

## Streszczenie

Hodowle komórkowe są bardzo ważnym narzędziem pozwalającym na testowanie różnych substancji, materiałów lub leków, a także na poznawanie biologii komórki i mechanizmów komórkowych. Najbardziej popularnym modelem hodowli komórkowych są hodowle w monowarstwie, czyli hodowle dwuwymiarowe (2D), które jednak nie odzwierciedlają w sposób wystarczający fizjologicznych warunków funkcjonowania komórek. Komórki w hodowlach 2D są pozbawione interakcji komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa (ECM). O wiele lepszym modelem są hodowle trójwymiarowe (3D), dlatego też jednym z celów pracy było opracowanie metody hodowli 3D oraz metod badawczych do oceny wpływu materiałów na komórki hodowane w 3D. Ponadto, badano wpływ dwóch rodzajów dendrymerów karbokrzemowych (CBD-1 oraz CBD-2) oraz ich kompleksów z pro-apoptycznymi siRNA (Mcl-1 oraz Bcl-2) na komórki MCF-7 hodowane zarówno w 2D jak i w 3D.

Jako metodę pozyskiwania sferoidów wybrano hodowlę na hydrożelach. Pierwszy etap badań obejmował optymalizację procesu hodowli. Po wykonaniu szeregu badań wstępnych, ostatecznie wysiewano po 100 000 komórek/żel, a hodowlę, przed podaniem badanych związków, prowadzono przez 7 dni.

W celu sprawdzenia, czy tworzą się kompleksy pomiędzy badanymi dendrymerami i siRNA wykonano pomiary potencjału zeta, dichroizmu kołowego, fluorescencyjne z bromkiem etydyny oraz przeprowadzono elektroforezę kompleksów w żelu agarozowym (CBD-2/siRNA). Każdy z przeprowadzonych testów potwierdził tworzenie się kompleksów dendrymer/siRNA. Ponadto, badanie elektroforetyczne potwierdziły ochronny wpływ dendrymerów przed degradacją siRNA przez RNazę.

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu dendrymerów lub dendrypleksów na komórki MCF-7 hodowane w 2D. Przeprowadzono testy XTT oraz live-dead (analiza cytometryczna), które wykazały, że stosowane dendrymery wpływają na żywotność komórek, przy czym im wyższe stężenie dendrymeru tym niższa żywotność. Przyłączenie siRNA zwiększało efekt cytotoksyczny. Bardziej toksyczny okazał się dendrymer CBD-1.

Określono również transport dendrypleksów do komórek. Do tego celu wykorzystano mikroskop konfokalny (analiza jakościowa) oraz mikroskop automatyczny INCell Analyzer 2000 wraz z analizą HCA (analiza ilościowa). Analizy mikroskopowe wykazały, że zarówno CBD-1 jak i CBD-2 transportują siRNA do komórek.

Następnie wykonano analizy cytometryczne (test live-dead) określające wpływ dendrymerów i dendrypleksów na komórki hodowane w 3D. Pomiary wykonywano po 24 lub 48 godzinach inkubacji z wybranymi próbkami oraz po podaniu trzech dawek badanych związków. W przypadku hodowli 3D bardziej toksyczny okazał się dendrymer CBD-2. Najlepsze wyniki z punktu widzenia zastosowania dendrymerów jako nośników siRNA w terapii genowej otrzymano po podaniu trzech dawek CBD-1 w kompleksach z siRNA.

Analiza jakościowa za pomocą mikroskopu konfokalnego oraz ilościowa za pomocą cytometru przepływowego potwierdziły transport dendrypleksów do komórek hodowanych w 3D, ale był on mniej efektywny, niż w przypadku komórek hodowanych w monowarstwie.

Kamila  
Białkowska