

## Autoreferat

### Fotosieciowane materiały polimerowe do zastosowań biomedycznych

Anna Mikulska

(Wydział Chemii UJ, Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii, Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów)

Głównym celem rozprawy doktorskiej było otrzymanie, charakterystyka fizykochemiczna i badania właściwości biologicznych materiałów polimerowych, uzyskanych na drodze sieciowania fotochemicznego, posiadających potencjalne zastosowanie biomedyczne.

Pierwszym z omawianych materiałów są hybrydowe adsorbenty związków zawierających adeninę drukowane molekularnie metodą fotochemiczną, w szczególności adsorbenty nukleotydów oraz nukleozydów, będących biomarkerami nie tylko procesów metabolicznych i fizjologicznych zachodzących w organizmie człowieka, ale przede wszystkim biomarkerami różnego typu nowotworów złośliwych oraz innych groźnych chorób, takich jak astma i choroby układu krążenia.

Drugi z badanych materiałów to polimerowe podłoża do hodowli ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC, ang. *human mesenchymal stem cells*) stymulujące ich różnicowanie w kierunku osteoblastów. Podłoża te zostały otrzymane na bazie pektyny (PEC) i żywicy diazoniowej (DR) i funkcjonalizowane powierzchniowo insuliną immobilizowaną na drodze sieciowania fotochemicznego. Funkcjonalizacja insuliną miała na celu stymulowanie osteogennej odpowiedzi hMSC.

Trzeci z badanych układów to polimerowe podłoża do hodowli hMSC stymulujące ich proliferację. Materiały te otrzymane zostały na drodze sieciowania fotochemicznego DR i polisacharydów zawierających grupy siarczanowe lub karboksylowe tj. 1-karagenanu oraz polisacharydów z grupy glikozaminoglikanów (GAGs) - heparyny i siarczanu chondroityny

Wybór takich układów podyktowany był faktem, iż nowotwory złośliwe i schorzenia układu szkieletowego są obecnie poważnym problemem medycznym, społecznym a także ekonomicznym o zasięgu globalnym. Światowa Organizacja Zdrowia ogłosiła lata 2000-2010

„Dekadą kości i stawów” , a alarmujące statystyki, dotyczące raka, podają, iż co roku na świecie zapada na chorobę nowotworową ok. 11 mln osób, z czego 7 mln umiera.

Przyczyną takiego stanu rzeczy jest fakt, iż mimo, że dzisiejsza nauka zarówno w dziedzinie onkologii, jak i medycyny regeneracyjnej jest już o wiele doskonalsza i dysponuje wieloma narzędziami diagnostycznymi, nadal istnieje szereg ograniczeń w niesieniu pomocy ludziom chorym.

W przypadku chorób nowotworowych głównym ograniczeniem jest zbyt późna diagnostyka procesu kancerogenezy. Mimo znacznego postępu medycyny i technik diagnostycznych, nadal wiele przypadków nowotworów wykrywanych jest w zaawansowanym stadium rozwoju choroby – w stadium progresji, kiedy jest już za późno na podjęcie efektywnego leczenia w celu zatrzymania lub cofnięcia procesu nowotworzenia. Nie ustają zatem wysiłki mające na celu opracowanie skutecznych, tanich i powszechnie dostępnych testów, które umożliwiłyby wykrywanie raka w początkowych stadiach choroby, a więc na etapie inicjacji bądź promocji, kiedy nowotwór nie daje jeszcze żadnych objawów klinicznych, czy zmian na poziomie morfologicznym, a transformacja nowotworowa tkanki niesie ze sobą jedynie zmiany na poziomie molekularnym, objawiające się nieprawidłową produkcją zmodyfikowanych nukleozydów, które uznawane są za markery (wskaźniki) nowotworowe.

W przypadku natomiast chorób układu szkieletowego głównym wyzwaniem jest fakt, że najczęściej wykorzystywane w ortopedii metody terapii chorób kości, a więc przeszczepy autologiczne czy też implantacja tkanki allogennej posiadają liczne ograniczenia, w związku z czym poszukiwane są skuteczne i bezpieczne metody alternatywne, spośród których szczególnie obiecujące wydaje się być wykorzystanie metod inżynierii tkankowej i technik terapii komórkowej z użyciem mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC) wyizolowanych ze szpiku kostnego.

Obecnie hMSC wyizolowane ze szpiku kostnego są najlepiej poznanym i najszerzej wykorzystywanym klinicznie, źródłem komórek do terapii, mających na celu regenerację tkanki kostnej. Efektywne więc i szybkie namnożenie dużej liczby autologicznych komórek szpikowych w warunkach *in vitro* odgrywa bardzo ważną rolę w terapiach komórkowych. Pozwala bowiem zmniejszyć czas oczekiwania pacjentów na wspomagającą terapię i przyspieszyć czas ich rekonwalescencji. W związku z tym poszukiwanie nowych materiałów do prowadzenia hodowli komórkowych, alternatywnych w stosunku do obecnie stosowanych, które wykonane są głównie z odpowiednio przetworzonego polistyrenu, jest kolejnym wyzwaniem w terapii komórkowej.

Praca doktorska składa się z dwóch głównych części: teoretycznej, poświęconej przybliżeniu tematyki podjętej w ramach dysertacji i doświadczalnej, w której przedstawione zostały materiały oraz metody wykorzystywane w trakcie przeprowadzanych badań, zebrane zostały wyniki badań eksperymentalnych, obejmujących otrzymywanie, charakterystykę fizykochemiczną i badania właściwości biologicznych trzech materiałów polimerowych, uzyskanych na drodze sieciowania fotochemicznego, posiadających potencjalne zastosowanie biomedyczne. Część doświadczalna zawiera również wnioski z przeprowadzonych badań.

## • ADSORBENTY HYBRYDOWE

Zasada działania badanych adsorbentów opiera się na naśladowaniu występujących w naturze oddziaływań pomiędzy komplementarnymi zasadami purynowymi i pirymidynowymi w kwasach nukleinowych, opartych na wiązaniach wodorowych.

Adsorbenty otrzymano poprzez osadzanie na powierzchni mikrosfer żelu krzemionkowego polimerów techniką warstwa po warstwie (ang. *layer-by-layer*, LBL). Osadzonymi polimerami były: polikation - kopolimer N-(akryloiloksyetylo)tyminy (AOET) i chlorku metakryloilo aminopropylotrimetyloamoniowego (MAPTAC) – A25M oraz polianion - terpolimer 2-akryloamido-2-metylo-1-propanosulfonianu sodu (AMPS), N-dodecylometakrylamidu (DodMAm) i metakrylanu etylotymyłu (TEMA) – ADT10. Obydwa te polimery zawierały w swojej strukturze reszty tyminowe. Ponieważ mikrosfery żelu krzemionkowego są naładowane ujemnie, w celu osadzenia na nich polimeru ADT10, w pierwszej kolejności zaadsorbowano na ich powierzchni polikation poli(chlorowodorek alliloaminy) (PAH), który zmienił na dodatni potencjał zeta ziaren silikażelowych. Otrzymane materiały scharakteryzowano spektroskopowo, a następnie przeprowadzono adsorpcję adeniny i związków zawierających adeninę – ATP i adenozyne.

Stwierdzono, iż mikrosfery pokryte polimerami zawierającymi reszty tyminy silnie adsorbują związki adeniny, których nie adsorbują niepokryte mikrosfery. Ponadto wykazano, iż proces adsorpcji jest zjawiskiem silnie zależnym od pH.

ATP był silniej adsorbowany przez adsorbent PAH/ADT10 w środowisku kwaśnym, odwrotna sytuacja miała natomiast miejsce, gdy podłożem adsorpcyjnym był film A25M. W celu więc zminimalizowania wpływu oddziaływań elektrostatycznych na zjawisko adsorpcji eksperymenty prowadzono w  $\text{pH} = 3$ .

W przypadku adenozyiny proces adsorpcji przebiegał podobnie zarówno na adsorbencie PAH/ADT10, jak i A25M. W obu przypadkach zaobserwowano efektywniejszą adsorpcję w  $\text{pH} = 9$  niż w  $\text{pH} = 7$ .

W celu zwiększenia zdolności adsorpcyjnej i selektywności otrzymanych materiałów przeprowadzono drukowanie molekularne adeniny na ich powierzchni poprzez naświetlanie promieniowaniem UV o długości fali 300 nm (powodującym fotodimeryzację polimerowych grup tyminowych) przez 4 h w obecności adeniny.

W powstawaniu drukowanej matrycy główną rolę odgrywały reszty tyminy obecne w terpolimerze ADT10 i kopolimerze – A25M. Po pierwsze umożliwiały one początkową samoorganizację monomerów funkcyjnych wokół cząsteczki szablony na zasadzie oddziaływań identycznych z tymi, które występują w podwójnej helisie DNA, czyli na zasadzie tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami. Po drugie były odpowiedzialne za fotosieciowanie polimeru w filmie dzięki zachodzącej pod wpływem naświetlania reakcji fotodimeryzacji. Fotosieciowanie to spowodowało utwalenie wnęk, komplementarnych pod względem kształtu do cząsteczek szablony.

Wykazano, iż materiał drukowany molekularnie nie tylko znacznie poprawia efektywność adsorpcji, ale przede wszystkim selektywność względem nie zawierających adeniny nukleotydów oraz nukleozydów.

#### • PODŁOŻA POLIMEROWE STYMULUJĄCE RÓŻNICOWANIE hMSC

Badane materiały otrzymano techniką warstwa po warstwie poprzez naprzemienne zanurzanie płytek szklanych w roztworze DR i pektyny (PEC), a następnie funkcjonalizowano powierzchnię otrzymanego podłoża insuliną.

Wykonano pełną fizykochemiczną oraz wstępną biologiczną charakteryzację badanych podłoży DR/PEC. Wykazano, iż stosowane polimery są zdolne do tworzenia powtarzalnych dwuwarstw na ujemnie naładowanym podłożach – powierzchni kwarcowej, krzemowej i szklanej oraz powierzchni mikrośfer żel krzemionkowego. Naświetlanie promieniowaniem UV prowadziło do uzyskania trwałych, hydrofilowych (kąt zwilżania  $46^\circ$ ), stosunkowo gładkich (szorstkość 2,15 nm), o ujemnie naładowanej powierzchni (zeta potencjał -35 mV) filmów polimerowych. Wykazano, iż uzyskane podłoża polimerowe są biogodne oraz stymulują proliferację i różnicowanie ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC).

Przeprowadzono też funkcjonalizację powierzchni materiału kompozytowego insuliną. Proces ten polegał na fotosieciowaniu uzyskanych filmów DR/PEC zanurzonych w roztworze insuliny. Niewątpliwą zaletą stosowanej metody był brak konieczności modyfikowania cząsteczki insuliny, krótki czas trwania reakcji oraz fakt, iż immobilizacja insuliny na powierzchni podłoża umożliwia bardziej kontrolowane, lokalne dostarczanie odpowiednich substancji stymulujących wzrost i różnicowanie komórek w porównaniu z substancjami dostarczonymi z pożywką hodowlaną. Obecność insuliny na powierzchni badanego podłoża potwierdzono spektroskopowo oraz mikroskopowo.

Wykazano, iż podłoża na bazie żywicy diazoniowej i pektyny funkcjonalizowane insuliną stymulują komórki hMSC do różnicowania w kierunku osteoblastów, a proces ten zależny jest od stężenia białka immobilizowanego na powierzchni. W zakresie stężeń insuliny 12-36  $\mu\text{M}$  w jej roztworze użytym do immobilizacji, komórki hodowane na eksperymentalnym podłożu wykazują silną osteogenną odpowiedź w stosunku zarówno do podłoża referencyjnego, jak i układu typowo stosowanego w hodowlach komórkowych, w których insulinę podaje się wraz z pożywką hodowlaną. Dodatkowo wykazano współdziałanie (synergizm) insuliny i BMP- 2 w stymulowaniu proliferacji i różnicowania hMSC na podłożach immobilizowanych insuliną.

#### • PODŁOŻA POLIMEROWE STYMUJĄCE PROLIFERACJĘ hMSC

Podłoża otrzymano techniką warstwa po warstwie poprzez naprzemienne zanurzenie płytek szklanych w roztworach żywicy diazoniowej, a następnie badanych polisacharydów – karagenanu oraz wielocukrów z grupy glikozoaminoglikanów (GAG) – heparyny i siarczanu chondroityny, będących składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej.

W celu uzyskania stabilnych, odpornych na działanie rozpuszczalników podłoży, naświetlano je promieniowaniem UV. Fotosieciowanie skutkowało nie tylko zwiększeniem trwałości podłoży, ale i ich hydrofobowości, nieznaczną zmianą szorstkości, zmniejszeniem grubości dwuwarstwy, a także zmianą potencjału zeta powierzchni podłoży na bardziej ujemny.

Przeprowadzono hodowlę *in vitro* komórek hMSC na otrzymanych materiałach, które wykazały, iż podłoża te sprzyjają adhezji komórek, a dodatkowo silnie stymulują ich namnażanie.

W przypadku hMSC wysiewanych na podłoża w początkowej gęstości 10000 na  $\text{cm}^2$ , komórki osiągały bardzo szybko gęstość krytyczną, nawet już w 3 dniu hodowli.

Zmniejszenie gęstości początkowej wysiewanych komórek do 5000/cm<sup>2</sup>, opóźniło proces całkowitego pokrycia powierzchni wzrostowej – zwijanie się monowarstw komórek zaobserwowano w 7 dniu hodowli. Analiza liczby komórek w końcowym etapie eksperymentu pozwoliła stwierdzić, iż podłoża na bazie żywicy diazoniowej i polisacharydów zapewniają do 30% szybszy wzrost hMSC w porównaniu do standardowo używanych podłoży wykonanych z polistyrenu (ang. *tissue culture polystyrene*, TCP).

Uzyskane wyniki wydają się być bardzo obiecujące. Otrzymane podłoża pozwalają na efektywne i szybkie namnażanie dużej liczby autologicznych komórek szpikowych w warunkach *in vitro*, wymagają nieznacznej ich gęstości początkowej i pozwalają nie tylko skrócić czas oczekiwania pacjentów na wspomagającą terapię.

**Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej zostały opisane w następujących publikacjach:**

- Anna Plewa, Wiktor Niemiec, Joanna Filipowska, Radosław Lach, Anna Maria Osyczka, Krzysztof Szczubiałka, Maria Nowakowska, „*Photocrosslinkable diazoresin/pectin films – Synthesis and application as cell culture supports*”, European Polymer Journal.(IF=2,562) DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.06.002
- Anna Plewa, Shin-Ichi Yusa, Michał Szuwarzyński, Krzysztof Szczubiałka, Yotaro Morishima, Maria Nowakowska, “*Molecularly Imprinted Hybrid Adsorbents for Adenine and ATP*”, Journal of Medicinal Chemistry (IF =5.248). DOI: 10.1021/jm300934

**Wyniki uzyskane ramach w pracy doktorskiej zostały wykorzystane w następującym zgłoszeniu patentowym:**

Zgłoszenie Patentowe: Anna Mikulska, Krzysztof Szczubiałka, Maria Nowakowska, Anna Osyczka, “Sposób wytwarzania podłoża do szybkiego namnażania komórek i zastosowanie” numer: P.40352

**Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej zostały zaprezentowane na następujących konferencjach:**

1. K. Wybrańska, A. Plewa, J. Lewandowska, M. Kępczyński, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, *Molecular Imprinting via Photocrosslinking in Polymeric Films*, 10th Young Scientist's Conference on Chemistry, 27-29 marzec 2008, Rostock, Niemcy, poster
2. Plewa, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, *Photochemical Molecular Imprinting of Insulin*, 12th Young Scientist's Conference on Chemistry, 17-20 marzec 2010, Göttingen, Niemcy, poster
3. Plewa, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, *Molecular Imprinting of Insulin onto coated silica particles*, 4th Young European Scientists workshop, 5-10 wrzesień 2010 UJ Kraków, poster
4. Plewa, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, *Covalently Cross-Linked Multilayer Films Based on Diazo-resin and Pectin*, XXI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society, BES, 8 – 12 maja 2011, Kraków, poster
5. A. Plewa, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, *Photocrosslinkable Diazo-resin - Pectin Films Prepared using a Layer-by-Layer Technique*, Polymers on the Odra River, 6-7 lipiec 2011, Opole, poster
6. "The First International Conference On Microscopy Research In Nanomedicine" 29-30 wrzesień 2011, Zabrze, uczestnictwo
7. Plewa, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, *Photocrosslinkable diazo-resin/pectin films – Synthesis and application as cell culture supports*, Maria Curie Skłodowska Symposium on the Foundations of Physical Chemistry, 18-19 listopad, Warszawa, poster
8. Plewa, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, Shin-Ichi Yusa, *Selective Adsorbents for Adenine-Containing Nucleotides*, Precision Polymer Materials (P2M), 1<sup>st</sup> P2M Conference, Obernai, 11 – 14 Grudzień 2011, Francja, poster
9. Anna Mikulska, Krzysztof Szczubiałka, Maria Nowakowska, Shin – Ichi Yusa „Molecularly Imprintable Adsorbents of Adenosine-5'-triphosphate” MRS, Boston USA, 25-30 Listopad, 2012, poster
10. Anna Mikulska, Krzysztof Szczubiałka, Maria Nowakowska, Anna Maria Osyczka, Joanna Filipowska „HMSC culture supports prepared from photocrosslinkable diazo-resin/pectin LbL films” Materials Today in Nanotechnology, Wirtualna Konferencja, 11-13 Grudzień 2012, poster

11. Anna Mikulska, Krzysztof Szczubiałka, Maria Nowakowska, Shin – Ichi Yusa, „Selective Adsorbents of Adenosine-5'-triphosphate”, *Materials Today in Nanotechnology*, Wirtualna Konferencja, 11-13 Grudzień 2012, poster.

**Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej zostały wyróżnione nagrodą za poster na konferencji Precision Polymer Materials (P2M):**

Plewa, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, Shin-Ichi Yusa, *Selective Adsorbents for Adenine-Containing Nucleotides*, Precision Polymer Materials (P2M), 1<sup>st</sup> P2M Conference, Obernai, 11 – 14 Grudzień 2011, Francja, poster

**Badania przeprowadzono w ramach następujących projektów:**

- Stypendysta projektu TEAM realizowanego w ramach Działania 1.2 "Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki", Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. "Polymeric Functional Materials for biomedical Applications", TEAM/2008-2/6. Projekt realizowany w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów pod kierownictwem Pani Prof. dr hab. Marii Nowakowskiej.
- Kierownik projektu PRELUDIUM: „Podłoża polimerowe stymulujące różnicowanie ludzkich macierzystych komórek mezenchymalnych w kierunku osteoblastów”, numer umowy: UMO-2012/05/N/ST5/01495
- Wykonawca projektu „Hybrydowe adsorbenty i sensory biomarkerów zawierających adeninę” (UMO-2011/03/B/ST5/01559). Projekt realizowany w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów pod kierownictwem Pana dr hab. Krzysztofa Szczubiałki.