

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Żanety Polańskiej
pt: Układy samoorganizujące na bazie surfaktantów polimerycznych i formulacji lipidowych, charakterystyka oraz zastosowanie do tworzenia stabilnych kompleksów z kwasami nukleinowymi

Terapia genowa to szczególna gałąź współczesnej medycyny, pozwalająca na leczenie chorób na poziomie genów, a kluczem do jej skuteczności jest opracowanie wydajnych i bezpiecznych nośników (tzw. wektorów) materiału genetycznego. W ostatnim czasie dużym zainteresowaniem cieszą się niewirusowe wektory w szczególności otrzymywane na bazie kationowych surfaktantów, lipidów czy polimerów. Mają one istotną przewagę nad stosowanymi od lat wirusowymi wektorami (np. opartymi na retro- i adenowirusach), którym zarzuca się, że mogą wywoływać efekty uboczne w postaci np. cytotoksyczności, silnej odpowiedzi immunologicznej czy onkogenności. Niewirusowe wektory do transfekcji efektywnie wiążą się z materiałem genetycznym, mają niemal nieograniczoną pojemność, są łatwe i tanie w produkcji, a przy tym są bezpieczne dla organizmu (niska immunogenność). Niewirusowym nośnikiem, zarzuca się natomiast niską wydajność transfekcji, jednak problem ten można łatwo rozwiązać poprzez odpowiednią modyfikację nośnika.

Dobrym kandydatem na niewirusowy nośnik są kationowe surfaktanty trimeryczne, które ze względu na zwielokrotniony ładunek elektryczny i liczbę łańcuchów alkilowych, wykazują zdecydowanie lepsze właściwości od swoich monomerycznych odpowiedników np. kompleksują materiał genetyczny przy niższym stężeniu, tym samym można obniżyć potencjalne efekty cytotoksyczne.

Innym sposobem redukcji potencjalnych efektów cytotoksycznych nośników na bazie surfaktantów trimerycznych może być wprowadzenie do systemu lipidów, które naturalnie występują w błonach biologicznych. Oprócz obniżenia efektów cytotoksycznych i zwiększenia biokompatybilności nośnika, dodatek lipidów może również poprawić wydajność transfekcji do komórek żywych.

Głównym celem niniejszej pracy było otrzymanie i charakterystyka systemów na bazie kationowych surfaktantów trimerycznych i formulacji lipidowych pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako niewirusowych nośników do terapii genowej. W pracy badano układy na bazie surfaktantów trimerycznych (różniących się częścią polarną), formulacji lipidowych (DMPC – oznaczony jako L1, DMPC/DOPE – L2, DMPC/DPPC/DOPE – L3) i DNA o różnej długości.

Ze względu na innowacyjność badanych w pracy surfaktantów trimerycznych, w pierwszej kolejności zdecydowano się przeprowadzenie badań pod kątem ich zdolności do agregacji i micelizacji. W tym celu zastosowano metody pomiarowe: konduktometrię, spektroskopię UV-Vis, spektroskopię fluorescencji, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS). Badane surfaktanty trimeryczne różniły się budową części polarnej, w której skład wchodziła czwartorzędowa sól amoniowa, ugrupowanie imidazoliowe lub benzimidazoliowe. Wyniki pomiarów krytycznego stężenia agregacji *CAC* oraz krytycznego stężenia micelizacji *CMC*, wykazały, że uzyskane wartości są znacznie niższe niż dla monomerycznych analogów surfaktantów, a istotny wpływ na wartość *CMC* i *CAC* ma obecność struktur aromatycznych w budowie surfaktantu.

Na podstawie wyników badań przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) oraz różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), wyznaczono parametry termodynamiczne przemian fazowych badanych fosfolipidów, takie jak: temperatura przejścia fazowego, zakres przemiany fazowej, entalpia przemiany. Badania DSC oraz FTIR

wykazały, że w wieloskładnikowych układach lipidowych wzrasta płynność błony lipidowej, co może poprawiać właściwości fuzyjne nośnika z żywą komórką.

W układach typu lipid/surfaktant trudno wskazać jednoznaczną tendencję, jednak dla większości układów na termogramach DSC obserwowano separację fazową na regiony błony lipidowej ubogie i bogate w surfaktanty. Na podstawie wyników FTIR stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia surfaktantów w układzie wzrasta płynność błony lipidowej.

Krzywe SAXS dla badanych mieszanin lipidowych wskazują na obecność kanałów wodnych, które są szczególnie cenione w projektowaniu nośników leków. W układach typu lipid/surfaktant – surfaktant zaburza lamelarną strukturę DMPC, indukując powstawanie i/lub współistnienie struktur unilamelarnych np. biceli. Wbudowywanie się cząsteczek DNA zaburza dodatkowo strukturę fosfolipidów w układach trójskładnikowych. Dochodzi do zwiększenia grubości dwuwarstwy lipidowej i przejścia łańcuchów alkilowych w konformację *gauche*.

Na podstawie testów elektroforetycznych w żelu agarozowym oraz elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS), dla układów typu lipid/surfaktant/DNA określono warunki tworzenia stabilnych kompleksów z DNA o różnej długości. Dowiedziono, że wielkość części polarnej surfaktantu ma wpływ na zdolności do kompleksowania DNA. Co więcej dodatek fosfolipidów w układach znacząco obniża p/n wymagane do utworzenia kompleksu z DNA. Otrzymane wyniki wykazały, że sztywność cząsteczki DNA wpływa na proces kompleksowania – długie fragmenty kompleksują przy niższych wartościach stosunku p/n . Dowiedziono, że siła wiązania materiału genetycznego wzrasta wraz ze stężeniem surfaktantu w układzie, a dodatek lipidów w układzie dodatkowo go stabilizuje.

Konformację kwasu nukleinowego w utworzonych kompleksach zbadano przy użyciu spektroskopii dichroizmu kołowego (CD). W układach surfaktant/DNA, obserwowano kondensowanie się struktury DNA, ale pozostawała ona w formie B-DNA, a jedynie dla jednego układu obserwowano silną kondensację - fazę psi. Natomiast w układach lipid/surfaktant/DNA – DNA nie zmienia swojej formy, pozostaje prawoskrętną helisą.

Do badań cytotoksyczności proponowanych układów zastosowano testy cytotoksyczności MTT i analizy żywotności komórek przy użyciu błękitu trypanu. Surfaktanty trimeryczne wykazują wysoką cytotoksyczność, ale efekty te zostają silnie zredukowane po dodaniu fosfolipidów do układu. Największą redukcję cytotoksyczności obserwowano dla układów na bazie formułacji L2. Choć układy na bazie L3 nie wykazywały takiego spadku cytotoksyczności, to ze względu na zróżnicowanie długości łańcuchów alkilowych w tym układzie mogą uzyskać wysoką wydajność transfekcji.

Wykorzystano też mikroskopię sił atomowych (AFM) do oceny topografii kompleksów DNA, a uzyskane wyniki korespondowały z wynikami badań spektroskopowych.

Reasumując, otrzymane wyniki potwierdziły potencjał aplikacyjny proponowanych systemów na bazie surfaktantów trimerycznych i formułacji lipidowych jako niewirusowych nośników, także pozwoliły wytypować najbardziej obiecujące układy do dalszych badań pod kątem ich zastosowania.