1,79 (m, 2H), 3,93 (s, 6H), 4,02 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz), 7,73 (s, 2H), 8,24 (s, 1H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 166,12, 159,09, 131,51, 122,60, 119,68, 68,48, 52,31, 31,70, 29,21, 29,13, 28,98, 25,87, 22,57, 14,03.

1-oktyloksy-3,5-bis(hydroksymetylo)benzen (15b-C8): Do schłodzonej do ok 5°C zawiesiny LAH (3,1 g, 81,6 mmol) w bezwodnym THF (100 mL) wkropiono, w atmosferze argonu, roztwór **15a-C8** (11,0 g, 34 mmol) w bezwodnym THF (100 mL). Otrzymaną mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez noc, po czym schłodzono do ok. 5 °C i ostrożnie wkropiono wodę (30 mL), 1 M H₂SO₄ (60 mL) oraz ponownie wodę (30 mL). Następnie odparowano THF, a pozostałą fazę wodną ekstrahowano przy pomocy AcOEt (4 x 80 mL). Połączone fazy organiczne wysuszono nad MgSO₄ i zatężono otrzymując 9,5 g (94%) białych kryształów.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, 3H, *J* = 6,7 Hz), 1,37-1,22 (m, 8H), 1,42 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 2,98 (bs, 2H), 3,90 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz), 4,53 (s, 4H), 6,74 (s, 2H), 6,83 (s, 1H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 159,31, 142,63, 117,31, 111,97, 68,02, 64,80, 31,81, 29,36, 29,24, 26,02, 22,66, 14,11.

1-oktyloksy-3,5-bis(bromometylo)benzen (15-C8): Do schłodzonego do ok. 5 °C roztworu **15b-C8** (8,5 g, 32 mmol) w DCM (230 mL) wkroplono PBr₃ (21,7 g, 7,6 mL, 80 mmol). Otrzymaną mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez noc, po czym schłodzono do ok. 5 °C i ostrożnie wkroplono wodę (100 mL). Oddzieloną fazę organiczną przemyto wodą (100 mL) i nasyconym wodnym roztworem Na₂CO₃ (50 mL), po czym wysuszono nad MgSO₄ i zatężono. Otrzymane oleiste ciało stałym rekrystalizowano z MeOH otrzymując 9,72 g (76%) białych kryształów.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, 3H, *J* = 6,7 Hz), 1,39-1,22 (m, 8H), 1,45 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 3,95 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz), 4,43 (s, 4H), 6,86 (s, 2H), 6,98 (s, 1H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 159,49, 139,46, 121,55, 115,14, 68,12, 32,99, 31,78, 29,31, 29,21, 29,14, 25,99, 22,65, 14,12.

Opis widm NMR oraz wydajność pozostałych reakcji syntezy pochodnych **15-Cn**:

5-etyloksy-izo-ftalan dimetylu (15a-C2): wydajność syntezy 78%

¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz): δ 1,43 (t, 3H, *J* = 6,8 Hz), 3,92 (s, 6H), 4,10 (q, 2H, *J* = 4,2 Hz), 7,71 (d, 2H, *J* = 1,2 Hz), 8,24 (t, 1H, *J* = 1,2 Hz); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 166,15, 158,94, 131,60, 122,72, 119,72, 64,05, 52,38, 14,63.

1-etyloksy-3,5-bis(hydroksymetylo)benzen (15b-C2): wydajność syntezy 97%

¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz): δ 1,36 (t, 3H, *J* = 6,8 Hz), 3,37 (bs, 2H), 3,96 (q, 2H, *J* = 6,8 Hz), 4,48 (s, 4H), 6,70 (s, 2H), 6,80 (s, 1H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 159,02, 142,63, 117,40, 111,91, 64,63, 63,43, 14,78.

1-etoksy-3,5-bis(bromometylo)benzen (15-C2): wydajność syntezy 63%

¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz): δ 1,42 (t, 3H, *J* = 6,8 Hz), 4,04 (q, 2H, *J* = 6,8 Hz), 4,43 (s, 4H), 6,86 (s, 2H), 6,99 (s, 1H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 159,64, 139,72, 121,84, 115,30, 63,64, 33,09, 14,86.

5-butoksy-izo-ftalan dimetylu (15a-C4): wydajność syntezy 99%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,98 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz), 1,49 (m, 2H), 1,79 (m, 2H), 3,93 (s, 6H), 4,04 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz), 7,73 (s, 2H), 8,25 (s, 1H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 166,18, 159,15, 131,58, 122,66, 119,74, 68,22, 52,38, 31,06, 19,13, 13,79.

1-butoksy-3,5-bis(hydroksymetylo)benzen (15b-C4): wydajność syntezy 84%

^1H NMR(400 MHz, CDCl_3): δ 0,95 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz), 1,46 (m, 2H), 1,72 (m, 2H), 3,39 (bs, 2H), 3,90 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz), 4,49 (s, 4H), 6,71 (s, 2H), 6,80 (s, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 159,26, 142,61, 117,30, 111,94, 67,68, 64,72, 31,24, 19,19, 13,84.

1-butoksy-3,5-bis(bromometylo)benzen (15-C4): wydajność syntezy 65%

^1H NMR(400 MHz, CDCl_3): δ 0,98 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz), 1,50 (m, 2H), 1,77 (m, 2H), 3,96 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz), 4,43 (s, 4H), 6,86 (s, 2H), 6,98 (s, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 159,52, 139,48, 121,57, 115,16, 67,82, 33,00, 31,20, 19,21, 13,87.

5-dodecyloksy-izo-ftalan dimetylu (15a-C12): wydajność syntezy 91%

Ważne: po odfiltrowaniu ochłodzonej mieszaniny reakcyjnej osad należy przemyć AcOEt zamiast MeCN ze względu na niską rozpuszczalność produktu w MeCN.

^1H NMR(400 MHz, CDCl_3): δ 0,87 (t, 3H, $J = 6,6$ Hz), 1,34-1,26 (m, 16H), 1,46 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 3,93 (s, 2H), 4,0 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz), 7,73 (s, 2H), 8,25 (s, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 166,21, 159,18, 131,60, 122,68, 119,76, 68,56, 52,38, 31,89, 29,64, 29,61, 29,57, 29,54, 29,33, 29,32, 29,05, 25,93, 22,67, 14,12.

1-dodecyloksy-3,5-bis(hydroksymetylo)benzen (15b-C12): wydajność syntezy 87%

^1H NMR(400 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (t, 3H, $J = 6,7$ Hz), 1,37-1,22 (m, 16H), 1,44 (m, 2H), 1,79 (m, 4H, $-\text{CH}_2-$, $-\text{OH}$), 3,96 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz), 4,67 (s, 4H), 6,84 (s, 2H), 6,92 (s, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 159,66, 142,68, 117,25, 112,11, 68,03, 65,19, 31,90, 29,65, 29,62, 29,59, 29,57, 29,37, 29,34, 29,23, 26,02, 22,68, 14,13.

1-dodecyloksy1-3,5-bis(bromometylo)benzen (15-C12): wydajność syntezy 61%

^1H NMR(400 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (t, 3H, $J = 6,8$ Hz), 1,39-1,22 (m, 16H), 1,45 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 3,96 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz), 4,43 (s, 4H), 6,86 (s, 2H), 6,99 (s, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 159,53, 139,49, 121,57, 115,17, 68,15, 32,98, 31,91, 29,66, 29,63, 29,59, 29,56, 29,36, 29,35, 29,16, 26,00, 22,69, 14,14.

Bromek α,α' -bis(N,N,N',N' -tetrametylo-2-amino-1-amonowy)- p -ksylen (16)

Roztwór α,α' -dibromo- p -ksylenu (6,60 g, 25 mmol) w MeCN (200 mL) wkroplono do roztworu TMEDA (18,6 mL, 14,45 g, 125 mmol) w MeCN (60 mL) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie otrzymaną mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez noc i ochłodzono. Odfiltrowano powstały osad i przemyto go MeCN (20 mL) i Et_2O (50 mL), po czym wysuszono po próżni otrzymując 11,00 g (89%) białego osadu.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 2,25 (s, 12H), 2,92 (m, 4H), 3,07 (s, 12H), 3,46 (m, 4H), 4,58 (s, 4H), 7,67 (m, 4H); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O) δ : 133,78, 129,62, 67,66, 61,11, 50,78, 50,22,

44,37; skł. pierw.: C, 48,39; H, 8,12; N, 11,29%; teoretyczny skł. dla C₂₀H₄₀Br₂N₄: C, 48,45; H, 8,13; N, 11,33%,

Bromek α,α' -bis(N,N,N',N' -tetrametylo-2-amino-1-amoniowy)- m -ksylen (17)

Roztwór α,α' -dibromo- m -ksylenu (6,60 g, 25 mmol) w MeCN (120 mL) wkroplono do roztworu TMEDA (16,3 mL, 12,5 g, 108 mmol) w MeCN (72 mL) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Otrzymaną mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez noc i ochłodzono. Następnie zatężano, aż do otrzymania szklistego ciała stałego, które następnie mieszano przez 1 h z MeCN (30 mL) w temperaturze pokojowej po czym podgrzano do temperatury wrzenia do całkowitego rozpuszczenia lepkiego osadu, schłodzono do temperatury pokojowej i umieszczono w lodówce. Po 1 dniu odfiltrowano powstały osad i przemyto przy pomocy Et₂O (300 mL) w atmosferze argonu, a następnie wysuszono pod próżnią otrzymując 8.38 g (94%) silnie higroskopijnego osadu.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 2.25 (s, 12H), 2.91 (m, 4H), 3.06 (s, 12H), 3.48 (m, 4H), 4.59 (s, 4H), 7.71 (m, 4H); ¹³C NMR (400 MHz, D₂O) δ : 137.29, 135.44, 130.37, 128.12, 67.93, 61.33, 50.83, 50.00, 44.40.

Bromek α,α' -bis(1-azonia-4-azabicyklo[2.2.2]octyl)- p -ksylen (18)

Roztwór α,α' -dibromo- p -ksylenu (6,60 g, 25 mmol) w MeCN (180 mL) wkroplono do roztworu DABCO (14,00 g, 125 mmol) w MeCN (80 mL) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie otrzymaną mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez noc i ochłodzono. Odfiltrowano powstały osad i przemyto go MeCN (20 mL) i Et₂O (150 mL), po czym wysuszono po próżnią otrzymując 11,42 g (94%) białego osadu.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 3,14 (t, 12H, $J = 7,6$ Hz), 3,45 (t, 12H, $J = 7,6$ Hz), 4,53 (s, 4H), 7,61 (s, 4H); ¹³C NMR (400 MHz, D₂O) δ : 44,3, 52,2, 67,6, 128,7, 133,9; skł. pierw.: C, 47,44; H, 6,60; N, 11,05%; teoretyczny skł. dla C₂₀H₃₂Br₂N₄·H₂O: C, 47,44; H, 6,77; N, 11,07%.

Bromek α,α' -bis(1-azonia-4-azabicyklo[2.2.2]octyl)- m -ksylen (19)

Roztwór α,α' -dibromo- m -ksylenu (6.60 g, 25 mmol) w MeCN (180 mL) wkroplono do roztworu DABCO (14,00 g, 125 mmol) w MeCN (80 mL) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie otrzymaną mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez noc i ochłodzono. Odfiltrowano powstały osad i przemyto go MeCN (20 mL) i Et₂O (150 mL), po czym wysuszono po próżnią otrzymując 11,66 g (96%) białego osadu.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 3,12 (t, 12H, $J = 7,2$ Hz), 3,44 (t, 12H, $J = 7,2$ Hz), 4,52 (s, 4H), 7,59 (s, 1H), 7,63 (s, 3H); ¹³C NMR (400 MHz, D₂O) δ : 44,3, 52,1, 67,7, 127,3, 130,3, 135,5,

137,4; skł. pierw.: C, 43,76; H, 7,01; N, 10,23%; teoretyczny skł. dla $C_{20}H_{32}Br_2N_4 \cdot 3H_2O$: C, 44,29; H, 7,06; N, 10,33%.

1,3-bis(DABCO)-5-[2-[2-(2-methoksyetoksy)etoksy]etoksy]benzen (20)

5-(2-[2-(2-methoksyetoksy)etoksy]etoksy)-izo-ftalan dimetylu (20a): Do roztworu 5-hydroksy-izo-ftalanu dimetylu (10,6 g, 50,4 mmol) w MeCN (400 mL) dodano K_2CO_3 (16,9 g, 122 mmol), a następnie wkroplono **21** (14,5 g, 45,5 mmol) w MeCN (60 mL). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez noc, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej, przefiltrowano i przesącz zateżono. Otrzymany olej rozpuszczono następnie w AcOEt (100 mL) i fazę organiczną przemyto nasyconym roztworem Na_2CO_3 (3 x 30 mL), 5% (w/w) roztworem NaOH (2 x 30 mL) oraz wodą (50 mL) w celu usunięcia nieprzereagowanego 5-hydroksy-izo-ftalanu dimetylu. Fazę organiczną wysuszono z użyciem $MgSO_4$ i zateżono otrzymując 14,0 g (86%) białych kryształów.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 Hz): δ 3,35 (s, 3H), 3,53 (t, 2H), 3,62 – 3,68 (m, 4H), 3,73 (m, 2H), 3,87 (t, 2H), 3,91 (s, 6H), 4,19 (t, 2H), 7,74 (d, 2H), 8,25 (t, 1H), ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 166,1, 158,8, 131,6, 123,1, 119,9, 71,9, 70,9, 70,6, 70,6, 69,5, 68,0, 59,0, 52,4.

1-(2-[2-(2-methoksyetoksy)etoksy]etoksy)-3,5-bis(hydroksymetylo)benzene (20b): Do schłodzonej do ok 5 °C zawiesiny LAH (3,8 g, 100 mmol) w bezwodnym THF (110 mL) wkroplono, w atmosferze argonu, roztwór **15a-C8** (15,1 g, 42 mmol) w bezwodnym THF (110 mL). Otrzymana mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez noc, po czym schłodzono do ok 5 °C i ostrożnie wkroplono wodę (15 mL) i 6 M H_2SO_4 (15 mL). Następnie mieszaninę zateżono, a otrzymany osad macerowano przez 30 min przy pomocy DCM (100 mL). Powstałą zawiesinę przefiltrowano, osad przemyto dokładnie DCM (3 x 50 mL). Połączone fazy DCM zateżono otrzymując 12,4 g (98%) jasnożółtego, lepkiego oleju.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 Hz): δ 2,82 (bs, 2,82), 3,35 (s, 3H), 3,52 (t, 2H), 3,61 – 3,66 (m, 4H), 3,71 (m, 2H), 3,81 (t, 2H), 4,08 (t, 2H), 4,56 (s, 4H), 6,78 (s, 2H), 6,85 (s, 1H).

1-(2-[2-(2-methoksyetoksy)etoksy]etoksy)-3,5-bis(bromometylo)benzene (20c): Do schłodzonego do ok 5°C roztworu **20b** (11,9 g, 39 mmol) w DMC (290 mL) wkroplono PBr_3 (27,1 g, 9,5 mL, 100 mmol). Otrzymaną mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez noc, po czym schłodzono do ok 5 °C i ostrożnie wkroplono wodę (20 mL). Oddzieloną fazę organiczną przemyto wodą (3 x 100 mL) po czym wysuszono nad $MgSO_4$ i zateżono. Surowy produkt oczyszczono stosując chromatografię kolumnową z użyciem żelu krzemionkowego jako fazy stacjonarnej i mieszaniny heksan/AcOEt (9/1 do 5/5 v/v) otrzymując 7,50 g (46%) bezbarwnego oleju.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 Hz): δ = 3,38 (s, 3H), 3,55 (m, 2H), 3,64 – 3,69 (m, 4H), 3,73 (t, 2H), 4,13 (t, 2H), 4,42 (s, 4H), 6,87 (s, 2H), 6,99 (s, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 159,2, 139,5, 122,0, 115,3, 71,9, 70,8, 70,6, 70,6, 69,6, 67,6, 59,1, 32,9.

1,3-bis(DABCO)-5-[2-[2-(2-methoksyetoksy)etoksy]etoksy]benzen (20): Roztwór **20c** (5,00 g, 11,7 mmol) w MeCN (78 mL) wkroplono do roztworu DABCO (7,86 g, 70,2 mmol) w MeCN (48 mL) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie otrzymaną mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez noc, ochłodzono i zatężono. Otrzymany lepki osad dokładnie przemyto Et_2O (4 x 100 mL), po czym trzykrotnie rozpuszczano w MeCN (20 mL) i strącano w Et_2O (100 mL). Następnie ponownie dokładnie przemyto Et_2O (2 x 100 mL). Lepki osad suszono pod wysoką próżnią przez 4 dni otrzymując 6,45 g (85%) silnie higroskopijnego proszku.

^1H NMR (D_2O , 400 Hz): δ 3,13 (t, 12H), 3,31 (s, 3H), 3,44 (t, 12H), 3,56 (m, 2H), 3,61 – 3,67 (m, 4H), 3,72 (m, 2H), 3,88 (t, 2H), 4,23 (t, 2H), 4,49 (s, 4H), 7,21 (s, 1H), 7,23 (s, 2H), ^{13}C NMR (D_2O , 100 Hz): δ 159,1, 130,1, 128,7, 121,6, 71,1, 69,9, 69,6, 69,5, 69,1, 67,8, 67,6, 58,2, 52,3, 44,36; skł. pierw.: C, 47,11; H, 7,33; N, 8,17%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O})_n$: C, 47,24; H, 7,34; N, 8,16%.

***p*-toluenosulfonian 2-(2-(2-metoksyetoksy)etoksy)etylu (21)**

Do roztworu eteru metylowego trój(tlenku etylenu) (35.87 g; 218 mmol) w THF (62 mL) dodano ostrożnie wodny (12 mL) roztwór NaOH (9.20 g, 230 mmol) i powstałą mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 h. Następnie ochłodzono w łaźni z wodą i lodem, po czym przez 1 h dodawano małymi porcjami chlorek tosyłu (38.35 g, 201 mmol). Mieszaninę mieszano przez kolejną godzinę w łaźni chłodzącej. Łaźnię usunięto i mieszano dalej w temperaturze pokojowej przez noc. Następnie dodano wodę (65 mL) i rozdzielono powstałe fazy. Fazę wodną ekstrahowano przy pomocy AcOEt (4 x 50 mL). Połączone fazy organiczne przemyto solanką (50 mL), wysuszono nad MgSO_4 i zatężono otrzymując 58.0 g (91%) jasnożółtego oleju.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,42 (s, 3H), 3,50 (m, 2H), 3,57 (s, 4H), 3,59 (m, 2H), 3,66 (t, 2H, J = 4,8 Hz), 4,13 (t, 2H, J = 4,8 Hz), 7,32 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,32 (d, 2H, J = 8 Hz), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 144,8, 132,8, 129,8, 127,9, 71,8, 70,7, 70,5, 70,5, 69,2, 68,6, 59,0, 21,6.

13.3. Synteza polimerów

N,N-dimetyl-*L*-PEI (*Me*₂-*L*-PEI)

MPOX: Do oksazoliny metylowej (196,74 g, 195,76 mL, 2,3 mol) w suchej kolbie okrągłej w atmosferze argonu dodano bromek benzylu (2,37 g, 1,65 mL, 13,9 mmol). Mieszaninę ogrzewano do 100 °C przez 70 min, ochłodzono, dodano wody w takiej ilości, aby rozpuścić powstały osad. Po odparowaniu wody, osad rozpuszczono w EtOH i wytrącono Et₂O otrzymując żółtawy olej, który po wysuszeniu pod próżnią przekształcił się w żółtawe ciało stałe (157 g, 80%). *M_n* obliczone z widma ¹H NMR wynosiło 19,5 kDa.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 2,00 (m, 3H), 3,46 (m, 4H).

L-PEI: *MPOX* (2,380 g, 28 mmol jednostek powtarzalnych) rozpuszczono w wodnym roztworze HCl (100 mL; 6M) i ogrzewano do temperatury wrzenia przez noc. Następnie odparowano wodę. Powstały osad rozpuszczono w wrzącej wodzie (100 mL) i zalkalizowano wodorotlenkiem sodu (1,5 g w 4 mL H₂O). Po ochłodzeniu wydzielono osad i przemywano wodą, aż filtrat miał odczyn bliski obojętnemu. Osad wysuszono pod próżnią otrzymując 1,110 g (92%) osadu.

¹H NMR (400 MHz, CD₃Cl): δ 2,54 (brs, 1H), 2,70 (s, 4H); ¹³C NMR (400 MHz, CD₃Cl): δ 49.

Me-*L*-PEI: W kolbie okrągłodennej umieszczono *L*-PEI (300 mg, 7 mmol jednostek powtarzalnych), wodę (0,9 mL), kwas mrówkowy (0,74 mL) oraz 30% formalinę (0,9 mL). Otrzymaną mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez noc. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano wodny roztwór NaOH o stężeniu 20% w/w w ilości wystarczającej do osiągnięcia pH 12 i ekstrahowano chloroformem. Połączone frakcje organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO₄ i odparowano rozpuszczalnik otrzymując 389 mg (99%) jasnożółtego oleju.

¹H NMR (400 MHz, CD₃Cl): δ 2,22 (s, 3H), 2,46 (s, 4H); ¹³C NMR (400 MHz, CD₃Cl): δ 42,9; 55,8.

*Me*₂-*L*-PEI: Do roztworu *Me*-*L*-PEI (115,6 mg, 2 mmol r.u.) w bezwodnym MeOH (10 mL) dodano MeI (852 mg, 374 μL, 6 mmol) w atmosferze argonu. Otrzymaną mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez noc. Po ochłodzeniu dodano nadmiar bezwodnego EtOH. Wytrącony osad przemyto dwukrotnie EtOH i raz Et₂O. Po wysuszeniu osad przemyto dwukrotnie wodą i wysuszono pod próżnią otrzymując 340 mg (85%) jasnożółtego osadu. W celu otrzymania widma ¹H NMR do D₂O dodano NaCl.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4,51 (4H, s, $-\text{CH}_2-$), 3,63 (6H, s, $-\text{Me}$); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 58,3, 52,7.

Jony serii Cn-T-p-T

Poniżej przedstawiono ogólną procedurę syntezy jonenów C0-T-p-T, C2-T-p-T, C4-T-p-T, C8-T-p-T i C12-T-p-T na przykładzie C2-T-p-T.

C2-T-p-T

Do roztworu **16** (1,964 g, 3,96 mmol) w DMSO (5,6 mL) z dodatkiem wody (1,12 mL) wkropiono roztwór **15-C2** (1,109 g, 3,60 mmol) w DMSO (4 mL). Reakcję prowadzono w 25 °C przez 24 h. Po tym czasie mieszaninę wlało do nadmiaru acetonu (400 mL), a z powstałej zawiesiny wydzielono osad poprzez wirowanie. Osad, po wysuszeniu z acetonu, rozpuszczono w wodzie (160 mL) i dializowano przez 3 dni wobec wody Milli-Q. Roztwór następnie liofilizowano otrzymując 1,012 g (33%) białego proszku.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 1,34 (t, 3H), 2,33 (s, 6H, gr. końcowa), 2,91 (m, 2H, gr. końcowa), 3,07 (s, 6H, gr. końcowa), 3,20 (bs, 24H), 3,45 (m, 2H, gr. końcowa), 4,14-4,21 (m, 10H), 4,75 (m, 8H + 4H z gr. końcowej), 7,35-7,46 (m, 3H), 7,67-7,77 (m, 4H); skł. pierw.: C, 41,71; H, 6,99; N, 6,43%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O} \cdot 4\text{H}_2\text{O})_n$: C, 41,11; H, 6,90; N, 6,39%,

C0-T-p-T: wydajność syntezy 20%

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 2,23 (s, 6H, gr. końcowa), 2,90 (m, 2H, gr. końcowa), 3,07 (s, 6H, gr. końcowa), 3,20 (bs, 24H), 3,45 (m, 2H, gr. końcowa), 4,20 (bs, 8H), 4,75 (m, 8H + 4H z gr. końcowej), 7,67-7,90 (m, 8H); skł. pierw.: C, 39,12; H, 6,76; N, 6,63%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{Br}_4\text{N}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})_n$: C, 39,55; H, 6,87; N, 6,59%,

C4-T-p-T: wydajność syntezy 34%

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 0,83 (t, 3H), 1,36 (m, 2H), 1,68 (m, 2H), 2,22 (s, 6H, gr. końcowa), 2,90 (m, 2H, gr. końcowa), 3,06 (s, 6H, gr. końcowa), 3,20 (bs, 24H), 3,44 (m, 2H, gr. końcowa), 4,08-4,20 (m, 10H), 4,75 (m, 8H + 4H z gr. końcowej), 7,35-7,45 (m, 3H), 7,68-7,76 (m, 4H); skł. pierw.: C, 42,10; H, 7,33; N, 6,41%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O} \cdot 4\text{H}_2\text{O})_n$: C, 42,49; H, 7,13; N, 6,19%,

C8-T-p-T: wydajność syntezy 50%

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 0,74 (t, 3H), 1,14-1,33 (m, 12H), 1,65 (m, 2H), 2,32 (s, 6H, gr. końcowa), 3,06 (m, 2H, gr. końcowa), 3,06 (s, 6H, gr. końcowa), 3,20 (bs, 24H), 3,50 (m, 2H,

terminal), 4,09-4,20 (m, 10H), 7,37-7,44 (m, 3H), 7,68-7,76 (m, 4H; skł. pierw.: C, 44,13; H, 7,74; N, 5,82%; teoretyczny skł. dla $(C_{36}H_{64}Br_4N_4O \cdot 5H_2O)_n$: C, 44,18; H, 7,62; N, 5,73%.

C12-T-p-T: wydajność syntezy 68%

1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 0,90 (t, 3H), 1,29-1,48 (m, 12H), 1,78 (m, 2H) 2,33 (s, 6H, gr. końcowa), 2,88 (m, 2H, gr. końcowa), 3,20 (s, 6H, gr. końcowa), 3,41 (m, 24H), 3,58 (m, 2H, terminal), 4,08 (bs, 2H), 4,42 (bs, 8H), 4,75 (m, 8H + 4H z gr. końcowej), 7,09-7,91 (m, 7H); skł. pierw.: C, 47,43; H, 8,10; N, 5,63%; teoretyczny skł. dla $(C_{40}H_{72}Br_4N_4O \cdot 4H_2O)_n$: C, 47,25; H, 7,93; N, 5,51%,

Jony serii Cn-T-m-T

Poniżej przedstawiono ogólną procedurę syntezy jonenów C2-T-m-T, C4-T-m-T, C8-m-p-T i C12-m-p-T na przykładzie C2-T-p-T.

C2-T-m-T

Do roztworu **17** (1,964 g, 3,96 mmol) w DMSO (5,6 mL) z dodatkiem wody (2 mL) wdroplono roztwór **15-C2** (1,109 g, 3,60 mmol) w DMSO (4 mL). Reakcję prowadzono w 25 °C przez 24 h. Po tym czasie mieszaninę wlało do nadmiaru acetonu (400 mL), a z powstałej zawiesiny wydzielono osad poprzez wirowanie. Osad, po wysuszeniu z acetonu, rozpuszczono w wodzie (160 mL) i dializowano przez 3 dni wobec wody Milli-Q. Roztwór następnie liofilizowano otrzymując 1,495 g (49%) białego proszku.

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 1,34 (t, 3H), 2,33 (s, 6H, gr. końcowa), 2,91 (m, 2H, gr. końcowa), 3,07 (s, 6H, gr. końcowa), 3,20 (bs, 24H), 3,45 (m, 2H, gr. końcowa), 4,14-4,21 (m, 10H), 7,35-7,46 (m, 3H), 7,67-7,77 (m, 4H); skł. pierw.: C, 41,54; H, 7,03; N, 6,55%; teoretyczny skł. dla $(C_{30}H_{52}Br_4N_4O \cdot 4H_2O)_n$: C, 41,11; H, 6,90; N, 6,39%.

C4-T-m-T: wydajność syntezy 34%

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 0,83 (t, 3H), 1,36 (m, 2H), 1,68 (m, 2H) 2,22 (s, 6H, gr. końcowa), 2,90 (m, 2H, gr. końcowa), 3,06 (s, 6H, gr. końcowa), 3,20 (bs, 24H), 3,44 (m, 2H, gr. końcowa), 4,08-4,20 (m, 10H), 7,35-7,45 (m, 3H), 7,68-7,76 (m, 4H); skł. pierw.: C, 41,89; H, 7,18; N, 6,33%; teoretyczny skł. dla $(C_{32}H_{56}Br_4N_4O \cdot 4H_2O)_n$: C, 42,49; H, 7,13; N, 6,19%.

C8-T-m-T: wydajność syntezy 34%

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 0,74 (t, 3H), 1,14-1,33 (m, 12H), 1,65 (m, 2H) 2,32 (s, 6H, gr. końcowa), 3,06 (m, 2H, gr. końcowa), 3,06 (s, 6H, gr. końcowa), 3,20 (bs, 24H), 3,50 (m, 2H,

gr. końcowa), 4,09-4,20 (m, 10H), 7,37-7,44 (m, 3H), 7,68-7,76 (m, 4H); skł. pierw.: C, 43,79; H, 7,51; N, 5,84%; teoretyczny skł. dla $(C_{36}H_{64}Br_4N_4O \cdot 6H_2O)_n$: C, 43,38; H, 7,69; N, 5,62%.

C12-T-m-T: wydajność syntezy 68%

1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 0,90 (t, 3H), 1,29-1,48 (m, 12H), 1,78 (m, 2H) 2,33 (s, 6H, gr. końcowa), 2,88 (m, 2H, gr. końcowa), 3,20 (s, 6H, gr. końcowa), 3,41 (m, 24H), 3,58 (m, 2H, gr. końcowa), 4,08 (bs, 2H), 4,42 (bs, 8H), 7,09-7,91 (m, 7H) ; skł. pierw.: C, 46,15; H, 7,69; N, 5,09%; teoretyczny skł. dla $(C_{40}H_{72}Br_4N_4O \cdot 5H_2O)_n$: C, 46,43; H, 7,99; N, 5,41%.

Jony serii Cn-D-p-D

Poniżej przedstawiono ogólną procedurę syntezy jonenów C0-D-p-D, C2-D-p-D, C4-D-p-D, C8-D-p-D i C12-D-p-D na przykładzie C2-D-p-D.

C2-D-p-D

Do roztworu **18** (1,932 g, 3,96 mmol) w DMSO (26 mL) z dodatkiem wody (2 mL) wkroplono roztwór **15-C2** (1,109 g, 3,60 mmol) w DMSO (4 mL). Reakcję prowadzono w 25 °C przez 24 h. Po tym czasie mieszaninę wlało do nadmiaru acetonu (400 mL), a z powstałej zawiesiny wydzielono osad poprzez wirowanie. Osad, po wysuszeniu z acetonu, rozpuszczono w wodzie (160 mL) i dializowano przez 3 dni wobec wody Milli-Q. Roztwór następnie liofilizowano otrzymując 1,495 g (49%) białego proszku.

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 1,33 (t, 3H), 3,12 (m, 6H, gr. końcowa), 3,44 (m, 6H, gr. końcowa), 4,03 (m, 26H), 4,53 (s, 4H, gr. końcowa), 4,84 (m, 8H), 7,28 (s, 3H), 7,70 (m, 4H); skł. pierw.: C, 40,37; H, 6,36; N, 6,57%; teoretyczny skł. dla $(C_{30}H_{44}Br_4N_4O \cdot 5H_2O)_n$: C, 40,65; H, 6,14; N, 6,32%.

C0-D-p-D: wydajność syntezy 30%

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3,12 (m, 6H, gr. końcowa), 3,44 (m, 6H, gr. końcowa), 4,02 (m, 26H), 4,53 (s, 4H, gr. końcowa), 4,84 (m, 8H), 7,28 (s, 3H), 7,64-7,73 (m, 8H); skł. pierw.: C, 38,13; H, 6,17; N, 6,42%; teoretyczny skł. dla $(C_{36}H_{64}Br_4N_4O \cdot 7H_2O)_n$: C, 38,29; H, 6,20; N, 6,38%.

C4-D-p-D: wydajność syntezy 20%

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 0,87 (t, 3H), 1,40 (m, 2H), 1,70 (m, 2H), 3,11 (m, 6H, gr. końcowa), 3,44 (m, 6H, gr. końcowa), 4,02 (m, 26H), 4,52 (s, 4H, gr. końcowa), 4,84 (m, 8H), 7,28 (s, 3H), 7,70 (m, 4H); skł. pierw.: C, 42,06; H, 6,78; N, 6,39%; teoretyczny skł. dla $(C_{32}H_{48}Br_4N_4O \cdot 5H_2O)_n$: C, 42,03; H, 6,39; N, 6,13%.

C8-D-p-D: wydajność syntezy 60%

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 0,89-1,74 (m, 15H), 3,13 (m, 6H, gr. końcowa), 3,43 (m, 6H, gr. końcowa), 4,03 (bs, 26H), 4,79 (s, 4H, gr. końcowa), 4,79 (s, 8H), 7,29 (s, 3H), 7,76 (m, 4H); skł. pierw.: C, 44,03; H, 7,09; N, 5,86%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O} \cdot 6\text{H}_2\text{O})_n$: C, 44,55; H, 6,85; N, 5,77%.

C12-D-p-D: wydajność syntezy 53%

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 0,83 (m, 3H), 1,22-1,37 (m, 18H), 1,70 (bs, 2H), 3,00 (m, 6H, gr. końcowa), 3,36 (m, 6H, gr. końcowa), 4,00 (m, 26H), 4,92 (s, 4H, gr. końcowa), 4,87 (bs, 8H), 7,01-7,37 (m, 3H), 7,65-7,72 (m, 4H); skł. pierw.: C, 48,85; H, 7,82; N, 5,82%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O} \cdot 3\text{H}_2\text{O})_n$: C, 48,50; H, 7,12; N, 5,66%.

Jony serii Cn-D-m-D

Poniżej przedstawiono ogólną procedurę syntezy jonenów C0-D-m-D, C2-D-m-D, C4-D-m-D, C8-D-m-D i C12-D-m-D na przykładzie C2-D-m-D.

C2-D-m-D

Do roztworu **19** (1,934 g, 3,96 mmol) w DMSO (5,6 mL) z dodatkiem wody (0,48 mL) wkroplono roztwór **15-C2** (1,109 g, 3,60 mmol) w DMSO (4 mL). Reakcję prowadzono w 25 °C przez 24 h. Po tym czasie mieszaninę wlało do nadmiaru acetonu (400 mL), a z powstałej zawiesiny wydzielono osad poprzez wirowanie. Osad, po wysuszeniu z acetonu, rozpuszczono w wodzie (160 mL) i dializowano przez 3 dni wobec wody Milli-Q. Roztwór następnie liofilizowano otrzymując 1,418 g (47%) białego proszku.

^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 1,37 (t, 3H), 3,14 (m, 6H, gr. końcowa), 3,46 (m, 6H, gr. końcowa), 4,10 (m, 26H), 4,56 (s, 4H, gr. końcowa), 4,87 (m, 8H), 7,31 (s, 3H), 7,77 (m, 4H); skł. pierw.: C, 39,87; H, 6,41; N, 6,38%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O} \cdot 6\text{H}_2\text{O})_n$: C, 39,84; H, 6,24; N, 6,19%.

C0-D-m-D: wydajność syntezy 32%

^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 3,14 (m, 6H, gr. końcowa), 3,47 (m, 6H, gr. końcowa), 4,06 (m, 26H), 4,57 (s, 4H, gr. końcowa), 4,86 (m, 8H), 7,77 (m, 8H); skł. pierw.: C, 39,21; H, 6,25; N, 6,80%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{Br}_4\text{N}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O})_n$: C, 39,09; H, 6,09; N, 6,51%.

C4-D-m-D: wydajność syntezy 48%

^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 0,89 (t, 3H), 1,43 (m, 2H), 1,74 (m, 2H), 3,14 (m, 6H, gr. końcowa), 3,46 (m, 6H, gr. końcowa), 4,06 (m, 26H), 4,56 (s, 4H, gr. końcowa), 4,87 (m, 8H), 7,32 (s, 3H), 7,77 (m, 4H); skł. pierw.: C, 41,26; H, 6,42; N, 6,22%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O} \cdot 6\text{H}_2\text{O})_n$: C, 41,22; H, 6,49; N, 6,01%.

C8-D-m-D: wydajność syntezy 66%

^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 0,89-1,74 (m, 15H), 3,13 (m, 6H, gr. końcowa), 3,43 (m, 6H, gr. końcowa), 4,03 (m, 26H), 4,79 (s, 4H, gr. końcowa), 4,79 (s, 8H), 7,29 (s, 3H), 7,76 (m, 4H); skł. pierw.: C, 44,08; H, 7,06; N, 5,98%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O} \cdot 6\text{H}_2\text{O})_n$: C, 44,55; H, 6,85; N, 5,77%.

C12-D-m-D: wydajność syntezy 57%

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 0,82 (m, 3H), 1,20-1,38 (m, 18H), 1,71 (bs, 2H), 3,00 (m, 6H, gr. końcowa), 3,34 (m, 6H, gr. końcowa), 4,01 (m, 26H), 4,91 (bs, 8H), 7,03-7,38 (m, 3H), 7,59-7,80 (m, 4H); skł. pierw.: C, 48,21; H, 7,45; N, 5,66%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O} \cdot 3\text{H}_2\text{O})_n$: C, 48,50; H, 7,12; N, 5,66%.

Jony serii Cn-D-PEG-D

Poniżej przedstawiono ogólną procedurę syntezy jonenów C0-D-PEG-D, C2-D-PEG-D, C4-D-PEG-D, C8-D-PEG-D i C12-D-PEG-D na przykładzie C2-D-PEG-D.

C2-D-PEG-D

Do roztworu **20** (672,0 mg, 1,04 mmol) w DMSO (0,7 mL) z dodatkiem wody (40 μL) wkroplono roztwór **15-C2** (277,2 mg, 0,90 mmol) w DMSO (1 mL). Reakcję prowadzono w 25 °C przez 24 h. Po tym czasie mieszaninę wleto do nadmiaru acetonu (100 mL), a z powstałej zawiesiny wydzielono osad poprzez wirowanie. Osad, po wysuszeniu z acetonu, rozpuszczono w wodzie (40 mL) i dializowano przez 3 dni wobec wody Milli-Q. Roztwór następnie liofilizowano otrzymując 376,1 mg (40%) białego proszku.

^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 1,35 (t, 3H), 3,12 (m, 6H, gr. końcowa), 3,29 (s, 3H), 3,45 (m, 6H, gr. końcowa), 3,54 (m, 2H), 3,60 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 3,71 (m, 2H), 3,88 (m, 2H), 4,05 (m, 26H), 4,25 (m, 2H), 4,50 (s, 2H, gr. końcowa), 4,79 (m, 8H), 7,29 (m, 3H), 7,33 (m, 3H); skł. pierw.: C, 42,51; H, 6,91; N, 5,80%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O})_n$: C, 42,38; H, 6,54; N, 5,34%.

C0-D-PEG-D: wydajność syntezy 56%

^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 3,13 (m, 6H, gr. końcowa), 3,30 (s, 3H), 3,45 (m, 6H, gr. końcowa), 3,55 (m, 2H), 3,62 (m, 2H), 3,66 (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 3,89 (m, 2H), 4,05 (m, 26H), 4,26 (m, 2H), 4,51 (s, 2H, gr. końcowa), 4,86 (m, 8H), 7,34 (m, 3H), 7,75 (m, 4H); skł. pierw.: C, 42,40; H, 6,25; N, 5,96%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O})_n$: C, 42,61; H, 6,33; N, 5,68%.

C4-D-PEG-D: wydajność syntezy 42%

^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 0,87 (t, 3H), 1,40 (m, 2H), 1,71 (m, 2H), 3,11 (m, 6H, gr. końcowa), 3,28 (s, 3H), 3,43 (m, 6H, gr. końcowa), 3,53 (m, 2H), 3,59 (m, 2H), 3,64 (m, 2H), 3,69 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 4,03 (m, 26H), 4,23 (m, 2H), 4,50 (s, 2H, gr. końcowa), 4,79 (m, 8H), 7,28 (m, 3H), 7,31 (m, 3H); skł. pierw.: C, 43,53; H, 6,87; N, 5,52%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O})_n$: C, 43,51; H, 6,74; N, 5,20%.

C8-D-PEG-D: wydajność syntezy 28%

^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 0,64 (t, 3H), 1,03 - 1,70 (m, 12H), 3,11 (m, 6H, gr. końcowa), 3,21 (s, 3H), 3,25 (m, 6H, gr. końcowa), 3,43 - 3,68 (m, 8H), 3,86 (m, 2H), 4,04 (m, 26H), 4,22 (m, 2H), 4,48 (s, 2H, gr. końcowa), 4,79 (m, 8H), 7,34 (m, 6H); skł. pierw.: C, 44,94; H, 7,23; N, 5,25%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 6\text{H}_2\text{O})_n$: C, 44,88; H, 7,18; N, 4,87%.

C12-D-PEG-D: wydajność syntezy 30%

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): ze względu na silne nakładanie się sygnałów zrezygnowałem z opisu, widmo zaprezentowałem w Załączniku 2 jako Rysunek Z2.6; skł. pierw.: C, 48,51; H, 7,59; N, 5,10%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{47}\text{H}_{78}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 4\text{H}_2\text{O})_n$: C, 48,21; H, 7,40; N, 4,79%.

p-T-p-T

Do roztworu TMEDA (0.805 g, 1.040 mL, 6.93 mmol) w MeOH (13 mL) wkleplono roztwór **15-C0** (1.663 mg, 6.30 mmol) w DMF (14 mL). Reakcję prowadzono w 25 °C przez 96 h. W celu utrzymania homogeniczności mieszaniny po 8 i 24 h dodano odpowiednio 14 i 35 mL wody. Następnie mieszaninę rozcieńczono wodą (80 mL) i dializowano przez 3 dni wobec wody Milli-Q. Roztwór następnie liofilizowano otrzymując 477 mg (20%) białego osadu.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 2,25 (s, 6H, gr. końcowa), 2,93 (m, 2H, gr. końcowa), 3,06 (s, 6H, gr. końcowa), 3,20 (s, 24H), 3,46 (m, 2H, gr. końcowa), 4,20 (m, 8H), 4,57 (m, 2H, gr. końcowa), 4,74 (m, 8H) 7,70 (m, 8H); skł. pierw.: C, 39,95; H, 7,08; N, 6,73%; teoretyczny skł. dla $(\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{Br}_4\text{N}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O})_n$: C, 40,40; H, 6,78; N, 6,73%.

p-D-p-D

Do roztworu **18** (2,000 g, 4,10 mmol) w DMSO (46 mL) z dodatkiem wody (5 mL) wdroplono roztwór α,α' -dibromo-*p*-ksylenu (0,983, 3,73 mmol) w DMSO (37 mL). Reakcję prowadzono w 25 °C przez 24 h, po czym wleto ją do nadmiaru acetonu (800 mL) z dodatkiem heksanu (400 mL) i odwirowano powstałą zawiesinę. Następnie osad przemyto acetonem i Et₂O, po czym wysuszono pod próżnią. W celu usunięcia pozostałości DMSO osad macerowano przy pomocy MeOH (120 mL) przez 2 h. Po oddzieleniu fazy MeOH osad przemyto świeżym MeOH (2 x 50 mL) i wysuszono pod próżnią. W celu ilościowego usunięcia MeOH osad rozpuszczono w wodzie i liofilizowano otrzymując 1,59 g (53%) białego osadu.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 3,20 (t, 6H, gr. końcowa), 3,51 (t, 6H, gr. końcowa), 4,06 (s, 24H), 4,58 (s, 2H, gr. końcowa), 4,86 (m, 8H), 7,73 (m, 8H); skł. pierw.: C, 41,34; H, 5,86; N, 7,11%; teoretyczny skł. dla (C₂₈H₄₀Br₄N₄·4H₂O)_n: C, 40,80; H, 5,87; N, 6,80%.

14. Badania nad kinetyką reakcji eliminacji Hofmanna soli amoniowych

Kinetyka rozpadu soli 5 i 8

Sól **5** (20,0 mg, 0,05 mmol) lub **8** (16,2 mg, 0,05 mmol) rozpuszczono w 0,6 M LiOD_{aq} (1 mL) sporządzonym w wodzie deuterowanej, po czym roztwór przeniesiono do probówki NMR, w atmosferze gazu obojętnego, probówkę inkubowano w 25 °C. W celu pomiaru widma ¹H NMR probówkę każdorazowo wyciągano z łaźni na czas pomiaru (ok. 15 min).

Kinetyka rozpadu soli 6

Sól **6** (30,3 mg, 0,05 mmol) rozpuszczono w 0,06 M LiOD_{aq} (1 mL) sporządzonym w wodzie deuterowanej. Kolejne czynności były wykonane analogicznie do badań nad solami **5** i **8**.

Kinetyka rozpadu soli 7

Do termostatowanego w 25 °C i dobrze mieszanego roztworu soli **7** (279,4 mg, 0,35 mmol) w wodzie (3,5 mL) dodano, uprzednio podgrzany do 25°C, roztwór LiOH·H₂O (17,6 mg, 0,42 mmol) w wodzie (3,5 mL). Z mieszaniny reakcyjnej, po zadanym okresie czasu, pobierano próbki (700 μ L) i natychmiast wstrzykiwano je do 0,2 M HCl_(aq) (1 mL) w celu zatrzymania reakcji. Otrzymane mieszaniny liofilizowano, a otrzymany osad rozpuszczano w wodzie deuterowanej i rejestrowano widma ¹H NMR.

Kinetyka rozpadu soli 9

Do termostatowanego w 25 °C i dobrze mieszanego roztworu soli **9** (190,8 mg, 0,45 mmol) w wodzie (4,5 mL) dodano, uprzednio podgrzany do 25 °C, roztwór LiOH·H₂O (22,7 mg, 0,54

mmol) w wodzie (4,5 mL). Pozostałe czynności były wykonane analogicznie do badań nad solą 7.

W celu zweryfikowania zasadności zastosowanej metody zatrzymywania reakcji, pobrano dwie próbki z reakcji eliminacji 7 po czasie odpowiadającym 70% konwersji. Obie próbki wstrzyknięto do roztworu $\text{HCl}_{(\text{aq})}$, po czym jedną z nich natychmiast zliofilizowano, a drugą pozostawiono na 4 dni w temperaturze pokojowej przed liofilizacją. Zarejestrowane widma ^1H NMR obu próbek nie różniły się znacząco między sobą.

Kinetyka rozpadu wybranych soli w roztworze Na_2CO_3

Odpowiednią ilość soli 7, 8 lub **Me₂-L-PEI** (0,05 mmol) rozpuszczono w 0,1 M roztworze Na_2CO_3 w wodzie deuterowanej, po czym otrzymaną mieszaninę przeniesiono w atmosferze argonu do próbki NMR, próbkę inkubowano w 25 °C. W celu pomiaru widma ^1H NMR próbkę każdorazowo wyciągana z łaźni na czas pomiaru (ok. 15 min).

15. Badania nad wpływem jonenów na fluorescencję kalceiny

Do kuwetki kwarcowej zawierającej roztwór polimeru o pożądanym stężeniu w PBS (2 mL) dodawano porcjami (2 μL) 80 mM roztwór kalceiny w PBS. Po każdej porcji rejestrowano emisję fluorescencji dla długości 515 nm po wzbudzeniu przez 490 nm. Otrzymane dane wykorzystano do sporządzenia krzywej kalibracji, współczynnik kierunkowy wyznaczono przy pomocy regresji liniowej w programie Microsoft Excel 2016.

16. Badania na liposomach

16.1. Przygotowanie liposomów

Liposomy wypełnione PBS

Roztwór lipidów w chloroformie (200 μL) o stężeniu 25 mg/mL umieszczono w kolbie okrągłodennej i odparowano chloroform w strumieniu argonu. W celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika film lipidowy suszono w warunkach próżniowych (2 mbar) przez 30 min w temperaturze pokojowej, po czym zamknięto w atmosferze argonu. Następnie dodano PBS (1 mL) i całość intensywnie wytrząsano przez 30 min do całkowitego uwodnienia lipidów. Otrzymana zawiesina została poddana ekstruzji 31 razy przy pomocy mini-ekstrudera (Avanti® Mini-Extruder) wyposażonego w filtr 100 nm.

Liposomy wypełnione roztworem kalceiny

Przygotowano zawiesinę LUV analogicznie do procedury przedstawionej powyżej dla liposomów wypełnionych PBS, z jedną różnicą: do uwodnienia lipidów użyto 40 mM roztworu

kalceiny w 10 mM buforze fosforanowym pH 7,4. Następnie w celu usunięcia nadmiarowej kalceiny zawiesinę LUV przepuszczono przez kolumnę chromatograficzną wypełnioną Sephadex G-50, jako fazę ruchomą zastosowano PBS. Całą frakcję zawierającą lipidy rozcieńczono do końcowego stężenia 220 µg/mL (ok. 290 µM) i tak otrzymaną zawiesinę, nazywaną dalej roztworem wyjściowym LUV z kalceiną, przechowywano w lodówce i wykorzystano w ciągu 48 h.

W celu potwierdzenia ilościowego charakteru oczyszczania liposomów przy pomocy chromatografii kolumnowej oznaczono stężenie PC w otrzymanej zawieszynie wyjściowej LUV z kalceiną złożonych z POPC przy pomocy komercyjnego kitu służącego do oznaczania fosfatydylocholine (Phosphatidylcholine Assay Kit, Sigma-Aldrich). Wyniki analizy wykazały, że stężenie lipidów wynosi 276 ± 13 µM, co zadowalająco odpowiada teoretycznemu stężeniu 290 µM.

Liposomy barwione czerwieni Nilu

Przygotowano zawiesinę LUVs analogicznie do procedury przedstawionej dla liposomów wypełnionych PBS, z jedną różnicą: do chloroformowego roztworu lipidów (200 µL; 25 mg/mL) dodano acetonowy roztwór czerwieni Nilu (4 µL; 2,5 mg/mL) przed odparowanie rozpuszczalników.

16.2. Badania na LUV

Badania z wykorzystaniem DLS

Przygotowano serię kolejnych 2-krotnych rozcieńczeń polimerów w PBS w zakresie stężeń od 0,16 µg/mL do 40 µg/mL (po 1 mL). Następnie dodano zawiesinę LUV wypełnionych PBS osiągając końcowe stężenie lipidów 7,6 µg/mL (ok 10 µM), w taki sposób, aby każda z próbek była inkubowana przed pomiarem przez 2 h w 25 °C. Po inkubacji zmierzono średnicę dynamiczną oraz zeta-potencjał otrzymanych cząstek. Zawiesinę LUVs inkubowaną w samym PBS wykorzystano jako kontrolę negatywną. Do badań wykorzystano aparat Zetasizer Nano (Malvern Instruments UK). Wielkość cząsteczek (po intensywności rozpraszania światła) oraz zeta-potencjał obliczono przy pomocy oprogramowania dostarczonego przed producenta aparatu. Detektor znajdował się pod kątem 173°. Zeta-potencjał obliczono na podstawie mobilności elektroforetycznej stosując równanie Smoluchowskiego.

Uwalnianie kalceiny z liposomów

Roztwór wyjściowy LUV z kalceiną rozcieńczono w kuwecie kwarcowej, zaopatrzonej w magnetyczny element mieszający, w PBS do stężenia lipidów 7,6 µg/mL (ok 10 µM). Kuweczkę

umieszczono następnie w termostатовanej przystawce do spektrofлуorymetru (FP-8500, Jasco) i roztwór mieszano przez 60 s w 25 °C. Po tym czasie dodano roztwór polimeru w PBS osiągając odpowiednie stężenie końcowe i dalej monitorowano fluorescencję przez 15 min ciągle mieszając. Mierzono emisję dla długości 515 nm przy wzbudzeniu 490 nm. Kontrolą pozytywną, wywołującą uwolnienie całej kalceiny (100%) był 1% roztwór Triton-X100 (60 μL), natomiast za kontrolę negatywną posłużyła inkubacja LUV w samym PBS (0%). Kontrole rejestrowano dla każdej szerszy liposomów. Procent wypływu kalceiny pod wpływem badanych związków obliczano przy pomocy poniższego równania:

$$\text{Wpływ kalceiny (t)} = \frac{I_p(t) \cdot A - I_{K(-)}(t)}{I_{K(+)} - I_{K(-)}(t)} \cdot 100\%$$

gdzie:

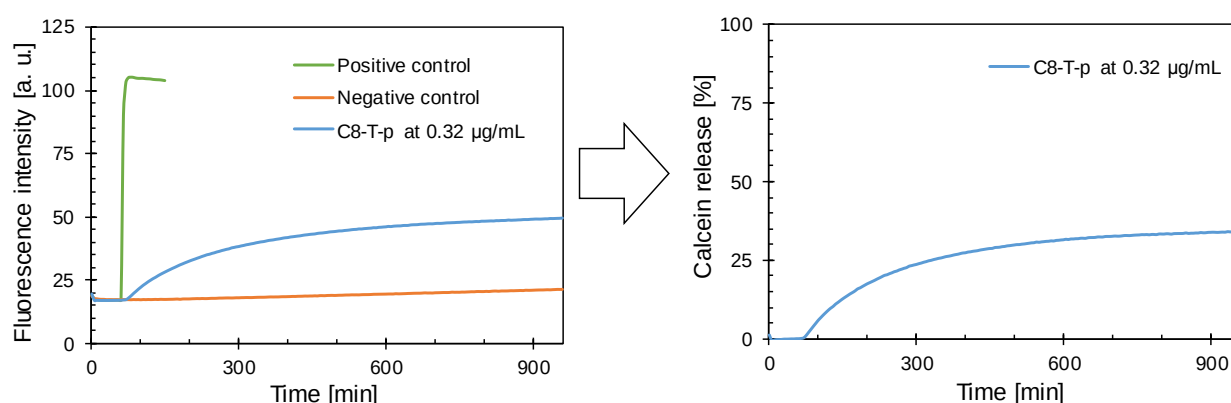
$I_p(t)$ –intensywność fluorescencji po inkubacji z polimerem po czasie t ,

$I_{K(-)}(t)$ – intensywność fluorescencji po inkubacji z samym PBS po czasie t (kontrola negatywna; 0%wypływu),

$I_{K(+)}$ – intensywność fluorescencji po dodaniu Triton-X100 do końcowego stężenia 0.03% v/v (kontrola pozytywna; 100% wypływu),

A - współczynnik wygaszenia kalceiny przez zastosowany polimer (Tabela 10, Podpunkt 10.2.1.2.)

Poniżej przedstawiono przykładowe przekształcenie surowych wyników (intensywność fluorescencji) przy pomocy powyższego równania:



Obserwacja mikroskopowa LUV barwionych czerwieni Nilu

Do zawiesiny LUV barwionych czerwieni nilu dodano roztwór odpowiedniego polimeru, aby otrzymać końcowe stężenie lipidów 625 µg/mL oraz polimeru 105 µg/mL lub 420 µg/mL, po czym otrzymaną mieszaninę inkubowano przez 20 min w 25 °C. Następnie, naniesiono ją na szkiełko mikroskopowe i obserwowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego BX53 (Olympus) z olejkiem imersyjnym stosując obiektyw o powiększeniu 100x (Olympus). Zdjęcia wykonano przy pomocy kamery DP74 (Olympus).

17. Badania biologiczne

17.1. Oznaczenia MIC, MBC, MFC i kinetyki zabijania

Minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC)

Do pożywki wzrostowej (5 mL; MHB lub SAB) dodano pojedynczą kolonię bakterii lub drożdży, po czym całość inkubowano w 37 °C przez noc, wytrząsając z szybkością 240 rpm (Lab Companion SI-600R, Ramsey, MN, USA). Następnie hodowlę nocną rozcieńczono w odpowiedniej pożywce do 10⁵ CFU/mL w przypadku bakterii, oraz do 10³ CFU/mL w przypadku drożdżaków, i tak przygotowane zawiesiny mikroorganizmów użyto do badań. Roztwory polimerów o stężeniu 5120 µg/mL w wodzie Milli-Q rozcieńczono odpowiednią pożywką wzrostową do stężenia 1024 µg/mL i tak przygotowane roztwory wykorzystano do przygotowania serii dwukrotnych rozcieńczeń na płytce 96-dółkowej w odpowiedniej pożywce (od 512 µg/mL do 2 µg/mL; po 100 µL w każdym dołku). Następnie do każdego dołka dodano 100 µL zawiesiny odpowiednich mikroorganizmów. Pożywka bez inokulum posłużyła jako kontrola negatywna, natomiast pożywka z inokulum jako kontrola pozytywna wzrostu bakterii. Dla każdego stężenia polimeru wykonano cztery powtórzenia. Płytke następnie inkubowano przez 20 h w 37°C. Po tym czasie zmierzono absorbancję przy długości fali 600 nm (OD₆₀₀) używając czytnika płytek wielodółkowych Synergy™ H4 Hybrid Microplate Reader (Biotech Winooski, VT, USA). Oznaczona wartość MIC jest najniższym badanym stężeniem, dla którego nie odnotowano wzrostu bakterii.

Minimalne stężenie bakterio i grzybobójcze w pożywce (MBC_{MHB} i MFC_{SAB})

Przygotowano hodowlę nocną zgodnie z procedurą stosowaną do wyznaczania MIC, którą następnie rozcieńczono 100-krotnie świeżą pożywką wzrostową i inkubowano w 37 °C wytrząsając (240 rpm) do czasu, aż OD₆₀₀ osiągnęło wartość 0,6. Tak otrzymaną zawiesinę mikroorganizmów w wykładniczej fazie wzrostu ponownie rozcieńczono 100-krotnie świeżą pożywką do 10⁵ CFU/mL, po czym inkubowano z roztworami polimerów o odpowiednim

stężeniu, przygotowanymi analogicznie z procedurą MIC. Po 2 h inkubacji w 37 °C wykonano serię 10-krotnych rozcieńczeń w PBS na płytce 96-dołkowej. Pożywka wzrostowa z inokulum posłużyła jako kontrola pozytywna wzrostu mikroorganizmów. Dla każdego stężenia polimeru wykonano cztery powtórzenia. Następnie naniesiono na szalki z agarową pożywką wzrostową po 10 µL, w przypadku bakterii, lub 5 µL, w przypadku drożdży, każdego z rozcieńczeń. Szalki inkubowano w 37 °C przez 20 h, po czym policzono liczbę powstałych kolonii. Oznaczone wartości MBC_{MHB} i MFC_{SAB} są najniższymi badanymi stężeniami, dla których żywotność mikroorganizmów była niższa niż 0,1% żywotności kontroli pozytywnej.

Minimalne stężenie bakterio i grzybobójcze w PBS (MBC_{PBS} i MFC_{PBS})

Badania w PBS przeprowadzono analogicznie do powyższych oznaczeń w pożywkach wzrostowych, z wyjątkiem dwóch różnic: zawiesinę mikroorganizmów w wykładniczej fazie wzrostu (1,5 mL) odwirowano, po czym wyizolowane komórki przemyto PBS (2 x 1,5 mL), zawieszono w PBS (1,5 mL) i rozcieńczono 100-krotnie w PBS do 10^5 CFU/mL; roztwory polimerów rozcieńczono w PBS zamiast w pożywkach wzrostowych.

Kinetyka zabijania bakterii

Zawiesinę bakterii w wykładniczej fazie wzrostu (180 µL), otrzymaną zgodnie z przedstawioną powyżej procedurą oznaczania MBC_{MHB} , dodano do roztworów polimerów (20 µL) w wodzie Milli-Q o stężeniach 10, 20 i 40 x MIC, otrzymując końcowe stężenia odpowiednio 1, 2 i 4 x MIC. Dla każdego stężenia polimeru wykonano cztery powtórzenia. Pożywka wzrostowa z inokulum posłużyła jako kontrola pozytywna przeżywalności mikroorganizmów. Tak otrzymaną płytkę 96-dołkową inkubowano w 37 °C. Po upływie 5, 10, 20, 40, 60 i 120 min pobierano z każdego dołka próbkę (20 µL) i wykonywano serię 10-krotnych rozcieńczeń w PBS. Następnie naniesiono na szalki z agarową pożywką wzrostową po 10 µL każdego z rozcieńczeń i inkubowano je w 37 °C przez 20 h, po czym policzono liczbę powstałych kolonii.

MIC wobec izolowanych szczepów klinicznych, w tym prątków gruźlicy

Badania te zostały w całości wykonane w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie po dostarczeniu materiału do badań w postaci stałej.

17.2. Badania nad cytotoksycznością

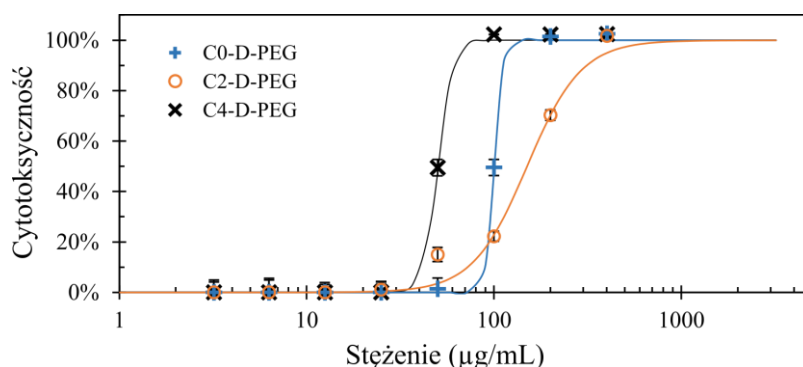
Właściwości hemolityczne (badania wykonane przez mgr inż. Aleksandrę Kuźmińską oraz dr inż. Ilonę Łojaszczyk w Laboratorium Inżynierii Biomedycznej na Wydziale IChP PW po dostarczeniu roztworów jonów o odpowiednich stężeniach)

Świeżą próbkę krwi pozyskano z Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie. Odwirowano eryocyty (700 g, 10 min), a następnie przemyto zimnym PBS i odwirowano trzykrotnie (700 g, 10 min). Po ostatnim wirowaniu eryocyty zawieszono w 10-krotnie większej objętości PBS. Tak otrzymaną zawiesinę (0.5 mL) dodano do roztworów polimerów w PBS (0.5 mL) i mieszaniny inkubowano przez 1 h w 37 °C. Następnie komórki odwirowano (700 g, 10 min) i zmierzono absorbancję supernatantów przy długości fali 540 nm. Pomiarzy dla supernatantów po inkubacji erytrocytów z samym PBS i z 0.2% Triton X-100 posłużyły za odpowiednio kontrolę negatywną (0%) i pozytywną (100%).

Badania na mysich fibroblastach (badania wykonane wspólnie z mgr inż. Rafałem Podgórskim w Laboratorium Inżynierii Biomedycznej na Wydziale IChP PW)

Komórki mysich fibroblastów linii L929 były hodowane w butelce do hodowli komórkowych o powierzchni 75 cm² w 37 °C w atmosferze 5% CO₂. Roztwory polimerów o stężeniu 2,5 mg/mL w DMEM poddano sterylizacji poprzez filtrację przez filtr membranowy 0,22 µm wykonany z polisulfonu (PES). Do badań z dodatkiem FBS do sterylnego roztworu dodano FBS do stężenia końcowego 10% v/v. Docelowe stężenia polimerów uzyskano poprzez rozcieńczenie sterylnych roztworów przy pomocy DMEM lub DMEM z dodatkiem 10% v/v FBS. Przed wykonaniem pomiarów, w płytce 96-dołkowej umieszczono zawiesinę komórek (100 µL na dołek; 10⁵ komórek/mL) i inkubowano ją w 37°C pod atmosferą zawierającą 5% CO₂ przez 24 h. Następnie usunięto pożywkę i zastąpiono ją roztworami polimerów o docelowych stężeniach, po czym płytkę inkubowano przez kolejne 24 h w tych samych warunkach. Usunięto roztwory polimerów, komórki przemyto dwukrotnie świeżym PBS (2 x 100 µL), dodano DMEM (100 µL; bez czerwieni fenolowej) oraz roztwór XTT (50 µL; The Cell Proliferation Kit II, Roche), a następnie płytkę inkubowano przez 4 h. Po tym czasie przeniesiono roztwory z komórek (100 µL) do nowej płytki 96-dołkowej i wykonano pomiar absorbancji dla 475 nm. Jako kontrolę pozytywną uśmiercenia komórek zastosowano roztwór 0,2% Triton X-100, natomiast za kontrolę negatywną posłużyła inkubacja z samą pożywką.

Otrzymane średnie wartości dopasowano numerycznie do równania Hill'a (Podrozdział 4, równanie (1)), opisującego zależność dawka-odpowiedź, wykorzystując skrypt napisany w programie MATLAB R2017b umożliwiający dobranie odpowiednich współczynników dla jak najmniejszej sumy błędów. Raportowane wartości IC_{50} są uzyskanym współczynnikiem dopasowanego równania. Poniżej przedstawiono przykładowe dopasowanie danych eksperymentalnych do znalezionych zależności:



17.3. Badania nad mechanizmem działania

*Depolaryzacja błony komórkowej *S. aureus**

Zawiesinę bakterii *S. aureus* w wykładniczej fazie wzrostu (5 mL), otrzymaną zgodnie z przedstawioną powyżej procedurą oznaczania MBC_{MHB} , odwirowano, po czym wyizolowane komórki przemyto PBS (2 x 5 mL), zawieszono w PBS (5 mL), i rozcieńczono przy pomocy PBS do $OD_{600} = 0,05$. Tak otrzymaną zawiesinę (2 mL) inkubowano w 37°C w kuwecie kwarcowej zaopatrzonej w magnetyczny element mieszający przez 1 min, po czym dodano 100 µM roztworu DiSC₃(5) w DMSO (10 µL). Po kolejnych 10 minutach inkubacji dodano roztwór odpowiedniego polimeru w PBS osiągając końcowe stężenie 1 µg/mL. Przez cały okres trwania procesu kuweczkę inkubowano w 37°C mieszając mieszadłem magnetycznym, monitorowano emisję 670 nm dla wzbudzeniu 622 nm przy pomocy spektrofluorymetru FP-8500 (Jasco).

Badania z wykorzystaniem FITC-dekstranu

Hodowlę nocną *E. coli*, przygotowano zgodnie z procedurą oznaczeń MIC używając 50 mL MHB. Następnie odwirowano komórki, przemyto je PBS (2 x 50 mL) i zawieszono w PBS (50 mL). Następnie zawiesinę podzielono na porcje po 8 mL, do których dodano roztwory FITC-dekstranu 40 kDa lub 150 kDa i odpowiednich polimerów osiągając końcowe stężenie odpowiednio 500 µg/mL and 16 µg/mL. Komórki traktowane samym FITC-dekstranem posłużyły jako kontrola negatywna. Zawiesiny następnie wytrząsano (240 rpm) w 37°C przez 2 h i odwirowano. Komórki przemyto PBS (2 x 8 mL) i zawieszono w PBS (4 mL). Tak przygotowane próbki były analizowane przy użyciu laserowego skaningowego mikroskopu

konfokalnego LSM 880 (Zeiss) stosując obiektyw Plan-Apochromat o powiększeniu 63x z olejkim immersyjnym. Fluorescencję FITC-dekstranu obserwowano dla wzbudzenia promieniowaniem 488 nm, mierzono emisję w zakresie 493 - 624 nm. Dla każdego wykonanego zdjęcia zastosowano takie same ustawienia obrazu.

Pomiar zeta-potencjału *E. coli*

Hodowlę nocną *E. coli*, przygotowaną zgodnie z procedurą oznaczeń MIC, odwirowano (5 mL), po czym komórki przemyto PBS (2 x 5 mL) i zawieszono w PBS (5 mL). Następnie tak przygotowaną zawiesinę dodano do roztworów polimerów osiągając docelowe stężenie związku oraz $OD_{600} = 0,06$. Każdą próbkę inkubowano przez 1 h w 25 °C przed pomiarem DLS. Zeta-potencjał mierzony był przy pomocy aparatu DLS Zetasizer Nano (Malvern Instruments). Wartość zeta-potencjału obliczono na podstawie mobilności elektroforetycznej stosując równanie Smoluchowskiego przy pomocy oprogramowania dostarczonego wraz z aparatem DLS.

Bibliografia

- (1) Duckett, S. Ernest Duchesne and the Concept of Fungal Antibiotic Therapy. *Lancet* **1999**, 354 (9195), 2068–2071.
- (2) Mohr, K. I. History of Antibiotics Research. In *Assessment & Evaluation in Higher Education*; 2016; Vol. 37, pp 237–272.
- (3) Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8 (6), 473–480.
- (4) World Health Organization. Antibacterial Agents in Clinical Development: An Analysis of the Antibacterial Clinical Development Pipeline, Including Tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017 (WHO/EMP/IAU/2017.12). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. **2017**, CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- (5) Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis, Part 1: Causes and Threats. *Pharm. Ther.* **2015**, 40 (4), 277–283.
- (6) Markiewicz, Z.; Kwiatkowski, Z. A. *Bakterie Antybiotyki Lekooporność*, I.; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2012.
- (7) Spellberg, B.; Guidos, R.; Gilbert, D.; Bradley, J.; Boucher, H. W.; Scheld, W. M.; Bartlett, J. G.; Edwards, J. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, 46 (2), 155–164.
- (8) O'Neill, J. Review on Antimicrobial Resistance: Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. **2016**.
- (9) World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard <https://covid19.who.int/> (accessed 2021 -10 -11).
- (10) Lakemeyer, M.; Zhao, W.; Mandl, F. A.; Hammann, P.; Sieber, S. A. Thinking Outside the Box—Novel Antibacterials To Tackle the Resistance Crisis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, 57 (44), 14440–14475.
- (11) Fleming, R. A. Antibiotic Resistance — Problems, Progress, and Prospects. **2014**, 4–6.
- (12) Piddock, L. J. V. The Crisis of No New Antibiotics-What Is the Way Forward? *Lancet Infect. Dis.* **2012**, 12 (3), 249–253.
- (13) Ghosh, C.; Sarkar, P.; Issa, R.; Haldar, J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol.* **2019**, 27 (4), 323–338.
- (14) Ergene, C.; Yasuhara, K.; Palermo, E. F. Biomimetic Antimicrobial Polymers: Recent Advances in Molecular Design. *Polym. Chem.* **2018**, 9 (18), 2407–2427.
- (15) Malanovic, N.; Lohner, K. Gram-Positive Bacterial Cell Envelopes: The Impact on the Activity of Antimicrobial Peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2016**, 1858 (5), 936–946.
- (16) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9 (2), 112–124.
- (17) Ganewatta, M. S.; Tang, C. Controlling Macromolecular Structures towards Effective Antimicrobial Polymers. *Polymer.* **2015**, 63, A1–A29.
- (18) Gow, N. A. R.; Hube, B. Importance of the Candida Albicans Cell Wall during Commensalism and Infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **2012**, 15 (4), 406–412.
- (19) Malanovic, N.; Lohner, K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals* **2016**, 9 (3), 59.
- (20) Vollmer, W.; Blanot, D.; De Pedro, M. A. Peptidoglycan Structure and Architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32 (2), 149–167.
- (21) Delcour, A. H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2009**, 1794 (5), 808–816.
- (22) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemia*, 6th ed.; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2009.
- (23) Koller, D.; Lohner, K. The Role of Spontaneous Lipid Curvature in the Interaction of Interfacially Active Peptides with Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2014**, 1838 (9), 2250–2259.
- (24) Kozlov, M. M. Spontaneous and Intrinsic Curvature of Lipid Membranes: Back to the Origins. In *Physics*

of *Biological Membranes*; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 287–309.

- (25) Som, A.; Tew, G. N. Influence of Lipid Composition on Membrane Activity of Antimicrobial Phenylene Ethynylene Oligomers. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (11), 3495–3502.
- (26) Chen, Y. F.; Tsang, K. Y.; Chang, W. F.; Fan, Z. A. Differential Dependencies on [Ca²⁺] and Temperature of the Monolayer Spontaneous Curvatures of DOPE, DOPA and Cardiolipin: Effects of Modulating the Strength of the Inter-Headgroup Repulsion. *Soft Matter* **2015**, *11* (20), 4041–4053.
- (27) Rand, R. P.; Sengupta, S. Cardiolipin Forms Hexagonal Structures with Divalent Cations. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1972**, *255* (2), 484–492.
- (28) Xie, Y.; Yang, L. Calcium and Magnesium Ions Are Membrane-Active against Stationary-Phase *Staphylococcus Aureus* with High Specificity. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (September 2015), 1–8.
- (29) Ciumac, D.; Gong, H.; Hu, X.; Lu, J. R. Membrane Targeting Cationic Antimicrobial Peptides. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *537*, 163–185.
- (30) Teixeira, V.; Feio, M. J.; Bastos, M. Role of Lipids in the Interaction of Antimicrobial Peptides with Membranes. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51* (2), 149–177.
- (31) Epand, R. M.; Epand, R. F. Bacterial Membrane Lipids in the Action of Antimicrobial Agents. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17* (5), 298–305.
- (32) Hayami, M.; Okabe, A.; Kariyama, R.; Abe, M.; Kanemasa, Y. Lipid Composition of *Staphylococcus Aureus* and Its Derived L-Forms. *Microbiol. Immunol.* **1979**, *23* (6), 435–442.
- (33) Virtanen, J. A.; Cheng, K. H.; Somerharju, P. Phospholipid Composition of the Mammalian Red Cell Membrane Can Be Rationalized by a Superlattice Model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (9), 4964–4969.
- (34) Bernecker, C.; Köfeler, H.; Pabst, G.; Trötmüller, M.; Kolb, D.; Strohmayer, K.; Trajanoski, S.; Holzapfel, G. A.; Schlenke, P.; Dorn, I. Cholesterol Deficiency Causes Impaired Osmotic Stability of Cultured Red Blood Cells. *Front. Physiol.* **2019**, *10* (December), 1–14.
- (35) Fujimoto, T.; Parmryd, I. Interleaflet Coupling, Pinning, and Leaflet Asymmetry—Major Players in Plasma Membrane Nanodomain Formation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *4* (JAN), 1–12.
- (36) Mookherjee, N.; Anderson, M. A.; Haagsman, H. P.; Davidson, D. J. Antimicrobial Host Defence Peptides: Functions and Clinical Potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19* (5), 311–332.
- (37) Yang, Y.; Cai, Z.; Huang, Z.; Tang, X.; Zhang, X. Antimicrobial Cationic Polymers: From Structural Design to Functional Control. *Polym. J.* **2018**, *50* (1), 33–44.
- (38) Yuan, Y.; Zhou, F.; Su, H.; Zhang, Y. Structural Design of Microbicidal Cationic Oligomers and Their Synergistic Interaction with Azoles against *Candida Albicans*. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 11885.
- (39) Yuan, Y.; Liang, S.; Li, J.; Zhang, S.; Zhang, Y. Copolymers with Both Soft and Rigid Cationic Rings as Highly Selective Antimicrobials to Combat Antibiotic Resistant Microbes and Biofilms. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (37), 5620–5625.
- (40) Liu, S.; Ono, R. J.; Wu, H.; Teo, J. Y.; Liang, Z. C.; Xu, K.; Zhang, M.; Zhong, G.; Tan, J. P. K.; Ng, M.; Yang, C.; Chan, J.; Ji, Z.; Bao, C.; Kumar, K.; Gao, S.; Lee, A.; Fevre, M.; Dong, H.; Ying, J. Y.; Li, L.; Fan, W.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. Highly Potent Antimicrobial Polyionenes with Rapid Killing Kinetics, Skin Biocompatibility and in Vivo Bactericidal Activity. *Biomaterials* **2017**, *127*, 36–48.
- (41) Mayandi, V.; Sridhar, S.; Fazil, M. H. U. T.; Goh, E. T. L.; Htoon, H. M.; Orive, G.; Choong, Y. K.; Saravanan, R.; Beuerman, R. W.; Barkham, T. M. S.; Yang, L.; Baskaran, M.; Jhanji, V.; Loh, X. J.; Verma, N. K.; Lakshminarayanan, R. Protective Action of Linear Polyethylenimine against *Staphylococcus Aureus* Colonization and Exaggerated Inflammation in Vitro and in Vivo. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5* (8), 1411–1422.
- (42) Chin, W.; Zhong, G.; Pu, Q.; Yang, C.; Lou, W.; De Sessions, P. F.; Periaswamy, B.; Lee, A.; Liang, Z. C.; Ding, X.; Gao, S.; Chu, C. W.; Bianco, S.; Bao, C.; Tong, Y. W.; Fan, W.; Wu, M.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. A Macromolecular Approach to Eradicate Multidrug Resistant Bacterial Infections While Mitigating Drug Resistance Onset. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 917.
- (43) Wiradharma, N.; Khan, M.; Yong, L.-K.; Hauser, C. A. E.; Seow, S. V.; Zhang, S.; Yang, Y.-Y. The Effect of Thiol Functional Group Incorporation into Cationic Helical Peptides on Antimicrobial Activities and Spectra. *Biomaterials* **2011**, *32* (34), 9100–9108.
- (44) Lou, W.; Venkataraman, S.; Zhong, G.; Ding, B.; Tan, J. P. K.; Xu, L.; Fan, W.; Yang, Y. Y. Antimicrobial Polymers as Therapeutics for Treatment of Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Lung Infection.

Acta Biomater. **2018**, *78*, 78–88.

- (45) Velkov, T.; Roberts, K. D.; Thompson, P. E.; Li, J. Polymyxins: A New Hope in Combating Gram-Negative Superbugs? *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (10), 1017–1025.
- (46) Li, Y.; Du, Y.; Zou, C. Effects of pH on Antioxidant and Antimicrobial Properties of Tea Saponins. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *228* (6), 1023–1028.
- (47) Cotter, P. D.; Ross, R. P.; Hill, C. Bacteriocins-a Viable Alternative to Antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11* (2), 95–105.
- (48) Yuan, Y.; Xu, Q. M.; Yu, S. C.; Sun, H. Z.; Cheng, J. S.; Yuan, Y. J. Control of the Polymyxin Analog Ratio by Domain Swapping in the Nonribosomal Peptide Synthetase of *Paenibacillus Polymyxa*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *47* (6–7), 551–562.
- (49) Zasloff, M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. *Nature* **2002**, *415* (6870), 389–395.
- (50) Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 194.
- (51) Mishra, B.; Reiling, S.; Zarena, D.; Wang, G. Host Defense Antimicrobial Peptides as Antibiotics: Design and Application Strategies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 87–96.
- (52) Karlsson, A. J.; Pomerantz, W. C.; Weisblum, B.; Gellman, S. H.; Palecek, S. P. Antifungal Activity from 14-Helical Beta-Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (Table 1), 12630–12631.
- (53) Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. Mimicry of Host-Defense Peptides by Unnatural Oligomers: Antimicrobial β -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (25), 7324–7330.
- (54) Takahashi, H.; Caputo, G. A.; Vemparala, S.; Kuroda, K. Synthetic Random Copolymers as a Molecular Platform To Mimic Host-Defense Antimicrobial Peptides. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (5), 1340–1350.
- (55) Kuroda, K.; DeGrado, W. F. Amphiphilic Polymethacrylate Derivatives as Antimicrobial Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (12), 4128–4129.
- (56) Palermo, E. F.; Kuroda, K. Chemical Structure of Cationic Groups in Amphiphilic Polymethacrylates Modulates the Antimicrobial and Hemolytic Activities. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (6), 1416–1428.
- (57) Palermo, E. F.; Sovadinova, I.; Kuroda, K. Structural Determinants of Antimicrobial Activity and Biocompatibility in Membrane-Disrupting Methacrylamide Random Copolymers. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (11), 3098–3107.
- (58) Kuroda, K.; Caputo, G. A.; DeGrado, W. F. The Role of Hydrophobicity in the Antimicrobial and Hemolytic Activities of Polymethacrylate Derivatives. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (5), 1123–1133.
- (59) Paslay, L. C.; Abel, B. A.; Brown, T. D.; Koul, V.; Choudhary, V.; McCormick, C. L.; Morgan, S. E. Antimicrobial Poly(methacrylamide) Derivatives Prepared via Aqueous RAFT Polymerization Exhibit Biocidal Efficiency Dependent upon Cation Structure. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (8), 2472–2482.
- (60) Palermo, E. F.; Vemparala, S.; Kuroda, K. Cationic Spacer Arm Design Strategy for Control of Antimicrobial Activity and Conformation of Amphiphilic Methacrylate Random Copolymers. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (5), 1632–1641.
- (61) Chen, Y.; Wilbon, P. A.; Chen, Y. P.; Zhou, J.; Nagarkatti, M.; Wang, C.; Chu, F.; Decho, A. W.; Tang, C. Amphipathic Antibacterial Agents Using Cationic Methacrylic Polymers with Natural Rosin as Pendant Group. *RSC Adv.* **2012**, *2* (27), 10275.
- (62) Locock, K. E. S.; Michl, T. D.; Valentin, J. D. P.; Vasilev, K.; Hayball, J. D.; Qu, Y.; Traven, A.; Griesser, H. J.; Meagher, L.; Haeussler, M. Guanlylated Polymethacrylates: A Class of Potent Antimicrobial Polymers with Low Hemolytic Activity. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (11), 4021–4031.
- (63) Wang, H.; Shi, X.; Yu, D.; Zhang, J.; Yang, G.; Cui, Y.; Sun, K.; Wang, J.; Yan, H. Antibacterial Activity of Geminized Amphiphilic Cationic Homopolymers. *Langmuir* **2015**, *31* (50), 13469–13477.
- (64) Yang, X.; Hu, K.; Hu, G.; Shi, D.; Jiang, Y.; Hui, L.; Zhu, R.; Xie, Y.; Yang, L. Long Hydrophilic-and-Cationic Polymers: A Different Pathway toward Preferential Activity against Bacterial over Mammalian Membranes. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (9), 3267–3277.
- (65) Punia, A.; He, E.; Lee, K.; Banerjee, P.; Yang, N.-L. Cationic Amphiphilic Non-Hemolytic Polyacrylates with Superior Antibacterial Activity. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (53), 7071–7074.
- (66) Mortazavian, H.; Foster, L. L.; Bhat, R.; Patel, S.; Kuroda, K. Decoupling the Functional Roles of Cationic and Hydrophobic Groups in the Antimicrobial and Hemolytic Activities of Methacrylate Random Copolymers. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (11), 4370–4378.

- (67) Rahman, A.; Bam, M.; Luat, E.; Jui, M. S.; Ganewatta, M. S.; Shokfai, T.; Nagarkatti, M.; Decho, A. W.; Tang, C. Macromolecular-Clustered Facial Amphiphilic Antimicrobials. *Nat. Commun.* No. 2018, 1–10.
- (68) Judzewitsch, P. R.; Nguyen, T. K.; Shanmugam, S.; Wong, E. H. H.; Boyer, C. Towards Sequence-Controlled Antimicrobial Polymers: Effect of Polymer Block Order on Antimicrobial Activity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, 57 (17), 4559–4564.
- (69) Punia, A.; Lee, K.; He, E.; Mukherjee, S.; Mancuso, A.; Banerjee, P.; Yang, N. L. Effect of Relative Arrangement of Cationic and Lipophilic Moieties on Hemolytic and Antibacterial Activities of PEGylated Polyacrylates. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16 (10), 23867–23880.
- (70) Ji, W.; Koepsel, R. R.; Murata, H.; Zadan, S.; Campbell, A. S.; Russell, A. J. Bactericidal Specificity and Resistance Profile of Poly (Quaternary Ammonium) Polymers and Protein-Poly (Quaternary Ammonium) Conjugates. **2017**.
- (71) Cho, C. A.; Liang, C.; Perera, J.; Brimble, M. A.; Swift, S.; Jin, J. Guanidinylated Amphiphilic Polycarbonates with Enhanced Antimicrobial Activity by Extending the Length of the Spacer Arm and Micelle Self-Assembly. *Macromol. Biosci.* **2020**, 20 (7), 2000065.
- (72) Rahman, M. A.; Jui, M. S.; Bam, M.; Cha, Y.; Luat, E.; Alabresm, A.; Nagarkatti, M.; Decho, A. W.; Tang, C. Facial Amphiphilicity-Induced Polymer Nanostructures for Antimicrobial Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12 (19), 21221–21230.
- (73) Punia, A.; Mancuso, A.; Banerjee, P.; Yang, N.-L. Nonhemolytic and Antibacterial Acrylic Copolymers with Hexamethylenamine and Poly(ethylene Glycol) Side Chains. *ACS Macro Lett.* **2015**, 4 (4), 426–430.
- (74) Palermo, E. F.; Lee, D. K.; Ramamoorthy, A.; Kuroda, K. Role of Cationic Group Structure in Membrane Binding and Disruption by Amphiphilic Copolymers. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115 (2), 366–375.
- (75) Oda, Y.; Kanaoka, S.; Sato, T.; Aoshima, S.; Kuroda, K. Block versus Random Amphiphilic Copolymers as Antibacterial Agents. *Biomacromolecules* **2011**, 12 (10), 3581–3591.
- (76) Grace, J. L.; Elliott, A. G.; Huang, J. X.; Schneider, E. K.; Truong, N. P.; Cooper, M. A.; Li, J.; Davis, T. P.; Quinn, J. F.; Velkov, T.; Whittaker, M. R. Cationic Acrylate Oligomers Comprising Amino Acid Mimic Moieties Demonstrate Improved Antibacterial Killing Efficiency. *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5 (3), 531–536.
- (77) Stratton, T. R.; Applegate, B. M.; Youngblood, J. P. Effect of Steric Hindrance on the Properties of Antibacterial and Biocompatible Copolymers. *Biomacromolecules* **2011**, 12 (1), 50–56.
- (78) Sambhy, V.; Peterson, B. R.; Sen, A. Antibacterial and Hemolytic Activities of Pyridinium Polymers as a Function of the Spatial Relationship between the Positive Charge and the Pendant Alkyl Tail. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, 47 (7), 1250–1254.
- (79) Uppu, D. S. S. M.; Konai, M. M.; Baul, U.; Singh, P.; Siersma, T. K.; Samaddar, S.; Vemparala, S.; Hamoen, L. W.; Narayana, C.; Haldar, J. Isosteric Substitution in Cationic-Amphiphilic Polymers Reveals an Important Role for Hydrogen Bonding in Bacterial Membrane Interactions. *Chem. Sci.* **2016**, 7 (7), 4613–4623.
- (80) Uppu, D. S. S. M.; Haldar, J. Lipopolysaccharide Neutralization by Cationic-Amphiphilic Polymers through Pseudo-Aggregate Formation. *Biomacromolecules* **2016**, 17 (3), 862–873.
- (81) Uppu, D. S. S. M.; Samaddar, S.; Hoque, J.; Konai, M. M.; Krishnamoorthy, P.; Shome, B. R.; Haldar, J. Side Chain Degradable Cationic–Amphiphilic Polymers with Tunable Hydrophobicity Show in Vivo Activity. *Biomacromolecules* **2016**, 17 (9), 3094–3102.
- (82) Uppu, D. S. S. M.; Akkapeddi, P.; Manjunath, G. B.; Yarlagadda, V.; Hoque, J.; Haldar, J. Polymers with Tunable Side-Chain Amphiphilicity as Non-Hemolytic Antibacterial Agents. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (82), 9389.
- (83) Uppu, D. S. S. M.; Bhowmik, M.; Samaddar, S.; Haldar, J. Cyclization and Unsaturation rather than Isomerisation of Side Chains Govern the Selective Antibacterial Activity of Cationic-Amphiphilic Polymers. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (25), 4644–4647.
- (84) Porel, M.; Alabi, C. A. Sequence-Defined Polymers via Orthogonal Allyl Acrylamide Building Blocks. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (38), 13162–13165.
- (85) Li, W. W.; Hellwig, P.; Ritter, M.; Haehnel, W. De Novo Design, Synthesis, and Characterization of Quinoproteins. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, 12 (27), 7236–7245.
- (86) Liu, R.; Chen, X.; Falk, S. P.; Mowery, B. P.; Karlsson, A. J.; Weisblum, B.; Palecek, S. P.; Masters, K. S.; Gellman, S. H. Structure – Activity Relationships among Antifungal Nylon - 3 Polymers: Identifying

Cation of Materials Active against Drug-Resistant Strains of *Candida Albicans*. **2014**.

- (87) Chakraborty, S.; Liu, R.; Hayouka, Z.; Chen, X.; Ehrhardt, J.; Lu, Q.; Burke, E.; Yang, Y.; Weisblum, B.; Wong, G. C. L.; Masters, K. S.; Gellman, S. H. Ternary Nylon-3 Copolymers as Host-Defense Peptide Mimics: Beyond Hydrophobic and Cationic Subunits. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (41), 14530–14535.
- (88) Liu, R.; Chen, X.; Chakraborty, S.; Lemke, J. J.; Hayouka, Z.; Chow, C.; Welch, R. A.; Weisblum, B.; Masters, K. S.; Gellman, S. H. Tuning the Biological Activity Profile of Antibacterial Polymers via Subunit Substitution Pattern. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (11), 4410–4418.
- (89) Chakraborty, S.; Liu, R.; Lemke, J. J.; Hayouka, Z.; Welch, R. A.; Weisblum, B.; Masters, K. S.; Gellman, S. H. Effects of Cyclic vs Acyclic Hydrophobic Subunits on the Chemical Structure and Biological Properties of Nylon-3 Copolymers. *ACS Macro Lett.* **2013**, *2* (8), 753–756.
- (90) Shi, S.; Quarta, N.; Zhang, H.; Lu, Z.; Hof, M.; Šachl, R.; Liu, R.; Hoernke, M. Hidden Complexity in Membrane Permeabilization Behavior of Antimicrobial Polycations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23* (2), 1475–1488.
- (91) Mowery, B. P.; Lindner, A. H.; Weisblum, B.; Stahl, S. S.; Gellman, S. H. Structure-Activity Relationships among Random Nylon-3 Copolymers That Mimic Antibacterial Host-Defense Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (28), 9735–9745.
- (92) Lienkamp, K.; Madkour, A. E.; Kumar, K.-N.; Nüsslein, K.; Tew, G. N. Antimicrobial Polymers Prepared by Ring-Opening Metathesis Polymerization: Manipulating Antimicrobial Properties by Organic Counterion and Charge Density Variation. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (43), 11715–11722.
- (93) Song, A.; Walker, S. G.; Parker, K. A.; Sampson, N. S. Antibacterial Studies of Cationic Polymers with Alternating, Random, and Uniform Backbones. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (6), 592–599.
- (94) Gabriel, G. J.; Maegerlein, J. A.; Nelson, C. F.; Dabkowski, J. M.; Eren, T.; Nüsslein, K.; Tew, G. N. Comparison of Facially Amphiphilic versus Segregated Monomers in the Design of Antibacterial Copolymers. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (2), 433–439.
- (95) Eren, T.; Som, A.; Rennie, J. R.; Nelson, C. F.; Urgina, Y.; Nüsslein, K.; Coughlin, E. B.; Tew, G. N. Antibacterial and Hemolytic Activities of Quaternary Pyridinium Functionalized Polynorbornenes. *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209* (5), 516–524.
- (96) Gabriel, G. J.; Pool, J. G.; Som, A.; Dabkowski, J. M.; Coughlin, E. B.; Muthukumar, M.; Tew, G. N. Interactions between Antimicrobial Polynorbornenes and Phospholipid Vesicles Monitored by Light Scattering and Microcalorimetry. *Langmuir* **2008**, *24* (21), 12489–12495.
- (97) Ilker, M. F.; Nüsslein, K.; Tew, G. N.; Coughlin, E. B. Tuning the Hemolytic and Antibacterial Activities of Amphiphilic Polynorbornene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (48), 15870–15875.
- (98) Al-badri, Z. M. Z. M.; Som, A.; Lyon, S.; Nelson, C. F.; Nusslein, K.; Tew, G. N. Investigating the Effect of Increasing Charge Density on the Hemolytic Activity of Synthetic Antimicrobial Polymers. *Biomacromolecules* **2008**, *3* (1 mL), 2805–2810.
- (99) Properties, N. A.; Gabriel, G. J.; Madkour, A. E.; Dabkowski, J. M.; Nelson, C. F. Communications Synthetic Mimic of Antimicrobial Peptide with. **2008**, 2980–2983.
- (100) Colak, S.; Nelson, C. F.; Nüsslein, K.; Tew, G. N. Hydrophilic Modifications of an Amphiphilic Polynorbornene and the Effects on Its Hemolytic and Antibacterial Activity. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (2), 353–359.
- (101) Engler, A. C.; Tan, J. P. K.; Ong, Z. Y.; Coady, D. J.; Ng, V. W. L.; Yang, Y. Y.; Hedrick, J. L. Antimicrobial Polycarbonates: Investigating the Impact of Balancing Charge and Hydrophobicity Using a Same-Centered Polymer Approach. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (12), 4331–4339.
- (102) Chin, W.; Yang, C.; Ng, V. W. L.; Huang, Y.; Cheng, J.; Tong, Y. W.; Coady, D. J.; Fan, W.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. Biodegradable Broad-Spectrum Antimicrobial Polycarbonates: Investigating the Role of Chemical Structure on Activity and Selectivity. *Macromolecules* **2013**, *46* (22), 8797–8807.
- (103) Ng, V. W. L.; Tan, J. P. K.; Leong, J.; Voo, Z. X.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. Antimicrobial Polycarbonates: Investigating the Impact of Nitrogen-Containing Heterocycles as Quaternizing Agents. *Macromolecules* **2014**, *47* (4), 1285–1291.
- (104) Tan, J. P. K.; Coady, D. J.; Sardon, H.; Yuen, A.; Gao, S.; Lim, S. W.; Liang, Z. C.; Tan, E. W.; Venkataraman, S.; Engler, A. C.; Fevre, M.; Ono, R.; Yang, Y. Y.; Hedrick, J. L. Broad Spectrum Macromolecular Antimicrobials with Biofilm Disruption Capability and In Vivo Efficacy. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6* (16), 1601420.
- (105) Venkataraman, S.; Tan, J. P. K.; Chong, S. T.; Chu, C. Y. H.; Wilianto, E. A.; Cheng, C. X.; Yang, Y. Y.

- Identification of Structural Attributes Contributing to the Potency and Selectivity of Antimicrobial Polyionenes: Amides Are Better Than Esters. *Biomacromolecules* **2019**, 20 (7), 2737–2742.
- (106) Tan, J. P. K.; Tan, J.; Park, N.; Xu, K.; Chan, E. D.; Yang, C.; Piunova, V. A.; Ji, Z.; Lim, A.; Shao, J.; Bai, A.; Bai, X.; Mantione, D.; Sardon, H.; Yang, Y. Y.; Hedrick, J. L. Upcycling Poly(ethylene Terephthalate) Refuse to Advanced Therapeutics for the Treatment of Nosocomial and Mycobacterial Infections. *Macromolecules* **2019**, 52 (20), 7878–7885.
 - (107) Oh, J.; Kim, S.-J.; Oh, M.-K.; Khan, A. Antibacterial Properties of Main-Chain Cationic Polymers Prepared through Amine–epoxy “Click” Polymerization. *RSC Adv.* **2020**, 10 (45), 26752–26755.
 - (108) Ikeda, T.; Yamaguchi, H.; Tazuke, S. Molecular Weight Dependence of Antibacterial Activity in Cationic Disinfectants. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1990**, 5 (1), 31–41.
 - (109) Ikeda, T.; Yamaguchi, H.; Tazuke, S. Phase Separation in Phospholipid Bilayers Induced by Biologically Active Polycations. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1990**, 1026 (1), 105–112.
 - (110) Strassburg, A.; Kracke, F.; Wenners, J.; Jemeljanova, A.; Kuepper, J.; Petersen, H.; Tiller, J. C. Nontoxic, Hydrophilic Cationic Polymers-Identified as Class of Antimicrobial Polymers. *Macromol. Biosci.* **2015**, 15 (12), 1710–1723.
 - (111) Liu, L.; Huang, Y.; Riduan, S. N.; Gao, S.; Yang, Y.; Fan, W.; Zhang, Y. Main-Chain Imidazolium Oligomer Material as a Selective Biomimetic Antimicrobial Agent. *Biomaterials* **2012**, 33 (33), 8625–8631.
 - (112) Bechinger, B. Rationalizing the Membrane Interactions of Cationic Amphipathic Antimicrobial Peptides by Their Molecular Shape. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, 14 (5), 349–355.
 - (113) Brogden, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3 (3), 238–250.
 - (114) Giuliani, A.; Pirri, G.; Bozzi, A.; Di Giulio, A.; Aschi, M.; Rinaldi, A. C. Antimicrobial Peptides: Natural Templates for Synthetic Membrane-Active Compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65 (16), 2450–2460.
 - (115) Bahar, A.; Ren, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* **2013**, 6 (12), 1543–1575.
 - (116) Kłodzińska, E.; Szumski, M.; Hryniewicz, K.; Dziubakiewicz, E.; Jackowski, M.; Buszewski, B. Differentiation of *Staphylococcus Aureus* Strains by CE, Zeta Potential and Coagulase Gene Polymorphism. *Electrophoresis* **2009**, 30 (17), 3086–3091.
 - (117) Schwegmann, H.; Feitz, A. J.; Frimmel, F. H. Influence of the Zeta Potential on the Sorption and Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles on *S. Cerevisiae* and *E. Coli*. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 347 (1), 43–48.
 - (118) Soni, K. A.; Balasubramanian, A. K.; Beskok, A.; Pillai, S. D. Zeta Potential of Selected Bacteria in Drinking Water When Dead, Starved, or Exposed to Minimal and Rich Culture Media. *Curr. Microbiol.* **2008**, 56 (1), 93–97.
 - (119) Tokumasu, F.; Ostera, G. R.; Amaratunga, C.; Fairhurst, R. M. Modifications in Erythrocyte Membrane Zeta Potential by Plasmodium Falciparum Infection. *Exp. Parasitol.* **2012**, 131 (2), 245–251.
 - (120) Ciurac, D.; Gong, H.; Campbell, R. A.; Campana, M.; Xu, H.; Lu, J. R. Structural Elucidation upon Binding of Antimicrobial Peptides into Binary Mixed Lipid Monolayers Mimicking Bacterial Membranes. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, 598, 193–205.
 - (121) Peschel, A.; Jack, R. W.; Otto, M.; Collins, L. V.; Staubitz, P.; Nicholson, G.; Kalbacher, H.; Nieuwenhuizen, W. F.; Jung, G.; Tarkowski, A.; van Kessel, K. P. M.; van Strijp, J. A. G. *Staphylococcus Aureus* Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil Killing via the Novel Virulence Factor Mprf Is Based on Modification of Membrane Lipids with L-Lysine. *J. Exp. Med.* **2001**, 193 (9), 1067–1076.
 - (122) Yang, L.; Gordon, V. D.; Trinkle, D. R.; Schmidt, N. W.; Davis, M. A.; DeVries, C.; Som, A.; Cronan, J. E.; Tew, G. N.; Wong, G. C. L. Mechanism of a Prototypical Synthetic Membrane-Active Antimicrobial: Efficient Hole-Punching via Interaction with Negative Intrinsic Curvature Lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (52), 20595–20600.
 - (123) Yang, L.; Gordon, V. D.; Mishra, A.; Som, A.; Purdy, K. R.; Davis, M. A.; Tew, G. N.; Wong, G. C. L. Synthetic Antimicrobial Oligomers Induce a Composition-Dependent Topological Transition in Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (40), 12141–12147.
 - (124) Wei, G.; Liu, X.; Yuan, L.; Ju, X.-J.; Chu, L.-Y.; Yang, L. Lipid Composition Influences the Membrane-Disrupting Activity of Antimicrobial Methacrylate Co-Polymers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2011**, 22 (15), 2041–2061.

- (125) Hu, K.; Schmidt, N. W.; Zhu, R.; Jiang, Y.; Lai, G. H.; Wei, G.; Palermo, E. F.; Kuroda, K.; Wong, G. C. L.; Yang, L. A Critical Evaluation of Random Copolymer Mimesis of Homogeneous Antimicrobial Peptides. *Macromolecules* **2013**, *46* (5), 1908–1915.
- (126) Schmidt, N. W.; Tai, K. P.; Kamdar, K.; Mishra, A.; Lai, G. H.; Zhao, K.; Ouellette, A. J.; Wong, G. C. L. Arginine in α -Defensins: Differential Effects on Bactericidal Activity Correspond to Geometry of Membrane Curvature Generation and Peptide-Lipid Phase Behavior. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (26), 21866–21872.
- (127) Swain, J.; El Khoury, M.; Kempf, J.; Bri  e, F.; Van Der Smissen, P.; D  coute, J.-L.; Mingeot-Leclercq, M.-P. Effect of Cardiolipin on the Antimicrobial Activity of a New Amphiphilic Aminoglycoside Derivative on *Pseudomonas Aeruginosa*. *PLoS One* **2018**, *13* (8), e0201752.
- (128) Domenech, O.; Francius, G.; Tulkens, P. M.; Van Bambeke, F.; Dufr  ne, Y.; Mingeot-Leclercq, M.-P. Interactions of Oritavancin, a New Lipoglycopeptide Derived from Vancomycin, with Phospholipid Bilayers: Effect on Membrane Permeability and Nanoscale Lipid Membrane Organization. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2009**, *1788* (9), 1832–1840.
- (129) Stulz, A.; Vogt, A.; Saar, J. S.; Akil, L.; Lienkamp, K.; Hoernke, M. Quantified Membrane Permeabilization Indicates the Lipid Selectivity of Membrane-Active Antimicrobials. *Langmuir* **2019**, *35* (49), 16366–16376.
- (130) Hung, W.-C.; Lee, M.-T.; Chen, F.-Y.; Huang, H. W. The Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2007**, *92* (11), 3960–3967.
- (131) Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (6), 361–374.
- (132) McHenry, A. J.; Sciacca, M. F. M.; Brender, J. R.; Ramamoorthy, A. Does Cholesterol Suppress the Antimicrobial Peptide Induced Disruption of Lipid Raft Containing Membranes? *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2012**, *1818* (12), 3019–3024.
- (133) Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Fujii, N.; Miyajima, K. Molecular Basis for Membrane Selectivity of an Antimicrobial Peptide, Magainin 2. *Biochemistry* **1995**, *34* (10), 3423–3429.
- (134) Mason, A. J.; Marquette, A.; Bechinger, B. Zwitterionic Phospholipids and Sterols Modulate Antimicrobial Peptide-Induced Membrane Destabilization. *Biophys. J.* **2007**, *93* (12), 4289–4299.
- (135) Henderson, J. M.; Iyengar, N. S.; Lam, K. L. H.; Maldonado, E.; Suwatthee, T.; Roy, I.; Waring, A. J.; Lee, K. Y. C. Beyond Electrostatics: Antimicrobial Peptide Selectivity and the Influence of Cholesterol-Mediated Fluidity and Lipid Chain Length on Protegrin-1 Activity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2019**, *1861* (10), 182977.
- (136) Sood, R.; Kinnunen, P. K. J. Cholesterol, Lanosterol, and Ergosterol Attenuate the Membrane Association of LL-37(W27F) and Temporin L. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2008**, *1778* (6), 1460–1466.
- (137) Zhang, S.; Ding, S.; Yu, J.; Chen, X.; Lei, Q.; Fang, W. Antibacterial Activity, in Vitro Cytotoxicity, and Cell Cycle Arrest of Gemini Quaternary Ammonium Surfactants. *Langmuir* **2015**, *31* (44), 12161–12169.
- (138) Strahl, H.; Hamoen, L. W. Membrane Potential Is Important for Bacterial Cell Division. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (27), 12281–12286.
- (139) Kadhim, M. J.; Gamaj, M. I. Short Review Article Estimation of the Diffusion Coefficient and Hydrodynamic Radius (Stokes Radius) for Inorganic Ions in Solution Depending on Molar Conductivity as Electro-Analytical Technique-A Review. **2020**, *2* (3), 182–188.
- (140) te Winkel, J. D.; Gray, D. A.; Seistrup, K. H.; Hamoen, L. W.; Strahl, H. Analysis of Antimicrobial-Triggered Membrane Depolarization Using Voltage Sensitive Dyes. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, *4* (APR), 29.
- (141) Choi, H.; Kim, K.-J.; Lee, D. G. Antifungal Activity of the Cationic Antimicrobial Polymer-Polyhexamethylene Guanidine Hydrochloride and Its Mode of Action. *Fungal Biol.* **2016**, *3* (5), 1–8.
- (142) Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R. E. W. Mechanism of Interaction of Different Classes of Cationic Antimicrobial Peptides with Planar Bilayers and with the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia Coli* [†]. *Biochemistry* **1999**, *38* (22), 7235–7242.
- (143) Mankoci, S.; Ewing, J.; Dalai, P.; Sahai, N.; Barton, H. A.; Joy, A. Bacterial Membrane Selective Antimicrobial Peptide-Mimetic Polyurethanes: Structure–Property Correlations and Mechanisms of Action. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (11), 4096–4106.
- (144) Alvarez-Bustamante, J. A.; Lemeshko, V. V. Computational Models for Monitoring the Trans-Membrane Potential with Fluorescent Probes: The DiSC3(5) Case. *Eur. Biophys. J.* **2016**, *45* (8), 815–830.

- (145) Bowman, A. M.; Nesin, O. M.; Pakhomova, O. N.; Pakhomov, A. G. Analysis of Plasma Membrane Integrity by Fluorescent Detection of Tl⁺ Uptake. *J. Membr. Biol.* **2010**, 236 (1), 15–26.
- (146) Stocks, S. M. Mechanism and Use of the Commercially Available Viability stain, BacLight. *Cytometry* **2004**, 61A (2), 189–195.
- (147) Nescerecka, A.; Hammes, F.; Juhna, T. A Pipeline for Developing and Testing Staining Protocols for Flow Cytometry, Demonstrated with SYBR Green I and Propidium Iodide Viability Staining. *J. Microbiol. Methods* **2016**, 131, 172–180.
- (148) Sawai, H.; Domae, N. Discrimination between Primary Necrosis and Apoptosis by Necrostatin-1 in Annexin V-Positive/propidium Iodide-Negative Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, 411 (3), 569–573.
- (149) Shi, L.; Günther, S.; Hübschmann, T.; Wick, L. Y.; Harms, H.; Müller, S. Limits of Propidium Iodide as a Cell Viability Indicator for Environmental Bacteria. *Cytom. Part A* **2007**, 71A (8), 592–598.
- (150) Chen, A.; Karanastasis, A.; Casey, K. R.; Necelis, M.; Carone, B. R.; Caputo, G. A.; Palermo, E. F. Cationic Molecular Umbrellas as Antibacterial Agents with Remarkable Cell-Type Selectivity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12 (19), 21270–21282.
- (151) Kuroki, A.; Kengmo Tchoupa, A.; Hartlieb, M.; Peltier, R.; Locock, K. E. S.; Unnikrishnan, M.; Perrier, S. Targeting Intracellular, Multi-Drug Resistant Staphylococcus Aureus with Guanidinium Polymers by Elucidating the Structure-Activity Relationship. *Biomaterials* **2019**, 217 (March), 119249.
- (152) Bagheri, M.; Nikolenko, H.; Arasteh, S.; Rezaei, N.; Behzadi, M.; Dathe, M.; Hancock, R. E. W. Bacterial Aggregation Triggered by Fibril Forming Tryptophan-Rich Sequences: Effects of Peptide Side Chain and Membrane Phospholipids. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12 (24), 26852–26867.
- (153) Pandey, B. K.; Ahmad, A.; Asthana, N.; Azmi, S.; Srivastava, R. M.; Srivastava, S.; Verma, R.; Vishwakarma, A. L.; Ghosh, J. K. Cell-Selective Lysis by Novel Analogues of Melittin against Human Red Blood Cells and Escherichia Coli. *Biochemistry* **2010**, 49 (36), 7920–7929.
- (154) Vasilchenko, A. S.; Rogozhin, E. A.; Vasilchenko, A. V.; Kartashova, O. L.; Sycheva, M. V. Novel Haemoglobin-Derived Antimicrobial Peptides from Chicken (Gallus Gallus) Blood: Purification, Structural Aspects and Biological Activity. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, 121 (6), 1546–1557.
- (155) Chen, C. Z.; Cooper, S. L. Interactions between Dendrimer Biocides and Bacterial Membranes. *Biomaterials* **2002**, 23 (16), 3359–3368.
- (156) Qian, L.; Xiao, H.; Zhao, G.; He, B. Synthesis of Modified Guanidine-Based Polymers and Their Antimicrobial Activities Revealed by AFM and CLSM. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, 3 (6), 1895–1901.
- (157) Guo, J.; Qin, J.; Ren, Y.; Wang, B.; Cui, H.; Ding, Y.; Mao, H.; Yan, F. Antibacterial Activity of Cationic Polymers: Side-Chain or Main-Chain Type? *Polym. Chem.* **2018**, 9 (37), 4611–4616.
- (158) Riduan, S. N.; Yuan, Y.; Zhou, F.; Leong, J.; Su, H.; Zhang, Y. Ultrafast Killing and Self-Gelling Antimicrobial Imidazolium Oligomers. *Small* **2016**, 12 (14), 1928–1934.
- (159) Mohanram, H.; Bhattacharjya, S. Salt-Resistant Short Antimicrobial Peptides. *Biopolymers* **2016**, 106 (3), 345–356.
- (160) Routledge, S. J.; Linney, J. A.; Goddard, A. D. Liposomes as Models for Membrane Integrity. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, 47 (3), 919–932.
- (161) Kabanov, V. .; Yaroslavov, A. . What Happens to Negatively Charged Lipid Vesicles upon Interacting with Polycation Species? *J. Control. Release* **2002**, 78 (1–3), 267–271.
- (162) Hedegaard, S. F.; Bruhn, D. S.; Khandelia, H.; Cárdenas, M.; Nielsen, H. M. Shuffled Lipidation Pattern and Degree of Lipidation Determines the Membrane Interaction Behavior of a Linear Cationic Membrane-Active Peptide. *J. Colloid Interface Sci.* **2020**, 578, 584–597.
- (163) Zetasizer Nano Series User Manual. *Malvern Instruments Ltd.* **2003**, 15.1–15.6.
- (164) Sybachin, A. V.; Efimova, A. A.; Litmanovich, E. A.; Menger, F. M.; Yaroslavov, A. A. Complexation of Polycations to Anionic Liposomes: Composition and Structure of the Interfacial Complexes. *Langmuir* **2007**, 23 (20), 10034–10039.
- (165) Quemeneur, F.; Rinaudo, M.; Maret, G.; Pépin-Donat, B. Decoration of Lipid Vesicles by Polyelectrolytes: Mechanism and Structure. *Soft Matter* **2010**, 6 (18), 4471–4481.
- (166) Yaroslavov, A. A.; Yaroslavova, E. G.; Rakhnyanskaya, A. A.; Menger, F. M.; Kabanov, V. A. Modulation of Interaction of Polycations with Negative Unilamellar Lipid Vesicles. *Colloids Surfaces B*

Biointerfaces **1999**, 16 (1–4), 29–43.

- (167) Ivashkov, O. V.; Sybachin, A. V.; Efimova, A. A.; Pergushov, D. V.; Orlov, V. N.; Schmalz, H.; Yaroslavov, A. A. The Influence of the Chain Length of Polycations on Their Complexation with Anionic Liposomes. *ChemPhysChem* **2015**, 16 (13), 2849–2853.
- (168) Domingues, M. M.; Inácio, R. G.; Raimundo, J. M.; Martins, M.; Castanho, M. a. R. B.; Santos, N. C. Biophysical Characterization of Polymyxin B Interaction with LPS Aggregates and Membrane Model Systems. *Biopolymers* **2012**, 98 (4), 338–344.
- (169) Volodkin, D.; Ball, V.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Mohwald, H. Complexation of Phosphocholine Liposomes with Polylysine. Stabilization by Surface Coverage versus Aggregation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2007**, 1768 (2), 280–290.
- (170) Waschinski, C. J.; Barnert, S.; Theobald, A.; Schubert, R.; Kleinschmidt, F.; Hoffmann, A.; Saalwächter, K.; Tiller, J. C. Insights in the Antibacterial Action of Poly(methyloxazoline)s with a Biocidal End Group and Varying Satellite Groups. *Biomacromolecules* **2008**, 9 (7), 1764–1771.
- (171) Yaroslavov, A. A.; Sybachin, A. V.; Kesselman, E.; Schmidt, J.; Talmon, Y.; Rizvi, S. A. A.; Menger, F. M. Liposome Fusion Rates Depend upon the Conformation of Polycation Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (9), 2881–2883.
- (172) Kim, K.; Chen, W. C. W.; Heo, Y.; Wang, Y. Polycations and Their Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, 60, 18–50.
- (173) Marie, E.; Sagan, S.; Cribier, S.; Tribet, C. Amphiphilic Macromolecules on Cell Membranes: From Protective Layers to Controlled Permeabilization. *J. Membr. Biol.* **2014**, 247 (9–10), 861–881.
- (174) Konai, M. M.; Bhattacharjee, B.; Ghosh, S.; Halder, J. Recent Progress in Polymer Research to Tackle Infections and Antimicrobial Resistance. *Biomacromolecules* **2018**, 19 (6), 1888–1917.
- (175) Gibney, K. A.; Sovadinova, I.; Lopez, A. I.; Urban, M.; Ridgway, Z.; Caputo, G. A.; Kuroda, K. Poly(ethylene Imine)s as Antimicrobial Agents with Selective Activity. *Macromol. Biosci.* **2012**, 12 (9), 1279–1289.
- (176) Sreeperebudur, R. S.; Abid, Z. M.; Claunch, K. M.; Chen, H.-H.; McGillivray, S. M.; Simanek, E. E. Synthesis and Antimicrobial Activity of Triazine Dendrimers with DABCO Groups. *RSC Adv.* **2016**, 6 (11), 8806–8810.
- (177) Chen, C. Z.; Beck-Tan, N. C.; Dhurjati, P.; van Dyk, T. K.; LaRossa, R. A.; Cooper, S. L. Quaternary Ammonium Functionalized Poly(propylene Imine) Dendrimers as Effective Antimicrobials: Structure–Activity Studies. *Biomacromolecules* **2000**, 1 (3), 473–480.
- (178) Wong, E. H. H.; Khin, M. M.; Ravikumar, V.; Si, Z.; Rice, S. A.; Chan-Park, M. B. Modulating Antimicrobial Activity and Mammalian Cell Biocompatibility with Glucosamine-Functionalized Star Polymers. *Biomacromolecules* **2016**, 17 (3), 1170–1178.
- (179) Jiang, Y.; Zheng, W.; Kuang, L.; Liang, H.; Ma, H.; Liang, H. Hydrophilic Phage-Mimicking Membrane Active Antimicrobials Reveal Nanostructure-Dependent Activity and Selectivity. *ACS Infect. Dis.* **2017**, 3 (9), 676–687.
- (180) Zeng, M.; Xu, J.; Luo, Q.; Hou, C.; Qiao, S.; Fu, S.; Fan, X.; Liu, J. Constructing Antibacterial Polymer Nanocapsules Based on Pyridine Quaternary Ammonium Salt. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, 108 (March 2019), 110383.
- (181) Engler, A. C.; Wiradharma, N.; Ong, Z. Y.; Coady, D. J.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. Emerging Trends in Macromolecular Antimicrobials to Fight Multi-Drug-Resistant Infections. *Nano Today* **2012**, 7 (3), 201–222.
- (182) Mattheis, C.; Zheng, M.; Agarwal, S. Closing One of the Last Gaps in Polyionene Compositions: Alkylxyethylammonium Ionenenes as Fast-Acting Biocides. *Macromol. Biosci.* **2012**, 12 (3), 341–349.
- (183) Lienkamp, K.; Madkour, A. E.; Musante, A.; Nelson, C. F.; Nüsslein, K.; Tew, G. N. Antimicrobial Polymers Prepared by ROMP with Unprecedented Selectivity: A Molecular Construction Kit Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (30), 9836–9843.
- (184) Palermo, E. F.; Lienkamp, K.; Gillies, E. R.; Ragogna, P. J. Antibacterial Activity of Polymers: Discussions on the Nature of Amphiphilic Balance. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, 58 (12), 3690–3693.
- (185) Fik, C. P.; Krumm, C.; Muennig, C.; Baur, T. I.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C. Impact of Functional Satellite Groups on the Antimicrobial Activity and Hemocompatibility of Telechelic poly(2-Methyloxazoline)s. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (1), 165–172.

- (186) Waschinski, C. J.; Tiller, J. C. Poly(oxazoline)s with Telechelic Antimicrobial Functions. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 235–243.
- (187) Waschinski, C. J.; Herdes, V.; Schueler, F.; Tiller, J. C. Influence of Satellite Groups on Telechelic Antimicrobial Functions of Polyoxazolines. *Macromol. Biosci.* **2005**, *5* (2), 149–156.
- (188) Lam, A. K.; Moen, E. L.; Pusavat, J.; Wouters, C. L.; Panlilio, H.; Ferrell, M. J.; Houck, M. B.; Glatzhofer, D. T.; Rice, C. V. PEGylation of Polyethylenimine Lowers Acute Toxicity While Retaining Anti-Biofilm and β -Lactam Potentiation Properties against Antibiotic-Resistant Pathogens. *ACS Omega* **2020**, *5* (40), 26262–26270.
- (189) Xu, Y.; Zhang, K.; Reghu, S.; Lin, Y.; Chan-Park, M. B.; Liu, X.-W. Synthesis of Antibacterial Glycosylated Polycaprolactones Bearing Imidazoliums with Reduced Hemolytic Activity. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (2), 949–958.
- (190) Álvarez-Paino, M.; Muñoz-Bonilla, A.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J. L.; Heuts, J. P. A.; Fernández-García, M. Effect of Glycounits on the Antimicrobial Properties and Toxicity Behavior of Polymers Based on Quaternized DMAEMA. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (1), 295–303.
- (191) Kozon, D.; Mierzejewska, J.; Kobiela, T.; Grochowska, A.; Dudnyk, K.; Głogowska, A.; Sobiepanek, A.; Kuźmińska, A.; Ciach, T.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Jańczewski, D. Amphiphilic Polymethyloxazoline–Polyethyleneimine Copolymers: Interaction with Lipid Bilayer and Antibacterial Properties. *Macromol. Biosci.* **2019**, *19* (12), 1900254.
- (192) Benincasa, M.; Zahariev, S.; Pelillo, C.; Milan, A.; Gennaro, R.; Scocchi, M. PEGylation of the Peptide Bac7(1–35) Reduces Renal Clearance While Retaining Antibacterial Activity and Bacterial Cell Penetration Capacity. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 210–219.
- (193) Singh, S.; Papareddy, P.; Mörgelin, M.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M. Effects of PEGylation on Membrane and Lipopolysaccharide Interactions of Host Defense Peptides. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (4), 1337–1345.
- (194) Morris, C. J.; Beck, K.; Fox, M. A.; Ulaeto, D.; Clark, G. C.; Gumbleton, M. Pegylation of Antimicrobial Peptides Maintains the Active Peptide Conformation, Model Membrane Interactions, and Antimicrobial Activity While Improving Lung Tissue Biocompatibility Following Airway Delivery. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (6), 3298–3308.
- (195) Michl, T. D.; Locock, K. E. S.; Stevens, N. E.; Hayball, J. D.; Vasilev, K.; Postma, A.; Qu, Y.; Traven, A.; Haeussler, M.; Meagher, L.; Griesser, H. J. RAFT-Derived Antimicrobial Polymethacrylates: Elucidating the Impact of End-Groups on Activity and Cytotoxicity. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (19), 5813.
- (196) Umezawa, N.; Gelman, M. A.; Haigis, M. C.; Raines, R. T.; Gellman, S. H. Translocation of β -Peptide Across Cell Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (3), 368–369.
- (197) Amos, S.-B. T. A.; Vermeer, L. S.; Ferguson, P. M.; Kozłowska, J.; Davy, M.; Bui, T. T.; Drake, A. F.; Lorenz, C. D.; Mason, A. J. Antimicrobial Peptide Potency Is Facilitated by Greater Conformational Flexibility When Binding to Gram-Negative Bacterial Inner Membranes. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 37639.
- (198) Liu, L.; Fang, Y.; Wu, J. Flexibility Is a Mechanical Determinant of Antimicrobial Activity for Amphipathic Cationic α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2013**, *1828* (11), 2479–2486.
- (199) Rončević, T.; Vukičević, D.; Ilić, N.; Krce, L.; Gajski, G.; Tonkić, M.; Goić-Barišić, I.; Zoranić, L.; Sonavane, Y.; Benincasa, M.; Juretić, D.; Maravić, A.; Tossi, A. Antibacterial Activity Affected by the Conformational Flexibility in Glycine-Lysine Based α -Helical Antimicrobial Peptides. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (7), 2924–2936.
- (200) Vermeer, L. S.; Lan, Y.; Abbate, V.; Ruh, E.; Bui, T. T.; Wilkinson, L. J.; Kanno, T.; Jumagulova, E.; Kozłowska, J.; Patel, J.; McIntyre, C. A.; Yam, W. C.; Siu, G.; Atkinson, R. A.; Lam, J. K. W.; Bansal, S. S.; Drake, A. F.; Mitchell, G. H.; Mason, A. J. Conformational Flexibility Determines Selectivity and Antibacterial, Antiplasmodial, and Anticancer Potency of Cationic α -Helical Peptides. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (41), 34120–34133.
- (201) Oddo, A.; Thomsen, T. T.; Britt, H. M.; Løbner-Olesen, A.; Thulstrup, P. W.; Sanderson, J. M.; Hansen, P. R. Modulation of Backbone Flexibility for Effective Dissociation of Antibacterial and Hemolytic Activity in Cyclic Peptides. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (8), 741–745.
- (202) Mayr, J.; Bachl, J.; Schlossmann, J.; Díaz, D. D. Antimicrobial and Hemolytic Studies of a Series of Polycations Bearing Quaternary Ammonium Moieties: Structural and Topological Effects. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (2), 303.

- (203) Bertrand, E.; Gonc, C.; Billiet, L.; Gomez, P.; Pichon, C. ChemComm Histidinylated Linear PEI : A New Efficient Non-Toxic Polymer for Gene Transfer W. **2011**, 12547–12549.
- (204) Ramamoorth, M. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *J. Clin. DIAGNOSTIC Res.* **2015**, 9 (November 2013), 1–6.
- (205) Wiegand, C.; Bauer, M.; Hipler, U. C.; Fischer, D. Poly(ethyleneimines) in Dermal Applications: Biocompatibility and Antimicrobial Effects. *Int. J. Pharm.* **2013**, 456 (1), 165–174.
- (206) Monnery, B. D.; Wright, M.; Cavill, R.; Hoogenboom, R.; Shaunak, S.; Steinke, J. H. G. G.; Thanou, M. Cytotoxicity of Polycations: Relationship of Molecular Weight and the Hydrolytic Theory of the Mechanism of Toxicity. *Int. J. Pharm.* **2017**, 521 (1–2), 249–258.
- (207) Omid, Y.; Kafil, V. Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells. *BiolImpacts* **2011**, 1 (1), 23–30.
- (208) Yew, P. Y. M.; Chee, P. L.; Cally, O.; Zhang, K.; Liow, S. S.; Loh, X. J. Quarternized Short Polyethylenimine Shows Good Activity against Drug-Resistant Bacteria. *Macromol. Mater. Eng.* **2017**, 302 (9), 1700186.
- (209) Zhang, Y.; Jiang, J.; Chen, Y. Synthesis and Antimicrobial Activity of Polymeric Guanidine and Biguanidine Salts. *Polymer (Guildf)*. **1999**, 40 (22), 6189–6198.
- (210) Grigor'eva, M. N.; Stel'makh, S. A.; Astakhova, S. A.; Tsenter, I. M.; Bazarov, L. U.; Batoyev, V. B.; Mogonov, D. M. Synthesis of Polyalkylguanidine Hydrochloride Copolymers and Their Antibacterial Activity Against Conditionally Pathogenic Microorganisms Bacillus Cereus and Escherichia Coli. *Pharm. Chem. J.* **2015**, 49 (2), 99–103.
- (211) Allen, M. J.; White, G. F.; Morby, A. P. The Response of Escherichia Coli to Exposure to the Biocide Polyhexamethylene Biguanide. *Microbiology* **2006**, 152 (4), 989–1000.
- (212) Broxton, P.; Woodcock, P. M.; Heatley, F.; Gilbert, P. Interaction of Some Polyhexamethylene Biguanides and Membrane Phospholipids in Escherichia Coli. *J. Appl. Bacteriol.* **1984**, 57 (1), 115–124.
- (213) Ikeda, T.; Tazuke, S.; Watanabe, M. Interaction of Biologically Active Molecules with Phospholipid Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1983**, 735 (3), 380–386.
- (214) Chindera, K.; Mahato, M.; Kumar Sharma, A.; Horsley, H.; Kloc-Muniak, K.; Kamaruzzaman, N. F.; Kumar, S.; McFarlane, A.; Stach, J.; Bentin, T.; Good, L. The Antimicrobial Polymer PHMB Enters Cells and Selectively Condenses Bacterial Chromosomes. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 23121.
- (215) Kim, S. H.; Kwon, D.; Lee, S.; Ki, S. H.; Jeong, H. G.; Hong, J. T.; Lee, Y.-H.; Jung, Y.-S. Polyhexamethyleneguanidine Phosphate-Induced Cytotoxicity in Liver Cells Is Alleviated by Tauroursodeoxycholic Acid (TUDCA) via a Reduction in Endoplasmic Reticulum Stress. *Cells* **2019**, 8 (9), 1023.
- (216) Park, E. J.; Park, S. J.; Kim, S.; Lee, K.; Chang, J. Lung Fibroblasts May Play an Important Role in Clearing Apoptotic Bodies of Bronchial Epithelial Cells Generated by Exposure to PHMG-P-Containing Solution. *Toxicol. Lett.* **2018**, 286 (January), 108–119.
- (217) Kirby, A. J.; Jencks, W. P. The Reactivity of Nucleophilic Reagents toward the P-Nitrophenyl Phosphate Dianion. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87 (14), 3209–3216.
- (218) Dang, H. S.; Jannasch, P. Anion-Exchange Membranes with Polycationic Alkyl Side Chains Attached: Via Spacer Units. *J. Mater. Chem. A* **2016**, 4 (43), 17138–17153.
- (219) Mohanty, A. D.; Bae, C. Mechanistic Analysis of Ammonium Cation Stability for Alkaline Exchange Membrane Fuel Cells. *J. Mater. Chem. A* **2014**, 2 (41), 17314–17320.
- (220) Lin, C. X.; Wang, X. Q.; Hu, E. N.; Yang, Q.; Zhang, Q. G.; Zhu, A. M.; Liu, Q. L. Quaternized Triblock Polymer Anion Exchange Membranes with Enhanced Alkaline Stability. *J. Memb. Sci.* **2017**, 541, 358–366.
- (221) Fisher, D. M.; Canfell, P. C.; Fahey, M. R.; Rosen, J. I.; Rupp, S. M.; Sheiner, L. B.; Miller, R. D. Elimination of Atracurium in Humans: Contribution of Hofmann Elimination and Ester Hydrolysis versus Organ-Based Elimination. *Anesthesiology* **1986**, 65, 6–12.
- (222) Cao, B.; Li, L.; Tang, Q.; Cheng, G. The Impact of Structure on Elasticity, Switchability, Stability and Functionality of an All-in-One Carboxybetaine Elastomer. *Biomaterials* **2013**, 34 (31), 7592–7600.
- (223) Pauli, D.; Bienz, S. Regioselective Solid-Phase Synthesis of N-Mono-Hydroxylated and N-Mono-Methylated Acylpolyamine Spider Toxins Using an 2-(Ortho-Nitrophenyl)ethanal-Modified Resin. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (15), 4473–4485.

- (224) Komkova, E. N.; Stamatialis, D. F.; Strathmann, H.; Wessling, M. Anion-Exchange Membranes Containing Diamines: Preparation and Stability in Alkaline Solution. *J. Memb. Sci.* **2004**, *244* (1–2), 25–34.
- (225) Kopiasz, R. J.; Szczepańczyk, M.; Jańczewski, D. Unusual Enhancement of Degradation Rate Induced by Polymer Chain Elongation in Quaternized Polyethyleneimine Derivatives. *React. Funct. Polym.* **2019**, *137*, 96–103.
- (226) Stirling, C. J. M. Leaving Groups and Nucleofugality in Elimination and Other Organic Reactions. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12* (6), 198–203.
- (227) Smith, M. B.; March, J. March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure. In *March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure*; A Wiley-Interscience publication, 2001; pp 1299–1322.
- (228) Friebolin, H. Basic One- and Two Dimensional NMR Spectroscopy. In *Basic One- and Two Dimensional NMR Spectroscopy*; VCH, 1993; pp 20–50.
- (229) Ramamoorth, M.; Narvekar, A. Non Viral Vectors in Gene Therapy - An Overview. *J. Clin. Diagnostic Res.* **2015**, *9* (1), GE01-GE06.
- (230) Wen, Y.; Pan, S.; Luo, X.; Zhang, X.; Zhang, W.; Feng, M. A Biodegradable Low Molecular Weight Polyethyleneimine Derivative as Low Toxicity and Efficient Gene Vector. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (2), 322–332.
- (231) Wang, W.; Nan, W.; Sun, L.; Liu, W. A Systemic Gene Vector Constructed by Zwitterionic Polymer Modified Low Molecular Weight PEI. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 993–1000.
- (232) Park, D.; Wang, J.; Klibanov, A. M. One-Step, Painting-like Coating Procedures to Make Surfaces Highly and Permanently Bactericidal. *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22* (2), 584–589.
- (233) Haldar, J.; An, D.; Alvarez de Cienfuegos, L.; Chen, J.; Klibanov, A. M. Polymeric Coatings That Inactivate Both Influenza Virus and Pathogenic Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (47), 17667–17671.
- (234) Hoque, J.; Akkapeddi, P.; Yadav, V.; Manjunath, G. B.; Uppu, D. S. S. M.; Konai, M. M.; Yarlagadda, V.; Sanyal, K.; Haldar, J. Broad Spectrum Antibacterial and Antifungal Polymeric Paint Materials: Synthesis, Structure-Activity Relationship, and Membrane-Active Mode of Action. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (3), 1804–1815.
- (235) Behlau, I.; Mukherjee, K.; Todani, A.; Tisdale, A. S.; Cade, F.; Wang, L.; Leonard, E. M.; Zakka, F. R.; Gilmore, M. S.; Jakobić, F. A.; Dohman, C. H.; Klibanov, A. M. Biocompatibility and Biofilm Inhibition of N,N-Hexyl,methyl-Polyethyleneimine Bonded to Boston Keratoprosthesis Materials. *Biomaterials* **2011**, *32* (34), 8783–8796.
- (236) Hsu, B. B.; Klibanov, A. M. Light-Activated Covalent Coating of Cotton with Bactericidal Hydrophobic Polycations. *Biomacromolecules* **2010**, *12* (1), 6–9.
- (237) Mukherjee, K.; Rivera, J. J.; Klibanov, A. M. Practical Aspects of Hydrophobic Polycationic Bactericidal “paints.” *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *151* (1), 61–70.
- (238) Chanda, M. *Introduction to Polymer Science and Chemistry*; CRC Press, 2013.
- (239) Layman, J. M.; Borgerding, E. M.; Williams, S. R.; Heath, W. H.; Long, T. E. Synthesis and Characterization of Aliphatic Ammonium Ionenenes: Aqueous Size Exclusion Chromatography for Absolute Molecular Weight Characterization. *Macromolecules* **2008**, *41* (13), 4635–4641.
- (240) Williams, S. R.; Borgerding, E. M.; Layman, J. M.; Wang, W.; Winey, K. I.; Long, T. E. Synthesis and Characterization of Well-Defined 12,12-Ammonium Ionenenes: Evaluating Mechanical Properties as a Function of Molecular Weight. *Macromolecules* **2008**, *41* (14), 5216–5222.
- (241) Zhang, M.; Hemp, S. T.; Zhang, M.; Allen, M. H.; Carmean, R. N.; Moore, R. B.; Long, T. E. Water-Dispersible Cationic Polyurethanes Containing Pendant Trialkylphosphoniums. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (12), 3795–3803.
- (242) Zhang, M.; Teo, J. J.; Liu, S.; Liang, Z. C.; Ding, X.; Ono, R. J.; Breyta, G.; Engler, A. C.; Coady, D. J.; Garcia, J.; Nelson, A.; Yang, Y. Y.; Hedrick, J. L. Simple and Cost-Effective Polycondensation Routes to Antimicrobial Consumer Products. *Polym. Chem.* **2016**, *7* (23), 3923–3932.
- (243) Abdulahad, A. I.; Jangu, C.; Hemp, S. T.; Long, T. E. Influence of Counterion on Thermal, Viscoelastic, and Ion Conductive Properties of Phosphonium Ionenenes. *Macromol. Symp.* **2014**, *342* (1), 56–66.
- (244) Kornblum, N.; Willard, J. J.; Anderson, G. J. A New and Selective Method of Oxidation. The Conversion

- of Alkyl Halides and Alkyl Tosylates to Aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (15), 4113–4114.
- (245) Salamone, C.; Snider, B. Quaternary Ammonium Polymers from 1,4-Diaza[2.2.2]bicyclooctane. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1970**, *8*, 3495–3501.
- (246) Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolívar, J. A.; Carnero Ruiz, C. On the Determination of the Critical Micelle Concentration by the Pyrene 1:3 Ratio Method. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258* (1), 116–122.
- (247) Piñeiro, L.; Novo, M.; Al-Soufi, W. Fluorescence Emission of Pyrene in Surfactant Solutions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *215*, 1–12.
- (248) Zimmermann, R.; Freudenberger, U.; Schweiß, R.; Küttner, D.; Werner, C. Hydroxide and Hydronium Ion Adsorption — A Survey. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, *15* (3), 196–202.
- (249) Emoto, K.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. Coating of Surfaces with Stabilized Reactive Micelles from Poly(ethylene glycol)–Poly(DL-Lactic Acid) Block Copolymer. *Langmuir* **1999**, *15* (16), 5212–5218.
- (250) Smith, M. C.; Crist, R. M.; Clogston, J. D.; McNeil, S. E. Zeta Potential: A Case Study of Cationic, Anionic, and Neutral Liposomes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (24), 5779–5787.
- (251) Ganewatta, M. S.; Rahman, M. A.; Mercado, L.; Shokfai, T.; Decho, A. W.; Reineke, T. M.; Tang, C. Facially Amphiphilic Polyionene Biocidal Polymers Derived from Lithocholic Acid. *Bioact. Mater.* **2018**, *3* (2), 186–193.
- (252) Kozon, D.; Mierzejewska, J.; Kobiela, T.; Grochowska, A.; Dudnyk, K.; Głogowska, A.; Sobiepanek, A.; Kuźmińska, A.; Ciach, T.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Jańczewski, D.; Kuz, A.; Ciach, T.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Jańczewski, D. Amphiphilic Polymethyloxazoline – Polyethyleneimine Copolymers: Interaction with Lipid Bilayer and Antibacterial Properties. *Macromol. Biosci.* **2019**, *19* (12), 1900254.
- (253) Geng, Z.; Finn, M. G. Thiabicyclononane-Based Antimicrobial Polycations. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (43), 15401–15406.
- (254) Xu, X.; Xiao, H.; Ziaee, Z.; Wang, H.; Guan, Y.; Zheng, A. Novel Comb-like Ionenenes with Aliphatic Side Chains: Synthesis and Antimicrobial Properties. *J. Mater. Sci.* **2013**, *48* (3), 1162–1171.
- (255) Yaroslavov, A. A.; Sitnikova, T. A.; Rakhnyanskaya, A. A.; Yaroslavova, E. G.; Davydov, D. A.; Burova, T. V.; Grinberg, V. Y.; Shi, L.; Menger, F. M. Biomembrane Sensitivity to Structural Changes in Bound Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (5), 1666–1667.
- (256) Mowery, B. P.; Lee, S. E.; Kissounko, D. A.; Epand, R. F.; Epand, R. M.; Weisblum, B.; Stahl, S. S.; Gellman, S. H. Mimicry of Antimicrobial Host-Defense Peptides by Random Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (50), 15474–15476.
- (257) Graham L., P. *Chemia Medyczna, Podstawowe Zagadnienia*, 2nd ed.; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa, 2001.
- (258) Brennan, P. J. Structure, Function, and Biogenesis of the Cell Wall of Mycobacterium Tuberculosis. *Tuberculosis* **2003**, *83* (1–3), 91–97.
- (259) Chen, H.; Nyantakyi, S. A.; Li, M.; Gopal, P.; Aziz, D. B.; Yang, T.; Moreira, W.; Gengenbacher, M.; Dick, T.; Go, M. L. The Mycobacterial Membrane: A Novel Target Space for Anti-Tubercular Drugs. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1627.
- (260) King, A.; Chakrabarty, S.; Zhang, W.; Zeng, X.; Ohman, D. E.; Wood, L. F.; Abraham, S.; Rao, R.; Wynne, K. J. High Antimicrobial Effectiveness with Low Hemolytic and Cytotoxic Activity for PEG/Quaternary Copolyoxetanes. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (2), 456–467.
- (261) Caruso, F.; Donath, E.; Möhwald, H.; Georgieva, R. Fluorescence Studies of the Binding of Anionic Derivatives of Pyrene and Fluorescein to Cationic Polyelectrolytes in Aqueous Solution. *Macromolecules* **1998**, *31* (21), 7365–7377.
- (262) Wang, Y.; Chi, E. Y.; Schanze, K. S.; Whitten, D. G. Membrane Activity of Antimicrobial Phenylene Ethynylene Based Polymers and Oligomers. *Soft Matter* **2012**, *8* (33), 8547–8558.
- (263) Seddon, J. M.; Robins, J.; Gulik-Krzywicki, T.; Delacroix, H. Inverse Micellar Phases of Phospholipids and Glycolipids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2* (20), 4485–4493.
- (264) Som, A.; Yang, L.; Wong, G. C. L.; Tew, G. N. Divalent Metal Ion Triggered Activity of a Synthetic Antimicrobial in Cardiolipin Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (42), 15102–15103.
- (265) Wilkosz, N.; Jamróz, D.; Kopeć, W.; Nakai, K.; Yusa, S. I.; Wytrwal-Sarna, M.; Bednar, J.; Nowakowska, M.; Kepczynski, M. Effect of Polycation Structure on Interaction with Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (30), 7318–7326.

- (266) Mescola, A.; Marín-Medina, N.; Ragazzini, G.; Accolla, M.; Alessandrini, A. Magainin-H2 Effects on the Permeabilization and Mechanical Properties of Giant Unilamellar Vesicles. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *553*, 247–258.
- (267) Duncanson, W. J.; Figa, M. A.; Hallock, K.; Zalipsky, S.; Hamilton, J. A.; Wong, J. Y. Targeted Binding of PLA Microparticles with Lipid-PEG-Tethered Ligands. *Biomaterials* **2007**, *28* (33), 4991–4999.

Spis rysunków

Rysunek 1. Schemat otoczki komórkowej różnych organizmów sporządzony na podstawie literatury; ^{15,17–19} dla przejrzystości pominąłem białka błonowe.	19
Rysunek 2. (a) Fosfolipidy występujące najczęściej w błonie komórkowej; (b) fosfolipidy o zerowej krzywiznie wewnętrznej tworzą stabilną fazę lamelarną (dwuwarstwę) natomiast o (c) ujemnej odwróconą fazę heksagonalną.	21
Rysunek 3. Oddziaływania CL z M^{2+} prowadzące do zmiany krzywizny CL z zerowej na ujemną. Schemat zaczerpnięty z literatury. ²⁸	23
Rysunek 4. Zaczerpnięte z literatury wykresy obrazujące zawartość hydrofobowych aminokwasów, wypadkowy ładunek w pH 7,4 oraz całkowitą ilość aminokwasów w AMPs sporządzone przez C. Ergene i wsp. ¹⁴ na podstawie bazy peptydów przeciwbakteryjnych (https://aps.unmc.edu/).	26
Rysunek 5. Zaczerpnięte z literatury schematyczne przedstawienie koncepcji zmiany konformacji z kłębka statystycznego, charakteryzującego się lokalną amfifilowością, na globalnie amfifilową podczas oddziaływania z dwuwarstwą fosfolipidową. ¹⁷	27
Rysunek 6. Struktury łańcuchów głównych polimerów (platform polimerowych), których pochodne są najczęściej badane jako SMAMPs.	28
Rysunek 7. (a) Ciśnienie wywierane na listek dwuwarstwy w zależności od geometrii wbudowanego MTAC (na podst. lit. ²³) oraz nie-lamelarne fazy do których może prowadzić (graf. zaczerp. z lit. ³⁰); (b) dyskutowane w literaturze modele działania AMPs tłumaczące zwiększenie przepuszczalności dwuwarstwy fosfolipidowej (graf. zaczerp. z lit. ¹¹⁵).	29
Rysunek 8. Barwnik fluorescencyjny DiSC ₃ (5) wykorzystywany do badania depolaryzacji dwuwarstwy fosfolipidowej przez AMPs i SMAMPs.	35
Rysunek 9. Barwnik fluorescencyjny IP wykorzystywany do badania przepuszczalności błony komórkowej.	36
Rysunek 10. Zaczerpnięte z literatury przykładowe zdjęcie komórek E. coli inkubowanych z kationową pochodną poliwęglanu i FITC-dekstranem 100 kDa pokazujące dobre skorelowanie fluorescencji z umiejscowieniem komórek. ¹⁰³	38
Rysunek 11. Zaczerpnięte z literatury przykładowe obrazy TEM (A1-A3) ⁴⁴ i SEM (B1-B3) ³⁹ komórek bakteryjnych przed (A1 i B1) i po (A1, A2, B1 i B2) traktowaniu ich SMAMPs.	39
Rysunek 12. Schematyczne przedstawienie metodyki badania działania AMPs i SMAMPs na dwuwarstwę z wykorzystaniem liposomów wypełnionych barwnikiem fluorescencyjnym.	40
Rysunek 13. Schematyczne przedstawienie metody badania oddziaływania AMPs i SMAMPs z liposomami z wykorzystaniem techniki DLS.	42
Rysunek 14. Przykładowe obrazy TEM LUVs inkubowanych (A) bez dodatku oraz z dodatkiem (B) 0.18 ekwiwalentu lub (C) 5 ekwiwalentów hitozanu. ¹⁶⁵	43

Rysunek 15. Schematyczna prezentacja najczęstszych połączeń grupy hydrofobowej z kationową względem łańcucha głównego polimeru dla SMAMPs (a) zawierających grupę kationową w łańcuchu bocznym oraz (b) jonenów; (c) kopolimery blokowe.	44
Rysunek 16. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem architektury na aktywność.	46
Rysunek 17. Zobrazowanie strategii modulowania HLB polikationów na poziomie (a) monomeru oraz (b) poprzez kopolimeryzację monomerów hydrofobowych i hydrofilowych; (c) schematyczna zobrazowanie jonenów.	47
Rysunek 18. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem grupy końcowej na aktywność.....	49
Rysunek 19. Przykładowe struktury PMOX, które posłużyły do zbadania aktywacji nieaktywnego i neutralnego polimeru poprzez amfifilową kationową grupę końcową.....	50
Rysunek 20. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem średniej masy molowej na aktywność.....	51
Rysunek 21. Struktura polimetakrylanów otrzymanych w grupie K. Kuroda, które posłużyły do oceny wpływu rodzaju grupy kationowej na aktywność. Grafika zaczerpnięta z lit. ⁵⁶	53
Rysunek 22. Struktura polikationów które posłużyły do zbadania różnicy pomiędzy pierwszorzędową grupą aminową, a guanidynową.	53
Rysunek 23. Struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem gęstości rozmieszczenia grup kationowych.	54
Rysunek 24. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem elastyczności łańcucha głównego SMAMPs.....	55
Rysunek 25. Przykładowe struktury polikationów, które posłużyły do badań nad wpływem izomerii łańcucha głównego SMAMPs. Schemat zaczerpnięty z lit. ²⁰²	56
Rysunek 26. Struktury najszerzej zbadanych liniowych jonenów.	56
Rysunek 27. Struktury względnie hydrofilowych jonenów będących czwartorzędowymi solami amoniowymi o silnej aktywności przeciwbakteryjnej i niskiej hemolityczności.....	58
Rysunek 28. Koncepcja struktur polikationów, opartych o strukturę L-PEI, pozwalających na zbadanie wpływu wybranych parametrów na właściwości biologiczne, która nie została zrealizowana.	62
Rysunek 29. Góra: zidentyfikowane produkty rozpadu badanych soli amoniowych w środowisku zasadowym w temperaturze 25 °C. Na czerwono zaznaczono atomy wodoru na które następuje atak anionu hydroksylowego w myśl reakcji eliminacji Hofmanna; dół: konwersja soli amoniowych (50 mM) do produktów reakcji eliminacji pod wpływem wodorotlenku litu (60 mM dla reakcji z 6, 7 i 10; 600 mM dla reakcji z 5 i 9) w wodzie w temperaturze 25 °C obliczona na podstawie spektroskopii ¹ H NMR.	67

Rysunek 30. (a) Dopasowanie danych zaprezentowanych na Rysunku 29 do równania kinetyki drugiego rzędu na przykładzie reakcji soli amoniowej 7 ; (b) tabela zestawiająca oszacowane k_s z przesunięciami chemicznymi (δ) atomów wodoru ulegającymi eliminacji (H); (c) zależność logarytmu naturalnego k_s od δ , kształty reprezentują różne grupy odchodzące: $\square$ - 12 , $\circ$ - TMA, $\diamond$ - 14 , Δ – DABCO.	69
Rysunek 31. (a) Główna ścieżka rozpadu Me ₂ -L-PEI w środowisku zasadowym; (b) konwersja soli 7 i 9 oraz jednostek powtarzalnych Me ₂ -L-PEI (50 mM) w wodnym roztworze Na ₂ CO ₃ (100 mM) z dodatkiem NaCl (400 mM) w temperaturze 25 °C na podstawie analiz widm ¹ H NMR.	72
Rysunek 32. Zestawienie widm ¹ H NMR (400 MHz, D ₂ O) (a) di-aminy 19 oraz surowego produktu modelowej poliaddycji prowadzonej z nadmiarem (b) di-aminy 19 lub (c) di-bromku 15-C0	80
Rysunek 33. (a) dystrybucja masy molekularnej surowych produktów modelowej poliaddycji (Schemat 8) oraz (b) porównanie dystrybucji mas molekularnych surowego produktu otrzymanego dla stężenia monomeru 19 równego 380 mM przed i po dializie.	82
Rysunek 34. Zestawienie widm ¹ H NMR (400 MHz, D ₂ O) wszystkich otrzymanych polimerów z etoksylogową grupą boczną.	87
Rysunek 35. Wyniki oznaczeń MIC wobec modelowym mikroorganizmom z ATCC.	92
Rysunek 36. Żywotność mikroorganizmów po inkubacji z jonenami w PBS w 37 °C przez 2 godziny.	95
Rysunek 37. Wyniki oznaczeń MIC jonenów bez alkilowych grup bocznych wobec modelowym mikroorganizmom. Część wyników została zaczerpnięta z Rysunku 35.	98
Rysunek 38. Schematyczne przedstawienie potencjalnie najbardziej amfifilowych konformacji jonenów bez bocznych grup alkilowych. Na przykładzie jonenów z DABCO. Fragmenty hydrofilowe zaznaczono na czerwono, hydrofobowe na niebiesko.	99
Rysunek 39. Kinetyka zabijania <i>S. aureus</i> (a-d) oraz <i>E. coli</i> (e-h) przez C0-T-p-T (a, e), C0-D-p-D (b, f), C8-T-p-T (c, g) i C8-D-p-D (d, h). Porównanie wpływu sztywności i hydrofobowości jonenów. Badania wykonano w pożywce wzrostowej MHB.	105
Rysunek 40. Kinetyka zabijania <i>S. aureus</i> z ATCC w pożywce wzrostowej MHB. Porównanie wpływu dodatku grupy oPEG.	106
Rysunek 41. (a) Wyniki badań właściwości hemolitycznych otrzymanych jonenów w stężeniu 5 mg/mL (dla n = 0, 2, 4, 8) lub 2.5 mg/mL (dla n = 12); (b) zależność stopnia hemolizy od stężenia wybranych jonenów.	107
Rysunek 42. Badania depolaryzacji błony komórkowej <i>S. aureus</i> inkubowanego z jonenami (a) giętkimi lub (b) sztywnymi o stężeniu 1 µg/mL w PBS w 37 °C przy pomocy barwnika DiSC ₃ (5). Strzałką zaznaczono moment dodania jonenów.	113
Rysunek 43. Badania depolaryzacji błony komórkowej <i>S. aureus</i> . Reprodukacja wyników z Rysunku 42 w celu porównania wpływu elastyczności łańcucha głównego na depolaryzację.	114

Rysunek 44. Zdjęcia mikroskopowe <i>E. coli</i> inkubowanej z FITC-dekstran o masie cząsteczkowej 40 kDa i 150 kDa (150 µg/mL) w obecności C0-T-p-T i C8-T-p-T (16 µg/mL) w PBS pH 7,4 w 37 °C przez 2 h. Pasek skali odpowiada 10 µm.....	115
Rysunek 45. Zeta-potencjał komórek <i>E. coli</i> inkubowanych przez 1 h w PBS w 25 °C z wybranymi polimerami.	116
Rysunek 46. (a) wpływ jonenów z serii Cn-T-p-T w stężeniu 20 µg/mL oraz (b) jonenu C12-T-p-T w różnych stężeniach na fluorescencję kalceiny. Pomiary przeprowadzono w PBS pH 7,4 w temperaturze 25 °C, $\lambda_{\text{ex}}=490$ nm, $\lambda_{\text{em}}=515$ nm.	119
Rysunek 47. Widma emisyjne kalceiny o stężeniu 0.56 µM w PBS pH 7,4 w 25 °C w obecności wybranych jonenów, $\lambda_{\text{ex}}=490$ nm.	120
Rysunek 48. Wyływ kalceiny z LUVs (stężenie lipidów 7,6 µg/mL, ca. 10 µM) złożonych z (a) POPC i (b) EcLE inkubowanych z jonenami w stężeniu 1,28 µg/mL (jony dodano w 60 sekundzie); (c) wyływ kalceiny z LUVs złożonych z EcLE po 900 s inkubacji z jonenami w różnych stężeniach. Porównanie wyływu kalceiny w obecności C8-T-p-T dla różnego stężenia lipidów w (d) skali stężenia polimeru oraz (e) P/L (w przeliczeniu na liczbę jednostek powtarzalnych). Legenda w (c) obejmuje również (a) i (b). Znaczniki w (a) i (b) zostały dodane dla poprawienia czytelności i nie odpowiadają punktom eksperymentalnym, które były rejestrowane co 5 sekund.....	122
Rysunek 49. Wyływ kalceiny z LUVs (stężenie lipidów 7,6 µg/mL, ca. 10 µM) złożonych z (a) POPC/POPG 4/1, (b) POPE/POPG 4/1 i (c) POPE/TOCL 4/1 inkubowanych z jonenami w stężeniu 1,28 µg/mL. Wyływ kalceiny z LUVs o różnym składzie lipidowym po 900 s inkubacji z (d) C0-T-p-T i (e) C8-T-p-T. Legenda w (a) obejmuje również (b) i (c). Znaczniki w (a-c) zostały dodane dla poprawienia czytelności i nie odpowiadają punktom eksperymentalnym, które były rejestrowane co 5 sekund.....	124
Rysunek 50. Postulowany mechanizm działania hydrofilowych jonenów w oparciu o zmianę krzywizny wewnętrznej TOCL z zerowej na ujemną.	126
Rysunek 51. Wizualizacja proponowanego wytłumaczenia obserwowanej stabilizacji liposomów, na przykładzie dwuwarstwy złożonej z POPE/TOCL 4/1, przez hydrofobowe jony dla wysokiego P/L.	128
Rysunek 52. Rozmiar cząstek jako średnica hydrodynamiczna, oraz zeta-potencjał LUVs (stężenie lipidów 7,6 µg/mL, ca. 10 µM) zbudowanych z EcLE po 2-godzinnej inkubacji z wybranymi jonenami w PBS pH 7,4 w 25 °C; (a) wyniki w skali stężenia polimeru, (b) wyniki w skali P/L.....	130
Rysunek 53. Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe liposomów (stężenie lipidów 625 µg/mL, ca. 820 µM) z EcLE barwionych czerwienią nilu (a) przed inkubacją z jonenami oraz po inkubacji z (b, c) C0-T-p-T lub (d, e) C8-T-p-T w PBS pH 7,4 w 25 °C stosując P/L równe (b, d) 0.17 lub (c, e) 0.67. Pasek skali odpowiada 10 µm.	131
Rysunek 54. Wyływ kalceiny z LUVs (stężenie lipidów 7,6 µg/mL, ca. 10 µM) złożonych z EcLE po 900 s inkubacji z jonenami w PBS pH 7,4 w 25 °C. Porównanie aktywności jonenów elastycznych (Cn-T-p-T) z sztywnymi (Cn-D-p-D). Wyniki dla serii Cn-T-p-T pochodzą z Rysunek 48.....	134

Rysunek 55. Wyniki badań na LUV (stężenie lipidów 7,6 µg/mL, ca. 10 µM) z EcLE w PBS pH 7,4 w 25 °C. (a) wpływ kalceiny po 900 s inkubacji z jonenami; (b, c) rozmiar cząstek, jako średnica hydrodynamiczna, oraz (d, e) zeta potencjał LUV po 2-godzinnej inkubacji z jonenami. 135

Spis schematów

Schemat 1. Wybrane przykłady reakcji przeprowadzonych w celu realizacji koncepcji przedstawionej na Rysunku 28.	64
Schemat 2. Synteza pochodnych 5 - 9 i Me ₂ -L-PEI wykorzystanych w badaniach nad stabilnością czwartorzędowych soli amoniowych.	65
Schemat 3. Prezentacja koncepcji struktur polikationów wykorzystanych do zbadania wpływu wybranych parametrów strukturalnych na właściwości biologiczne.	74
Schemat 4. Plan syntezy biblioteki jonenów. Aniony bromkowe pomięto dla poprawienia czytelności.	75
Schemat 5. Ścieżka syntezy monomerów 15-Cn ; (a) K ₂ CO ₃ , MeCN, T _{wrz} , 24h; (b) LAH, THF, T _{pok} , 24h; (c) PBr ₃ , DCM, T _{pok} , 24h.	77
Schemat 6. Ścieżka syntezy di-aminowych monomerów 16, 17, 18 i 19	78
Schemat 7. Ścieżka syntezy di-aminowego monomeru 6 zawierającego fragment PEG'u.	79
Schemat 8. Modelowa reakcja, która posłużyła do wstępnych badań nad poliaddycją.	79
Schemat 9. Synteza jonenu o podstawnikach arylowych w izomerii para.	84

Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka produktów reakcji testowych pomiędzy 15-C4, a różnymi di-aminami. Struktury di-amin znajdują się na Schemacie 4.	83
Tabela 2. Charakterystyka biblioteki polimerów użytych do dalszych badań. Struktury polimerów przedstawiono na Schemacie 4 na stronie.	86
Tabela 3. Krytyczne stężenie agregacji badanych joneneów oraz zeta-potencjał powstających agregatów.	89
Tabela 4. Porównanie aktywności hamującej wzrost oraz bakterio i grzybobójczej jonenów z serii Cn-T-p-T.	94
Tabela 5. Aktywność wybranych jonenów przeciwko szczepom klinicznym.	102
Tabela 6. Aktywność wybranych jonenów przeciwko prątkom.	103

Tabela 7. Cytotoksyczność jonenów serii Cn-T-p-T wobec komórek linii L929 oznaczona metodą XTT w obecności FBS 10% v/v oraz bez FBS. Czas inkubacji 24 h.....	109
Tabela 8. Wpływ grupy oPEG na cytotoksyczność jonenów wobec komórek linii L929 oznaczoną metodą XTT. Czas inkubacji 24 h.....	111
Tabela 9. Charakterystyka badanych liposomów w PBS pH 7,4 przy pomocy DLS.	118
Tabela 10. Współczynnik A dla zbadanych jonenów.....	121
Tabela 11. Wykaz komercyjnie dostępnych związków chemicznych użytych podczas wykonywania pracy.....	140

Artykuły własne i samodzielność pracy

Artykuły włączone w rozprawę doktorską

Poniżej zamieściłem listę moich artykułów zawierających wyniki badań przedstawionych w niniejszym rozprawie doktorskiej. Artykuły podzieliłem na opublikowane, w trakcie recenzji oraz w przygotowaniu.

Opublikowane

1. **Kopiasz, R. J.**, Szczepańczyk, M., Jańczewski, D. “Unusual enhancement of degradation rate induced by polymer chain elongation in quaternized polyethyleneimine derivatives”. *Reactive and Functional Polymers*, 2019, 137, str. 96-103.

Artykuł zawiera opis badań nad szybkością reakcji eliminacji Hofmanna czwartorzędowych soli amoniowych o różnej ilości grup amoniowych oraz sztywności, wraz z dyskusją wyników, które opisałem w Punkcie 8.1.

2. **Kopiasz, R. J.**, Tomaszewski, W., Kuźmińska, A., Chreptowicz, K., Mierzejewska, J., Ciach, T., Jańczewski, D. “Hydrophilic Quaternary Ammonium Ionenenes—Is There an Influence of Backbone Flexibility and Topology on Antibacterial Properties?”. *Macromolecular Bioscience*, 2020, 20(7), str. 2000063.

Artykuł zawiera opis badań nad syntezą jonenów C0-T-m-T, C0-D-m-D, p-T-p-T i p-D-p-D, oraz charakterystykę produktów końcowych. Zawarte są w nim również wyniki oznaczeń MIC oraz właściwości hemolitycznych tych polimerów, a także wstępna dyskusja wyników pod kątem wpływu izomerii i sztywności łańcucha głównego.

3. **Kopiasz, R. J.**, Rukasz, A., Chreptowicz, K., Podgórski, R., Kuźmińska, A., Mierzejewska, J., Tomaszewski, W., Ciach, T., Jańczewski, D. “Influence of lipid bilayer composition on the activity of antimicrobial quaternary ammonium ionenes, the interplay of intrinsic lipid curvature and polymer hydrophobicity, the role of cardiolipin”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 207, str. 112016.

Artykuł zawiera opis syntezy jonenów Cn-T-p-T wraz z charakterystyką produktów końcowych. Zawarte są w nim wyniki oznaczeń mikrobiologicznych (MIC, MBC, MFC), właściwości hemolitycznych oraz cytotoksyczność tych polimerów. Artykuł obejmuje także wyniki badań z wykorzystaniem barwników FITC-dekstran i DiSC₃(5), badania zeta-potencjału komórek *E. coli* oraz szerokie badania na liposomach przeprowadzone dla serii Cn-T-p-T.

Opublikowane zostały w nim hipotezy dotyczące oddziaływania jonenów z CL oraz uszczelniania liposomów zawierających PE przez hydrofobowe jony.

W recenzji

4. **Kopiasz, R. J.**, Kulbacka, N., Drężek, K., Podgórski, R., Łojarczyk, I., Mierzejewska, J., Tomaszewski, W., Ciach, T., Jańczewski, D. "Incorporation of PEG subunits substantially reduces cytotoxicity of antibacterial ionenes." *Biomacromolecules*, 2021

Artykuł zawiera opis badań nad syntezą jonenów z serii Cn-D-m-D i Cn-D-PEG-D oraz charakterystykę produktów końcowych. Zawarte są w nim również wyniki oznaczeń MIC, kinetyki zabijania *S. aureus*, właściwości hemolitycznych oraz IC₅₀ tych polimerów. Obejmuje on także badania na liposomach dotyczące wpływu grupy oPEG na aktywność jonenów.

W przygotowaniu

5. **Kopiasz, R. J.**, Zabost, A., Mysza, M., Kuźmińska, A., Drężek, K., Mierzejewska, J., Tomaszewski, W., Augustynowicz-Kopeć, E., Ciach, T., Jańczewski, D. "A main-chain flexibility and overall hydrophobicity of ionenes strongly impact their antimicrobial activity; studies on drug resistance strains and *Mycobacterium* species."

Artykuł zawierać będzie opis syntezy jonenów z serii Cn-D-p-D i Cn-T-m-T oraz charakterystykę produktów końcowych. Dane te, wraz z danymi dla pozostałych jonenów, będą stanowić podstawę dyskusji wpływu sztywności oraz izomerii łańcucha głównego na CAC i zeta-potencjał jonenów. Zawarte w nim będą również wyniki oznaczeń MIC, kinetyki zabijania i badań nad właściwościami hemolitycznym, które to dane, zestawione z danymi dla pozostałych jonenów, będą podstawą dyskusji wpływu sztywności i izomerii na aktywność biologiczną tych związków. Artykuł będzie obejmował także dyskusję wyników oznaczeń MIC wobec szczepów klinicznych oraz wyników badań nad depolaryzacją błony komórkowej *S. aureus* i badań na liposomach z kalceiną obrazujących wpływ sztywności na aktywność.

Artykuł nie włączony w rozprawę doktorską

Opublikowany artykuł mojego autorstwa nie włączony w rozprawę doktorską ze względu na nie w pełni pasującą tematykę do mojego głównego nurtu badawczego:

6. **Kopiasz, R. J.**, Kozon, D., Pachla, J., Skórka, Ł., Jańczewski, D. "Controlled post-polymerization modification through modulation of repeating unit reactivity: Proof of concept discussed using linear polyethylenimine example". *Polymer*, 2021, 217, str. 123452.

Samodzielność pracy

Znacząca większość wyników, które przedstawiłem w mojej rozprawie doktorskiej, została uzyskana przeze mnie lub studentów wykonujących prace dyplomowe pod moim nadzorem. W celu uniknięcia nieporozumień chciałbym podkreślić, które z wyników zostały uzyskane przez innych badaczy po dostarczeniu im próbek moich związków. Analiza wszystkich otrzymanych wyników została przeprowadzona przeze mnie.

Oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej przeciwko szczepom klinicznym, opisane w podrozdziale 9.1.2., zostały wykonane przez dr Annę Zabost w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie po dostarczeniu próbek w postaci stałej.

Ocena biokompatybilności, przedstawiona w podrozdziale 9.2., została wykonana w Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej PW. Badania nad właściwościami hemolitycznymi zostały przeprowadzone przez mgr. inż. Aleksandrę Kuźmińską oraz dr inż. Ilonę Łojczyk po dostarczeniu roztworów jonenów o odpowiednich stężeniach w PBS. Oznaczenia właściwości cytotoksycznych zostały natomiast wykonane we współpracy z mgr inż. Rafałem Podgórskim, który przygotował komórki do oznaczeń oraz przeprowadził właściwe oznaczenia z wykorzystaniem XTT po inkubacji z badanymi związkami. Natomiast wspólnie przygotowaliśmy roztwory w DMEM z FBS w odpowiednich stężeniach i nanieśliśmy na płytki z komórkami.

Obserwacje z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu konfokalnego, opisanych w punkcie 10.1.2., zostały wykonane w Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej PW we współpracy z mgr inż. Rafałem Podgórskim.

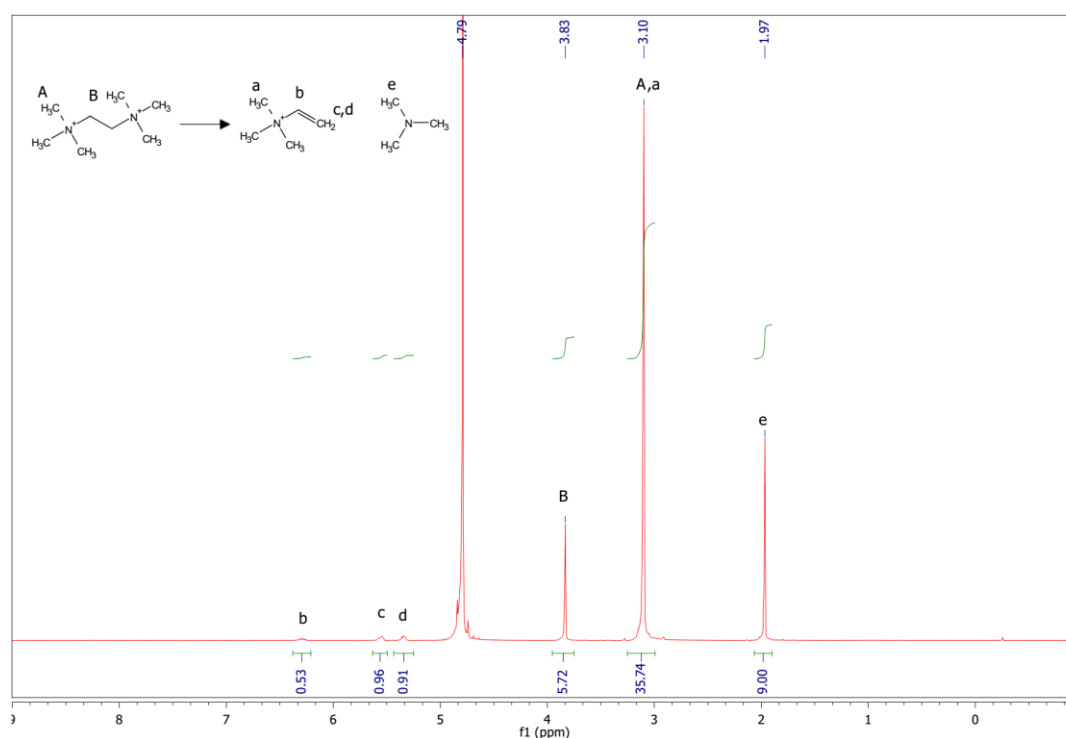
Oznaczenia z wykorzystaniem SEC zostały wykonane przez dr hab., prof. PW Waldemara Tomaszewskiego z Zakładu Materiałów Wysokoenergetycznych Wydziału Chemicznego PW po dostarczeniu eluentu oraz odpowiednich roztworów jonenów.

Badania mikrobiologiczne, przeprowadzone na mikroorganizmach z ATCC, zostały wykonane przeze mnie w ścisłej współpracy z dr hab., prof. PW Jolantą Mierzejewską oraz dr inż. Karoliną Chreptowicz z Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków Wydziału Chemicznego PW.

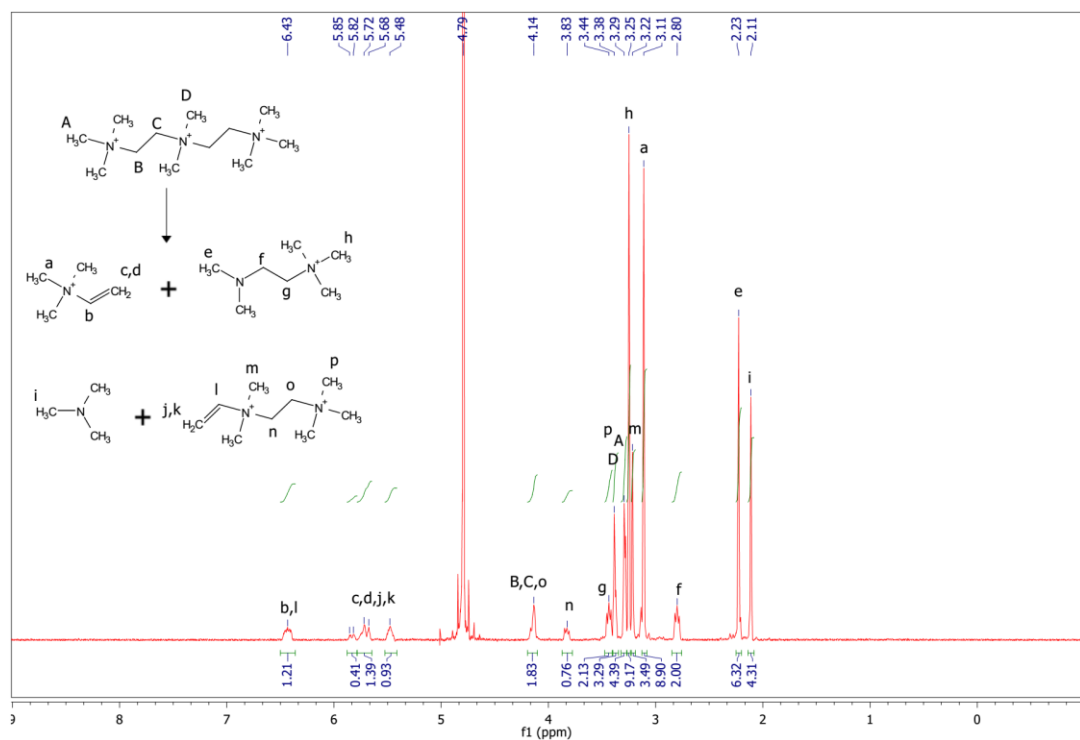
Załącznik 1. Widma ^1H NMR wykorzystane w badaniach nad kinetyką eliminacji Hofmanna

Wybrane elementy z informacji uzupełniającej (Supporting Information) do opublikowanego artykułu własnego:

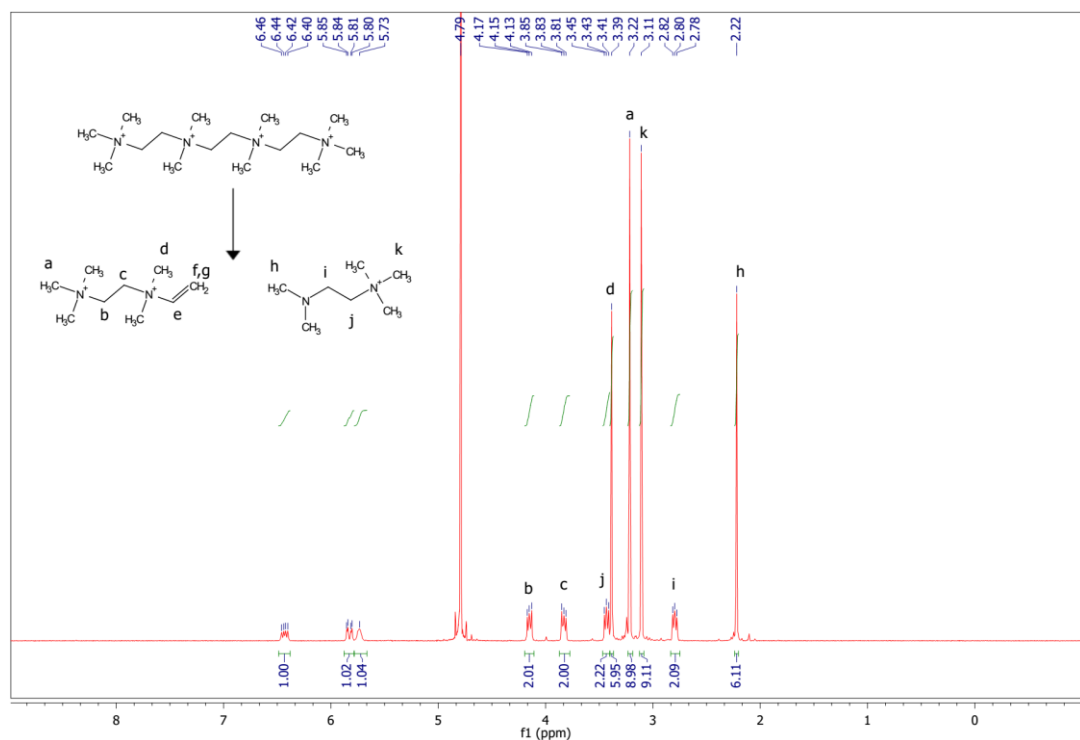
Kopiasz, R. J., Szczepańczyk, M., Jańczewski, D., “Unusual enhancement of degradation rate induced by polymer chain elongation in quaternized polyethyleneimine derivatives”, *Reactive and Functional Polymers*, 2019, 137, str. 96-103.



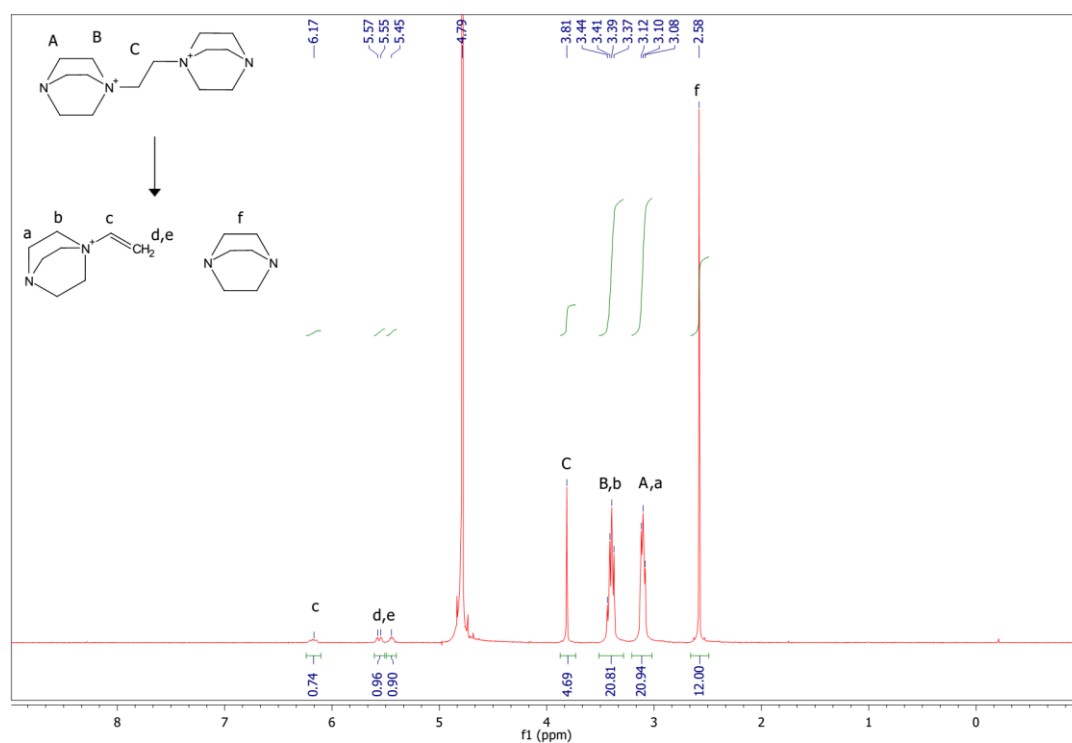
Rysunek Z1.1. Widmo ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) surowej mieszaniny reakcyjnej soli amoniowej 5 z LiOD w której osiągnięto 40% konwersji.



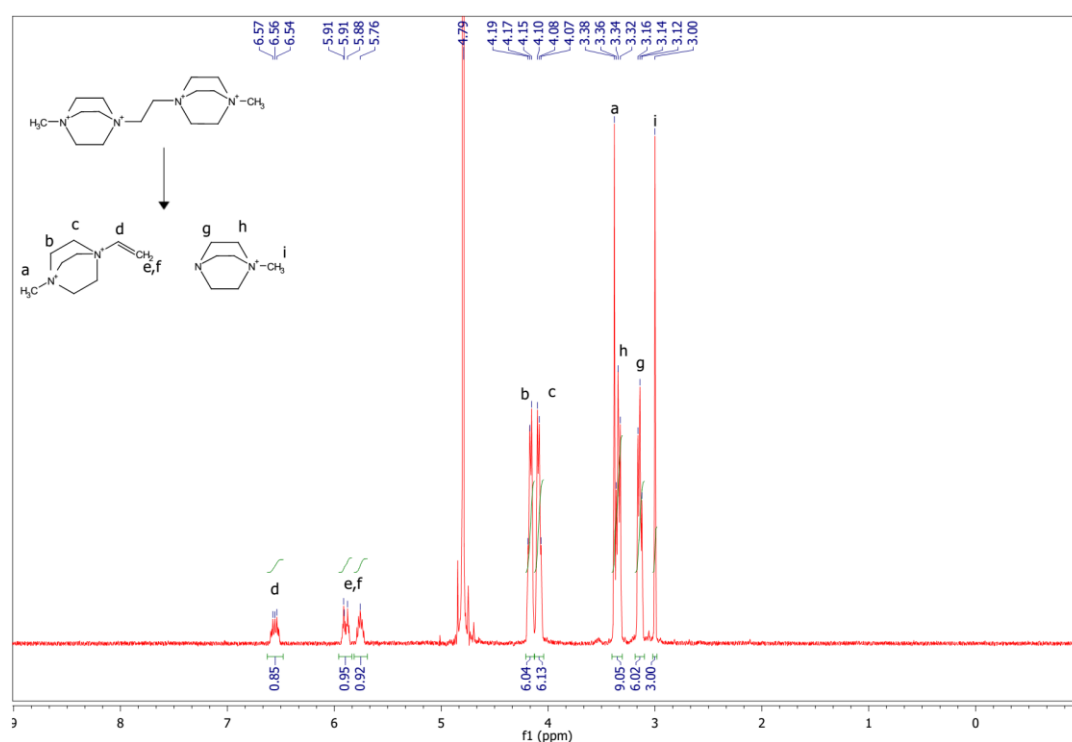
Rysunek Z1.2. Widmo ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) surowej mieszaniny reakcyjnej soli amoniowej **6** z LiOD w której osiągnięto 40% konwersji.



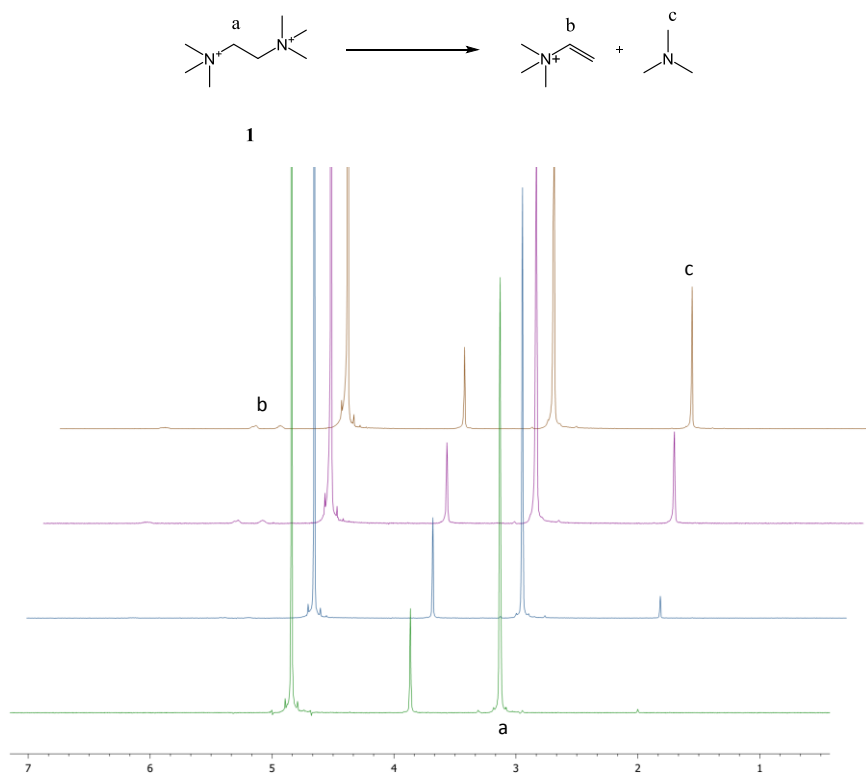
Rysunek Z1.3. Widmo ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) surowej mieszaniny reakcyjnej soli amoniowej **7** z LiOD w której osiągnięto >98% konwersji.



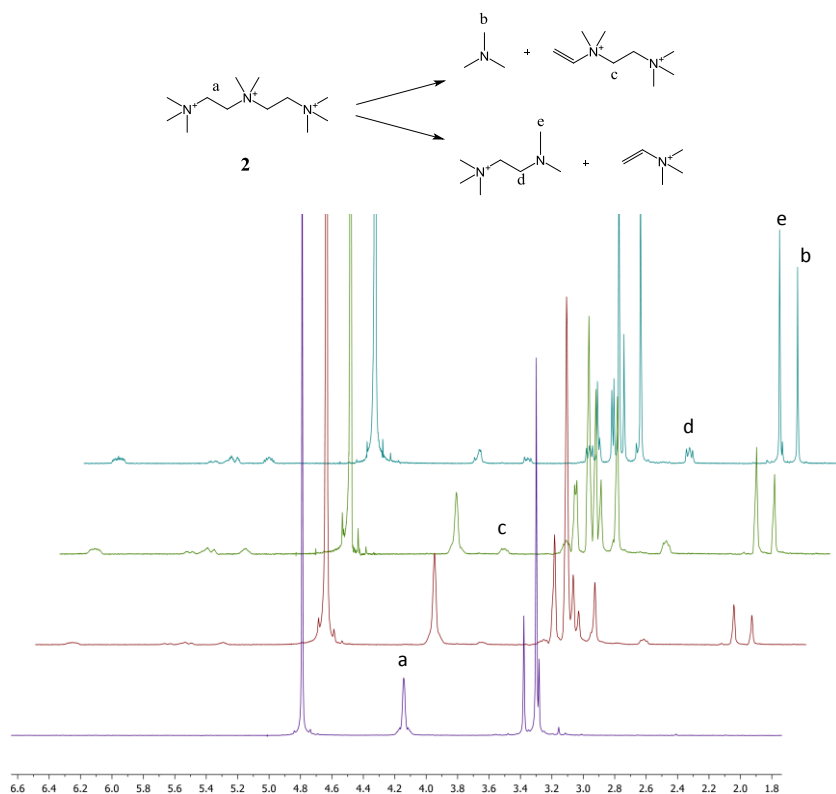
Rysunek Z1.4. Widmo ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) surowej mieszaniny reakcyjnej soli amoniowej **8** z LiOD, w której osiągnięto 46% konwersji.



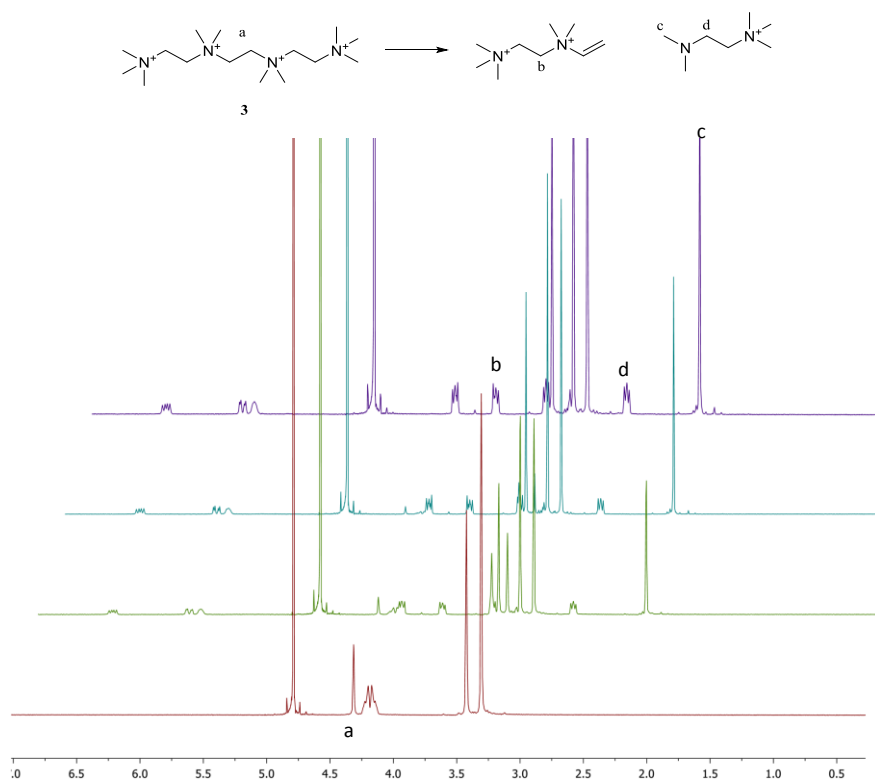
Rysunek Z1.5. Widmo ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) surowej mieszaniny reakcyjnej soli amoniowej **9** z LiOD, w której osiągnięto 98% konwersji.



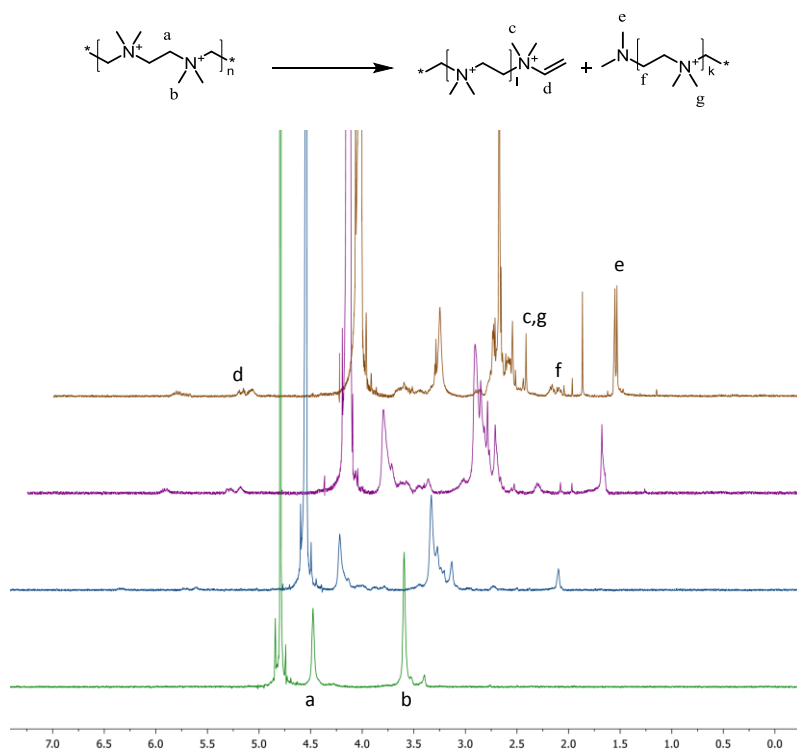
Rysunek Z1.6. Zestawienie widm ^1H NMR z eliminacji Hofmanna soli **5** w LiOD o stężeniu 0,6 mol/L po różnym czasie.



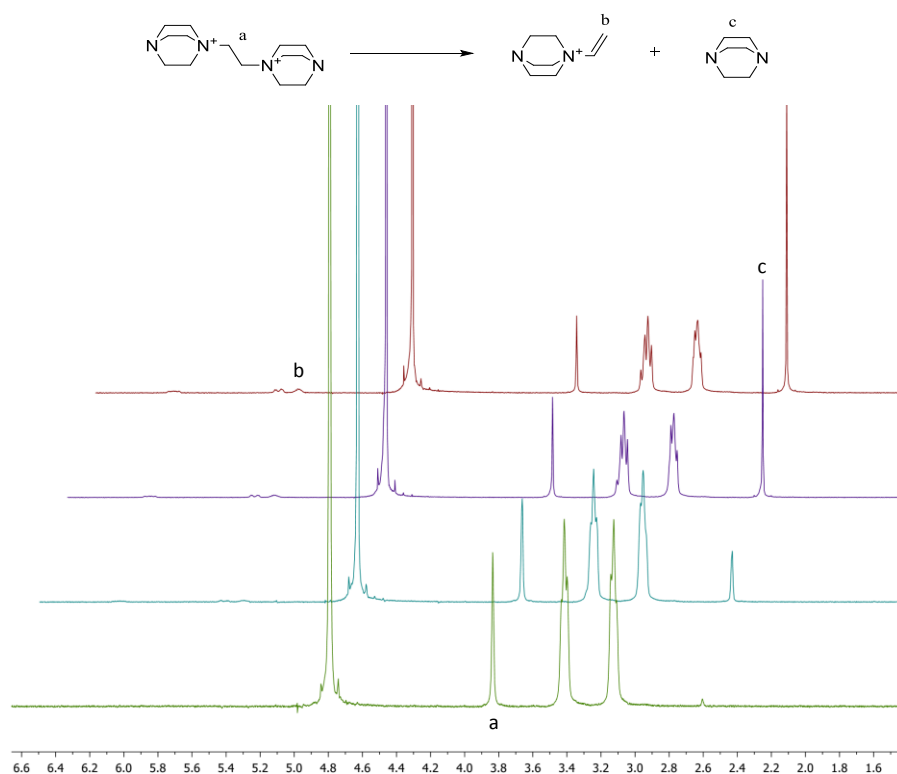
Rysunek Z1.7. Zestawienie widm ^1H NMR z eliminacji Hofmanna soli **6** w LiOD o stężeniu 0,06 mol/L po różnym czasie.



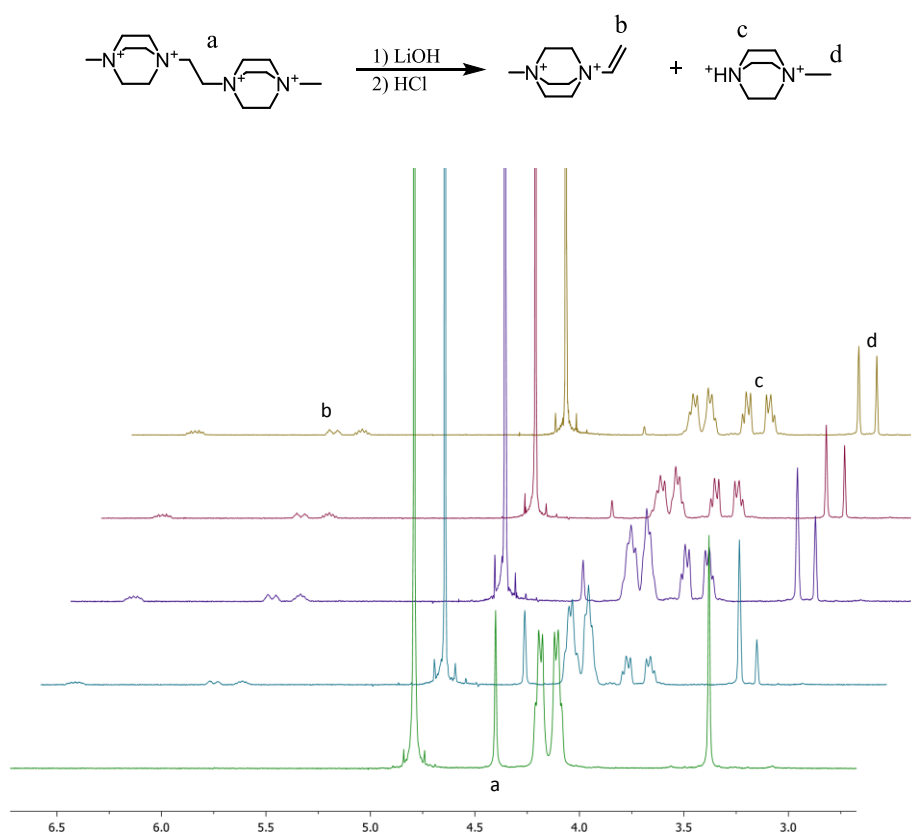
Rysunek Z1.8. Zestawienie widm ^1H NMR z eliminacji Hofmanna soli 7 w LiOD o stężeniu 0,06 mol/L po różnym czasie.



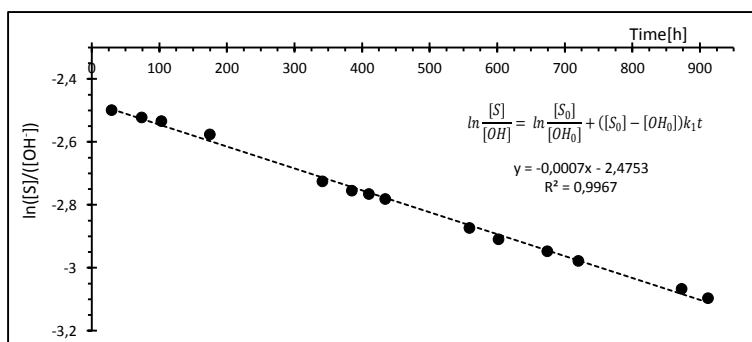
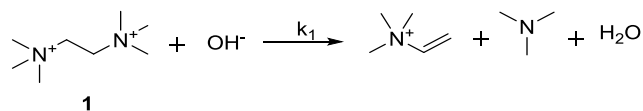
Rysunek Z1.9. Zestawienie widm ^1H NMR z eliminacji Hofmanna soli Me₂-L-PEI w 0,1 mol/L Na₂CO₃ po różnym czasie.



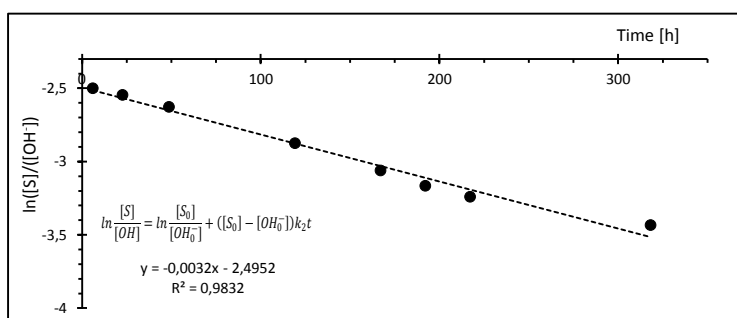
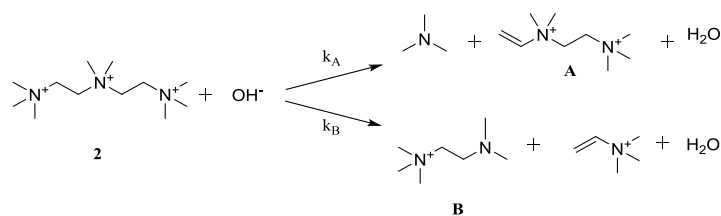
Rysunek Z1.10. Zestawienie widm ^1H NMR z eliminacji Hofmanna soli **8** w 0,06 mol/L LiOD po różnym czasie.



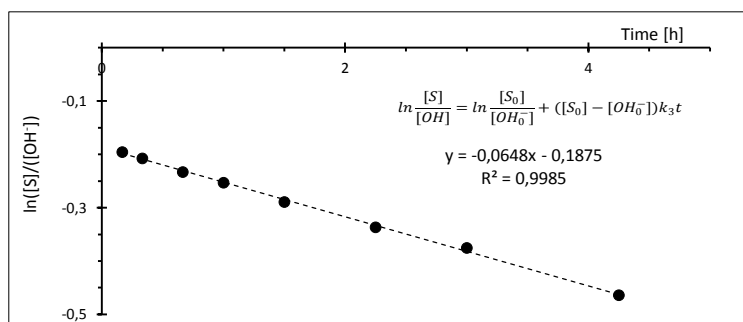
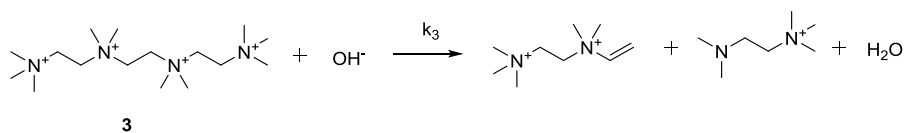
Rysunek Z1.11. Zestawienie widm ^1H NMR z eliminacji Hofmanna soli **9** w 0,06 mol/L LiOD po różnym czasie.



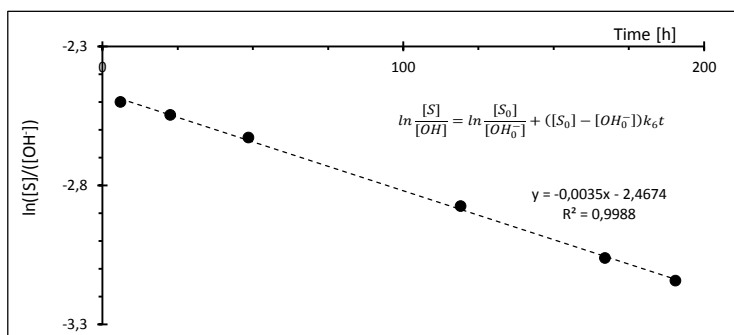
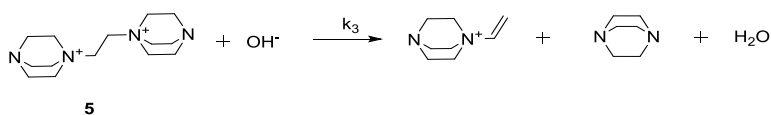
Rysunek Z1.12. Dopasowanie danych eksperymentalnych z reakcji eliminacji Hofmanna w 25 °C soli **5** do modelu reakcji kinetyki drugiego rzędu.



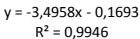
Rysunek Z1.13. Dopasowanie danych eksperymentalnych z reakcji eliminacji Hofmanna w 25 °C soli **6** do modelu reakcji kinetyki drugiego rzędu.



Rysunek Z1.14. Dopasowanie danych eksperymentalnych z reakcji eliminacji Hofmanna w 25 °C soli **7** do modelu reakcji kinetyki drugiego rzędu.

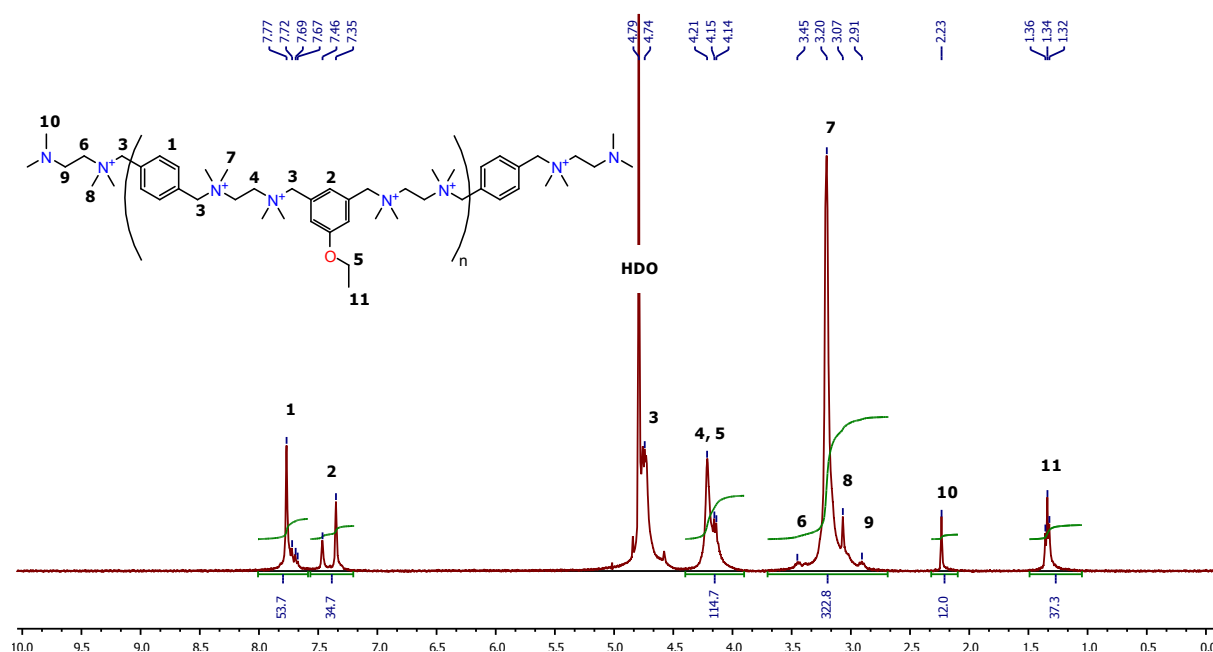


Rysunek Z1.15. Dopasowanie danych eksperymentalnych z reakcji eliminacji Hofmanna w 25 °C soli **8** do modelu reakcji kinetyki drugiego rzędu.

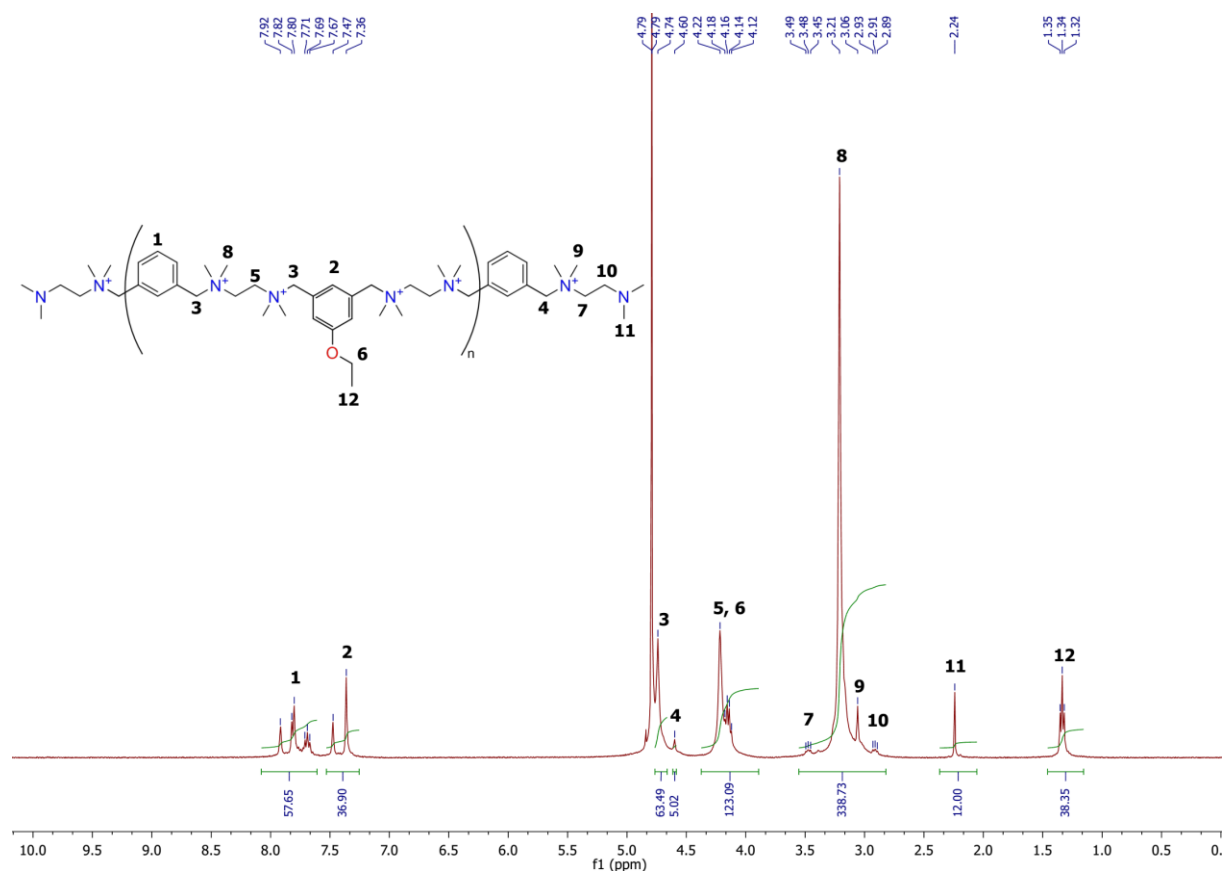


200

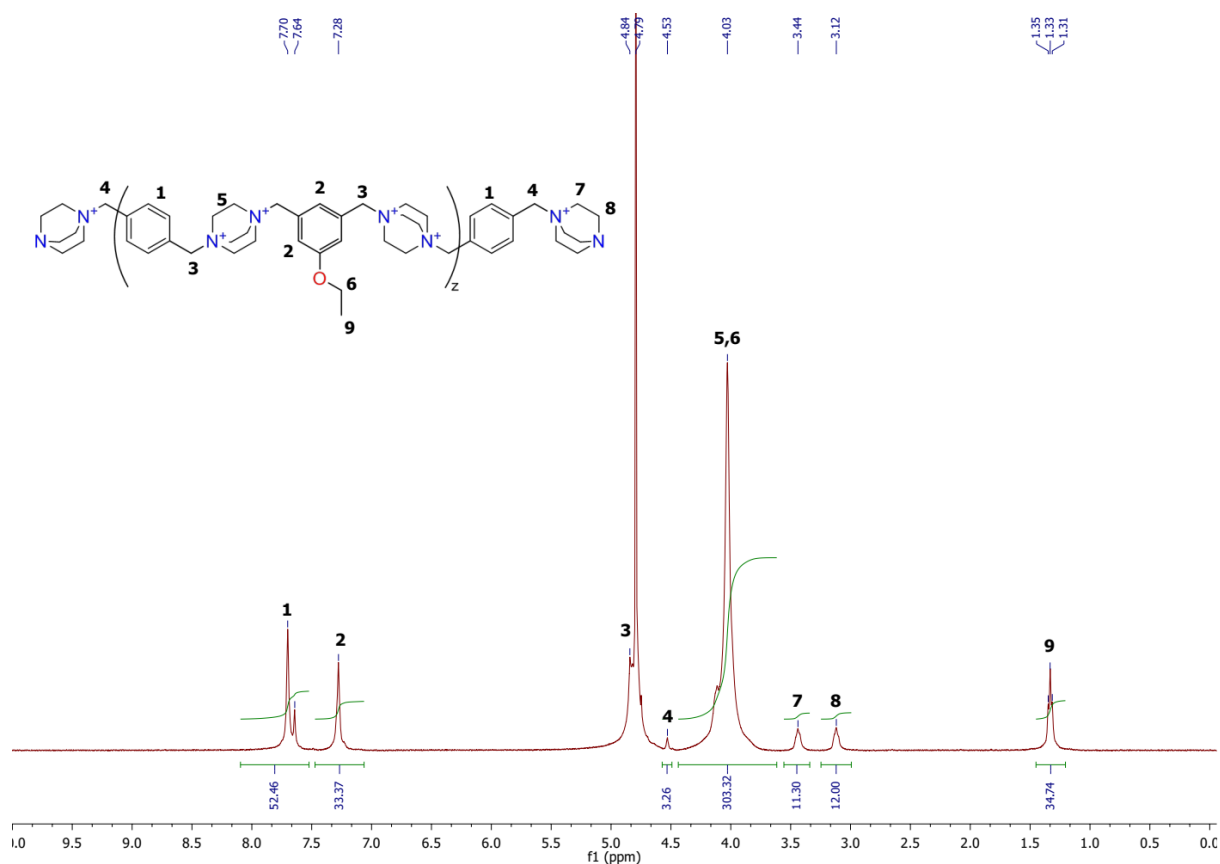
Załącznik 2. Reprezentatywne widma ^1H NMR otrzymanych jonenów.



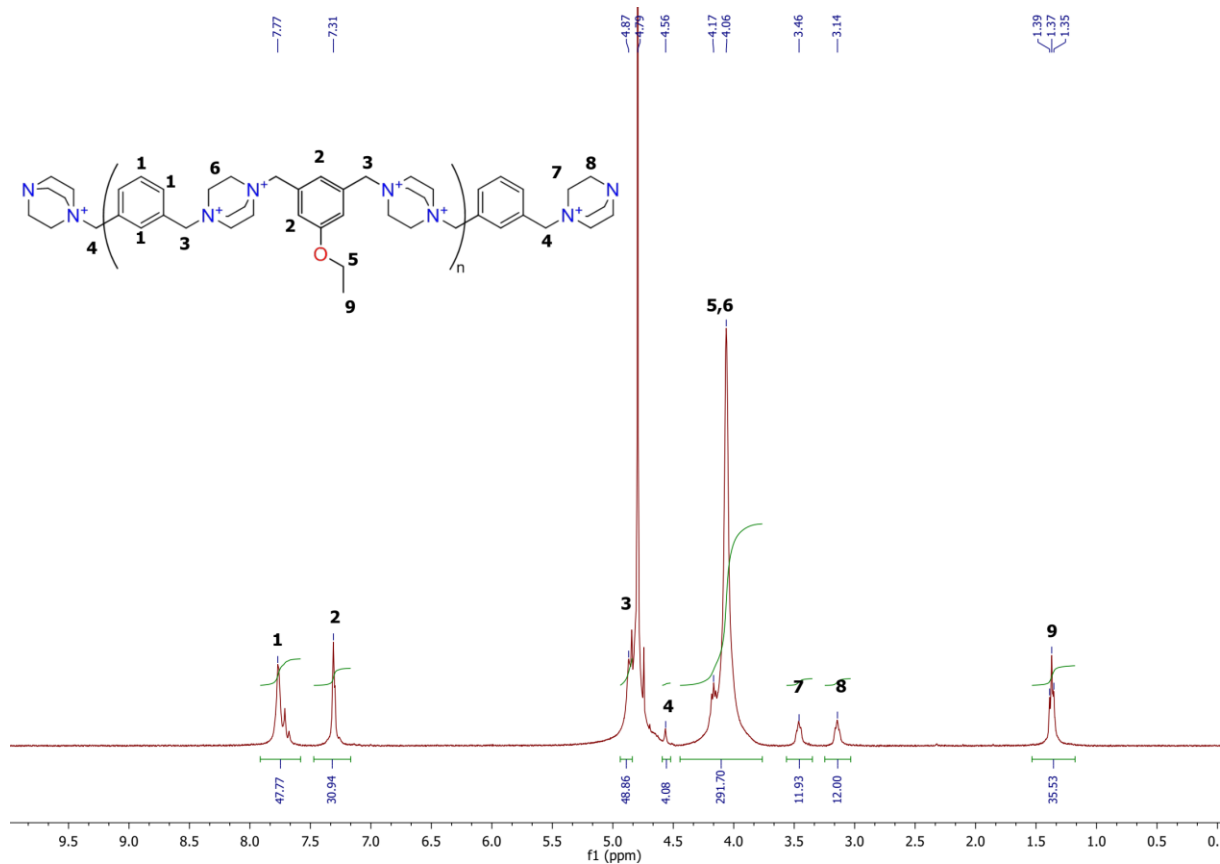
Rysunek Z2.1. Widmo ^1H NMR (400 MHz, D_2O) jonenu C2-T-p-T.



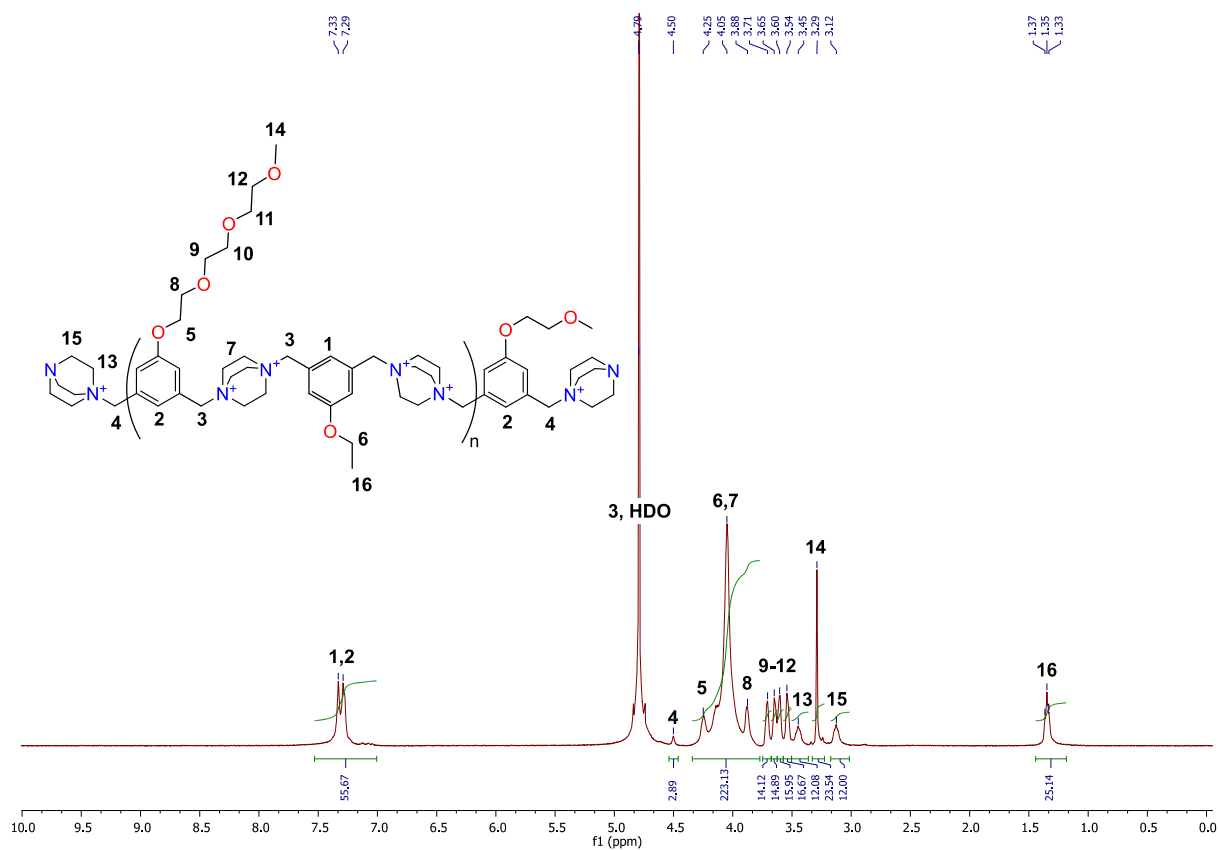
Rysunek Z2.2. Widmo ^1H NMR (400 MHz, D_2O) jonenu C2-T-m-T.



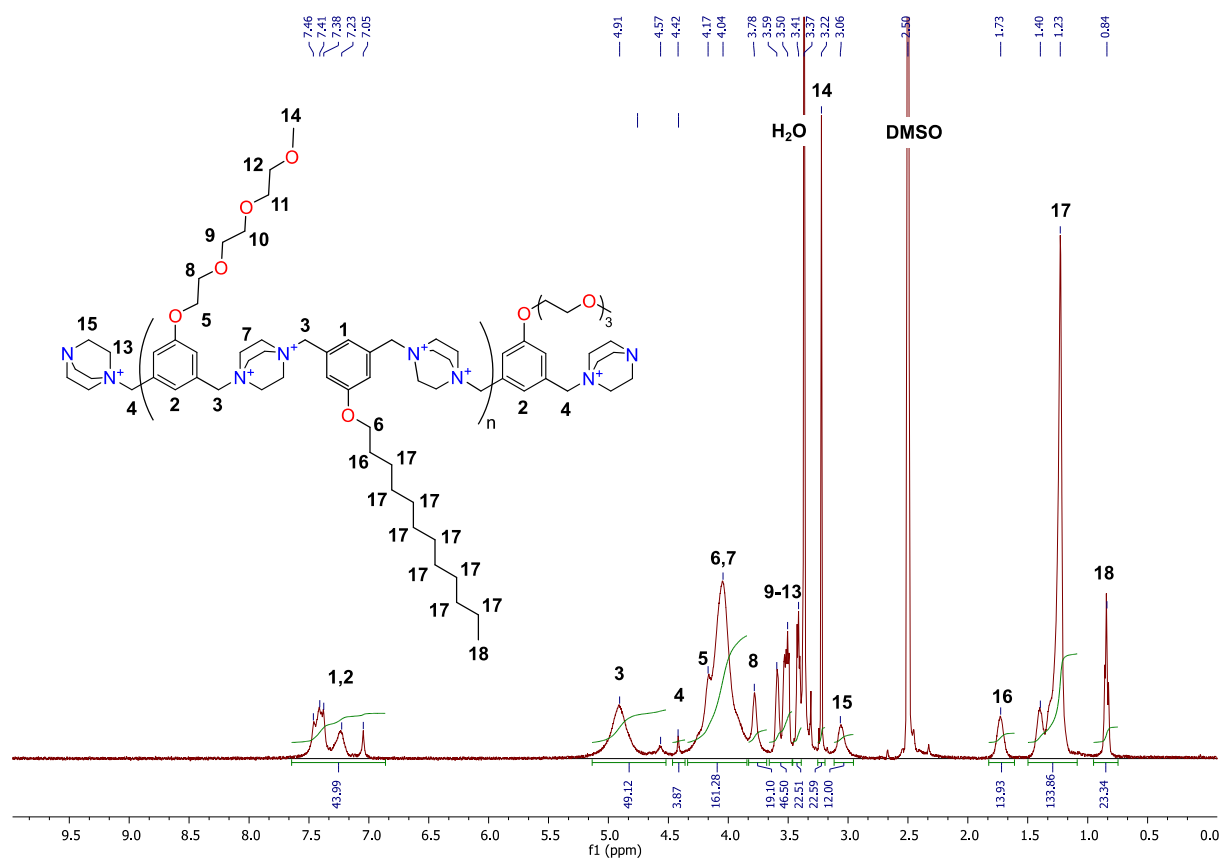
Rysunek Z2.3. Widmo ¹H NMR (400 MHz, D₂O) jonenu C2-D-p-D.



Rysunek Z2.4. Widmo ¹H NMR (400 MHz, D₂O) jonenu C2-D-m-D.



Rysunek Z2.5. Widmo ¹H NMR (400 MHz, D₂O) jonenu C2-D-PEG-D.

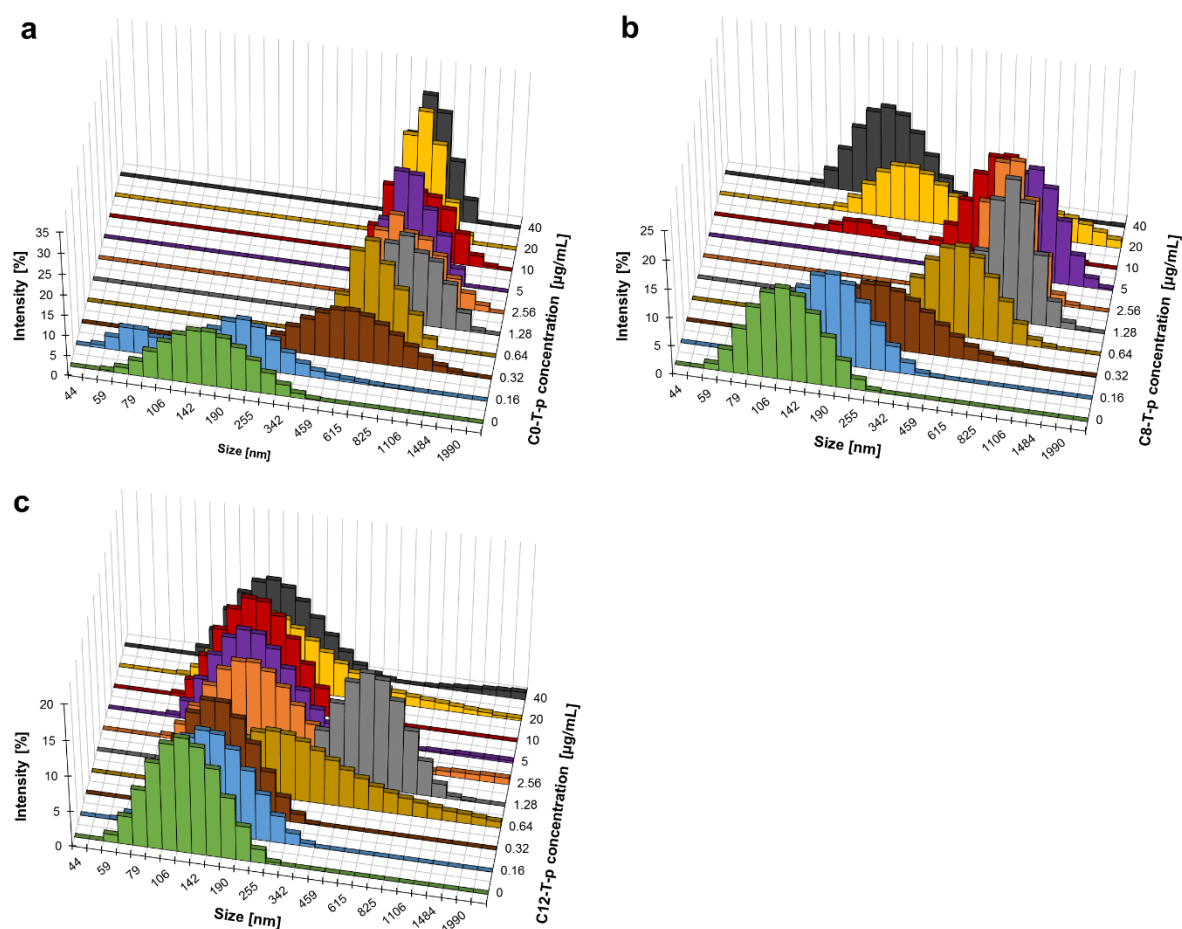


Rysunek Z2.6. Widmo ¹H NMR (400 MHz, DMSO) jonenu C12-D-PEG-D.

Załącznik 3. Przykład surowych danych DLS dotyczących oddziaływania jononów z LUVs

Wybrane elementy z informacji uzupełniającej (Supporting Information) do opublikowanego artykułu własnego:

Kopiasz, R. J., Rukasz, A., Chreptowicz, K., Podgórski, R., Kuźmińska, A., Mierzejewska, J., Tomaszewski, W., Ciach, T., Jańczewski, D, “Influence of lipid bilayer composition on the activity of antimicrobial quaternary ammonium ionenes, the interplay of intrinsic lipid curvature and polymer hydrophobicity, the role of cardiolipin”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 207, str. 112016



Rysunek Z3.1. Dystrybucja rozmiaru LUVs z EcLE po inkubacji z (a) C0-T-p-T, (b) C8-T-p-T lub (c) C12-T-p-T w różnym stężeniu polimerów. Pomiary przeprowadzone po 2 h inkubacji w 25 °C