

*mgr Wioletta Liwińska  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Warszawski  
Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod*

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**„SYSTEMY HYDROŻELOWE MODYFIKOWANE OLIGONUKLEOTYDAMI JAKO POTENCJALNE  
NOŚNIKI LEKÓW”**

Promotor prof. dr hab. Zbigniew Stojek

Jednym z głównych celów współczesnej medycyny jest poszukiwanie takich rozwiązań w terapii przeciwnowotworowej, które ograniczą toksyczność leków względem komórek zdrowych. Następuje także ukierunkowanie badań na bezpośrednie podawanie leków do komórek przeciwnowotworowych. Aby osiągnąć wymienione cele, stosując znane i przebadane już terapie nowotworowe, konieczne jest stosowanie nośników leków.

W grupie nośników leków, „inteligentne hydrożele”, ze względu na duże możliwości chłonięcia płynów a przez co podobną strukturę do tkanek ludzkich, ale przede wszystkim na ich wrażliwość środowiskową, są bardzo użytecznym materiałem do konstrukcji kontrolowanych systemów dostarczania leków. Modyfikacja hydrożeli materiałem biologicznym prowadzi do rozszerzenia ich właściwości i wpływa bezpośrednio na ich biokompatybilność. DNA jako uniwersalny materiał budulcowy, posiadający zdolność zaprogramowanego parowania zasad, jest szeroko stosowany przez naukowców pod kątem tworzenia naturalnych biomateriałów. Dlatego też połączenie hydrożeli i oligonukleotydów może być dobrym kierunkiem w projektowaniu nowoczesnych systemów uwalniania leków.

Kontrolowane wywoływanie zmian strukturalnych w cząsteczkach DNA przyłączonych do sieci hydrożelu daje możliwość uwalniania leku pod wpływem szeregu bodźców środowiskowych. Dodatkowo, możliwość akumulacji cząsteczek leków na drodze interkalacji w helisie DNA pozwala na zwiększenie ilości leku zawartego w nośniku. Zależna od sekwencji zasad dynamiczna struktura nici DNA prowadzi do ich samoorganizacji, hybrydyzacji oraz denaturacji, w zależności od środowiska, w jakim się znajdują.

Podstawowym celem mojej pracy doktorskiej była synteza i badanie właściwości wybranych nośników leków przeciwnowotworowych. Syntezowałam materiały hydrożelowe w skali makro i nano. Materiały żelowe modyfikowałam oligonukleotydami. Analizie poddane zostały takie parametry nośników jak wydajność akumulacji i uwalniania substancji leczniczej.

Matrycą w układzie hydrożelowym był poli(*N*-izopropylakryloamid) (PNIPA). Dodatkowym monomerem był kwas akrylowy (AAc). Dzięki tej modyfikacji żelu uzyskałam wyższe temperatury przejścia fazowego (VPT); które były zbliżone do temperatury fizjologicznej. Dodatek oligonukleotydów, jako silnie hydrofilowych składników, również przesunął temperaturę VPT w kierunku wyższych wartości.

Głównym skutkiem dokonanych modyfikacji żeli była zwiększona wydajność akumulacji leków-interkalatorów pomiędzy pary zasad dwuniciowej formy DNA. Istotne były również oddziaływania elektrostatyczne i powinowactwo leku do konkretnych par zasad. Użyte do syntezy matryc monomery dawały możliwość chłonięcia dużych ilości rozpuszczalnika, co było pożądanym efektem uwzględnionym w projektowaniu nośników leków. Proste, niezmodyfikowane formy hydrożeli syntezowanych w projekcie posiadały niski współczynnik akumulacji leków antracyklinowych.

Wprowadzenie molekuł DNA zapewniło utworzenie wielu miejsc wiązania się leku, m.in. za pomocą niekowalencyjnej interakcji takiej jak interkalacja. Wiązanie z DNA pozwoliło na zwiększenie ilości leku wewnątrz nośnika; spowodowało również wydłużenie procesu uwalniania substancji leczniczej.

Uwalnianie leku z nośnika było uruchamiane za pomocą bodźców zewnętrznych. Testowane były różne czynniki środowiskowe. Te czynniki to temperatura, pH i obecność reduktora (np. glutationu). Przebadano różne warianty modyfikacji nanożeli obejmujące modyfikacje typu chemicznego i fizycznego.

Przeprowadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej badania doprowadziły do otrzymania nowych nośników leków przeciwnowotworowych na bazie hydrożeli modyfikowanych oligonukleotydami w skali makro oraz nano. Opracowano skuteczne metody syntezy, oraz zbadano właściwości fizykochemiczne jak i również użyteczność biologiczną otrzymanych nanohydrożeli. Otrzymane wyniki pozwalają zaproponować nowe sposoby podawania leków w istniejących już terapiach przeciwnowotworowych.

Początkowo unieruchamiałam fizycznie natywny DNA w matrycy polimerowej bez konieczności tworzenia wiązań kowalencyjnych. Wyniki tych badań wykazały, że możliwa jest immobilizacja DNA w sieci polimerowej z 80% wydajnością w przypadku podwójnych nici DNA, a z 60% w przypadku pojedynczych nici. Wykazałam, że możliwe jest bezpośrednie monitorowanie zmian strukturalnych cząsteczek DNA obecnych w sieci hydrożelu za pomocą metod elektrochemicznych. Wykazałam też, że za pomocą metod elektrochemicznych możliwe jest bezpośrednie monitorowanie w DNA lokalnych zmian przeddenaturacyjnych związanych z rozplątywaniem nici i zmianą konformacji. Zmiany te nie są dobrze widoczne na krzywych spektroskopowych. Wykazałam, że hydrożele PAM/DNA umożliwiają zadowalającą akumulację doksorubicyny poprzez, m.in., interkalację leku do podwójnej helisy DNA. Uwolnienie leku z matrycy pod wpływem temperatury zachodziło na drodze denaturacji podwójnej nici DNA i miało również miejsce w temperaturach stosunkowo niższych od temperatury topnienia oligonukleotydów. Przydatny okazał się system oscylowania temperatury między 37 a 45 °C; w tych warunkach uzyskano podwyższoną wydajność uwalniania leku z matryc nanożelowych.

Ten pierwszy etap moich badań był dobrą podstawą do próby miniaturyzacji układów hydrożelowych. Udało się zsyntezować nanożele zmodyfikowane odpowiednio wyselekcjonowanymi odcinkami DNA. Była to typowa modyfikacja typu chemicznego. Proces włączenia oligonukleotydów do sieci polimerowej był skuteczny dzięki wcześniejszej modyfikacji nici DNA grupami akrylowymi.

Od strony funkcjonalnej, podwójne nici DNA były tworzone w różny sposób. Pierwszy skuteczny sposób to modyfikacja nanożeli trzysegmentową hybrydą DNA, gdzie dwie nici były bezpośrednio włączone do sieci nanożelu, natomiast trzecia nić była komplementarna w połowie do dwóch pierwszych. Mogła zostać dołączona już po syntezie nanożelu. Udowodniłam, że parametry fizykochemiczne uzyskanych nanosystemów, takie jak: rozmiar i potencjał zeta sprzyjały penetracji przez nanożele tkanek nowotworowych. Okazało się, że zsyntezowane nanożele PNIPA-AAc-oligo123 posiadały wyższą zdolność akumulacji leku przeciwnowotworowego - doksorubicyny w stosunku do nanożeli niezmodyfikowanych ze względu na możliwość wiązania leku w podwójnej helisie dsDNA. Fakt ten pozwolił na stworzenie nośnika leku o przedłużonym czasie uwalniania, co mogło skutkować lepszym efektem terapeutycznym. Stwierdziłam, że uwalnianie leku zachodziło dopiero w podwyższonej temperaturze, takiej, która stosowana jest rutynowo w terapii hipertermicznej, a mechanizm uwalniania był wynikiem dwóch odwracalnych procesów. Te procesy to zmiana konformacji dwuniciowej trzysegmentowej struktury DNA oraz kurczenie się sieci hydrożelu. Badania wykazały dobrą biokompatybilność matryc oraz wysoką cytotoksyczność Dox w nośnikach w stosunku do linii komórek nowotworowych *Hella* i *Insulinoma*.

Drugi etap badań zakładał syntezę degradowalnego nośnika poprzez użycie oligonukleotydów jako jedynej formy środka sieciującego nanożel. Udowodniono, że możliwa jest synteza nanożelu sieciowanego za pomocą trzysegmentowej hybrydy DNA bez użycia dodatkowych środków

sieciujących. Wykazano możliwość całkowitej, nieodwracalnej degradacji sieci nanożeluzel pod wpływem wysokiej temperatury (70 °C). Jednak okazało się, że w nieco niższej temperaturze (45 °C) degradacja nanożeluzel może mieć charakter odwracalny ze względu na proces renaturacji DNA. Takie właściwości mogą być przydatne przy uwalnianiu leków w zmiennych warunkach temperaturowych. Dzięki zastosowaniu wewnętrznego sieciowania nanożeluzel za pomocą DNA, uzyskałam znacznie wyższe wartości wydajności akumulacji leku. Z kolei wykazałam, że uwalnianie leku zachodziło według dwóch mechanizmów zależnych od temperatury: pierwszy związany był z lokalnymi zmianami konformacyjnymi i kurczeniem się sieci nanożeluzel, natomiast drugi z bezpośrednią degradacją sieci polimerowej wskutek denaturacji DNA. Otrzymane wyniki sugerują, że zsyntezowany nośnik chroni aktywną formę leku i pozwala na uwolnienie się jej dopiero pod wpływem specyficznych warunków środowiskowych. Spodziewam się również, że degradacja nośnika powinna ułatwić jego późniejszą eliminację z ustroju. Testy cytotoksyczności na liniach komórkowych *Insulinoma* dla nośników z zakumulowaną doksorubicyną wykazały wysoką proliferację komórek nowotworowych.

W ostatnim etapie moich badań do sieci nanożeluzel zostały wprowadzone oligonukleotydy zawierające grupy disiarczkowe -SS-. Wyniki wskazują, że uzyskane nanożeluzel reagowały na trzy rodzaje bodźców zewnętrznych: temperaturę, pH i obecność glutationu. Przeprowadzone badania DLS, spektroskopowe oraz elektrochemiczne potwierdziły dynamiczną reorganizację struktury DNA na powierzchni nanożeluzel. Okazało się, że podwójne nici DNA tworzą powłokę - otoczkę zewnętrzną nanożeluzel. Uwalnianie leku było następstwem dwóch procesów: a) zmian konformacyjnych DNA, czyli rozluźniania podwójnej struktury sieci DNA oraz struktury polimerowej nanożeluzel oraz b) redukcji grup disiarczkowych obecnych w oligonukleotydach. Współdziałanie tych efektów skutkowało zwiększoną wydajnością uwalniania podczas pulsacyjnej zmiany temperatury pomiędzy 37 a 45 °C. Przeprowadzone badania cytotoksyczności wykazały, że zsyntezowane nanożeluzel nie wykazują znacznej cytotoksyczności. Natomiast nanożeluzel z zakumulowanym lekiem wykazywały wysoką zdolność niszczenia komórek nowotworowych.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej oraz inne uzyskane podczas trwania studiów doktoranckich opublikowane zostały w ośmiu pracach naukowych w międzynarodowych czasopiśmie: dwie w *RSC Advances* oraz po jednej w *Journal of Material Chemistry B*, *Electrochemistry Communication*, *PLOS one*, *Bioelectrochemistry*, *Electrochimica Acta* i *Molecules*.