

5. Streszczenie

W niniejszej pracy doktorskiej została opracowana metoda analityczna do identyfikacji produktów metabolizmu oligonukleotydów antysensownych po inkubacji *in vitro* z mikrosomami wyizolowanymi z wątroby ludzkiej. Etap ten został poprzedzony doбором parametrów metod opartych na chromatografii cieczowej w trybie par jonowych, oddziaływań hydrofilowych oraz chromatografii jonowymiennej. Podjęte w niniejszej rozprawie badania są ważne ze względu na dynamiczny rozwój terapii antysensownej i potrzebę opracowywania nowych metod analitycznych, które przyczyniłyby się do wyeliminowania problemów z czułością oznaczania oligonukleotydów oraz selektywnością rozdzielania ich mieszanin.

Zmiany dokonywane zarówno w składzie fazy ruchomej, jak i w rodzaju faz stacjonarnych miały na celu uzyskanie wyższej czułości oznaczania oligonukleotydów oraz zwiększenie selektywności rozdzielania tej grupy związków. Takie podejście umożliwiło uzyskanie separacji kilku mieszanin oligonukleotydów antysensownych różniących się długością sekwencji i typem modyfikacji. Zastosowanie centralnego planu kompozycyjnego, dobór parametrów źródła jonizacji w spektrometrze mas oraz zmiany dokonywane w obrębie fazy ruchomej, umożliwiły uzyskanie wysokiej czułości oznaczania oligonukleotydów. Opracowana metoda analityczna została zastosowana w systematycznych badaniach metabolizmu oligonukleotydów antysensownych trzech różnych generacji w układzie *in vitro*. Etap ten poprzedzono szeroko rozumianym doбором parametrów inkubacji enzymatycznej, poprzez zmiany dokonywane w obrębie stężenia poszczególnych składników buforu reakcyjnego. Takie podejście pozwoliło na określenie stabilności oligonukleotydów antysensownych na działanie enzymów. Zidentyfikowano metabolity będące produktami trawienia enzymatycznego, spowodowanego aktywnością zarówno 3' jak i 5' egzonukleaz. Efekt ten nie był zależny od rodzaju modyfikacji oligonukleotydów antysensownych. Niemniej jednak, wprowadzenie modyfikacji w ich strukturze wpływało na zwiększenie stabilności tych substancji, w związku z czym obserwowano mniejszą liczbę powstających metabolitów dla oligonukleotydów drugiej i trzeciej generacji. Największą liczbę metabolitów zidentyfikowano dla niezmodyfikowanego oligonukleotydu, natomiast najmniejszą dla modyfikacji 2'-O-metoksyetylowej w obrębie rybozy oligonukleotydu. Wyniki niniejszych badań wykazały, że mikrosomy wyizolowane z wątroby ludzkiej są użytecznym modelem *in vitro* w badaniach biotransformacji szerokiej grupy modyfikacji oligonukleotydów.

Anna Klonowska
10.01.2021r.