

UNIwersytet Jagielloński

Wydział Chemii



*Charakterystyka selektywnych sensorów do obrazowania
optycznego hipoksji w komórkach nowotworowych
oraz badanie jej wpływu na przeciwnowotworową
efektywność polipirydylowych kompleksów Ru(II)*

PRACA DOKTORSKA

Ewelina Janczy-Cempa

Promotor: dr hab. Małgorzata Brindell, prof. UJ

Promotor pomocniczy: dr Olga Mazuryk

KRAKÓW

2023

Badania zostały zrealizowane dzięki finansowemu wsparciu

Narodowego Centrum Nauki

DEC-2016/21/B/NZ7/01081

DEC-2019/33/B/NZ7/02980

Podziękowania

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania dla Promotor niniejszej pracy doktorskiej **dr hab. Małgorzacie Brindell prof. UJ** Za inspirację, wsparcie merytoryczne, ogromną życzliwość, motywację oraz zrozumienia, którego doświadczyłam z Pani strony oraz wspianą atmosferę współpracy przez minione lata.*

*Dziękuję Promotorowi pomocniczemu **dr Oldze Mazuryk** za ogrom przekazanej wiedzy, cenne wskazówki, wszechstronną pomoc oraz niezliczoną ilość poświęconego czasu.*

*Dziękuję kierownikowi Zespołu Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej Wydziału Chemii UJ Pani **Prof. dr hab. Grażynie Stochel** oraz wszystkim pracownikom, doktorantom i studentom za niesamowitą atmosferę pracy, życzliwość, wsparcie oraz udzieloną pomoc.*

*Serdeczne podziękowania dla **dr Ilony Gurgul** za wszelką pomoc, wsparcie w trudnych chwilach, nieustającą motywację oraz wspólnie spędzony czas.*

*Dziękuję **mgr Dominice Porębskiej, mgr Przemysławowi Gajdzie-Morszewskiemu, dr Annie Wądołek, mgr Konradowi Kiecy** oraz **mgr Ewelinie Bieszczad-Żak** za cudowną atmosferę, wsparcia, życzliwości oraz wspiane wspomnienia z lat doktoratu.*

*Pragnę również wyrazić wdzięczność moim najbliższym, szczególnie **Tacie**, za nieocenione wsparcie, wiarę we mnie w trudnych momentach, bezcenną pomoc i motywację*

*Dziękuję **Kubie**, za wyrozumiałość, cierpliwość, wiarę we mnie, motywację oraz wsparcie, które otrzymuję każdego dnia.*

*Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję moim Rodzicom, **Annie i Andrzejowi ...***

Wykaz skrótów

- ANOVA** – analiza wariancji (*analysis of variance*)
- apo-Tf** – apo-transferyna (*apo-transferrin*)
- AzoR** – azoreduktaza (*azoreductase*)
- bpy** – 2,2-bipirydyna (*2,2'-bipyridyl*)
- CA9** – anhydraza węglanowa 9 – (*carbonic anhydrase 9*)
- CAMs** – komórkowe cząsteczki adhezyjne (*cell adhesion molecules*)
- CYB5R** – reduktaza cytochromu b5 (*cytochrome b5 reductase*)
- DFO** – deferoksamina (*deferoxamine*)
- dip** – 4,7-difenylo-1,10-fenantrolina (*4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline*)
- DMEM** – (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)
- DMSO** – dimetylosulfotlenek (*dimethyl sulfoxide*)
- dpb** – 2,3-bis(2-pirydylo)benzo[g]chinoksalina
- dpq** – 2,3-bis(2-pirydylo)chinoksalina
- ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (*extracellular matrix*)
- EGF** – epidermalny czynnik wzrostu (*epidermal growth factor*)
- EMEM** – (*Eagle's minimal essential medium*)
- EPO** – erytropoetyna (*erythropoietin*)
- EPR** – efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (*enhanced permeability and retention effect*)
- EPRI** – obrazowanie metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (*electron paramagnetic resonance imaging*)
- ESIPT** – wewnątrzcząsteczkowy transfer protonu w stanie wzbudzonym (*excited state intramolecular proton transfer*)
- FBS** – płodowa surowica bydłęca (*fetal bovine serum*)
- FIH** – inhibitor czynnika indukowanego hipoksją 1 (*factor inhibiting hypoxia inducible factor 1*)
- FMN** – mononukleotyd flawinowy (*flavin mononucleotide*)
- FRET** – Försterowski rezonansowy transfer energii (Förster Resonance Energy Transfer)
- HAPs** – proleki aktywowane hipoksją (*hypoxia-activated prodrugs*)
- HE** – hydroetydyna (*hydroethidine*)
- HIF** – czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją (*hypoxia-inducible factor*)
- holo-Tf** – holo-transferyna (*holo-transferrin*)
- HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa (*high pressure liquid chromatography*)
- HRE** – element odpowiedzi na hipoksję (*hypoxia responsive element*)
- HSA** – albumina surowicy ludzkiej (*human serum albumin*)
- ICP-MS** – spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (*inductively coupled plasma mass spectrometry*)
-

ICT – wewnątrzcząsteczkowy transfer ładunku (*intramolecular charge transfer*)

LC-HRMS – chromatografia cieczowa sprzężona z wysoko rozdzielczą spektrometrią mas (*liquid chromatography – high resolution mass spectrometry*)

LOD – granicę wykrywalności (*limit of detection*)

Me₂dpq – 6,7-dimetylo-2,3- bis(2-pirydylo)chinoksalina

MMPs – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (*matrix metalloproteinases*)

MRI – obrazowanie rezonansem magnetycznym (*magnetic resonance imaging*)

NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (*nicotinamide adenine dinucleotide*)

NEAA – (*Non-Essential Amino Acids*)

NQO1 – dehydrogenaza NAD(P)H chinonowa 1 (*NAD(P)H quinone dehydrogenase 1*)

NTR – nitroreduktaza (*nitroreductase*)

ODD – domena degradacji zależna od stężenia tlenu (*oxygen-dependent degradation domain*)

PBS – roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami (*phosphate-buffered saline*)

PD-L1 – ligand receptora programowanej śmierci 1

PDT – terapia fotodynamiczna (*photodynamic therapy*)

PET – fotoindukowane przeniesienia elektronu (*photoinduced electron transfer*)

PET – pozytonowa tomografia emisyjna (*positron emission tomography*)

PHD – hydroksylaza prolinowa (*proline hydroxylase*)

POR – reduktaza NADPH cytochromu P450 (*cytochrome p450 reductase*)

RFT – reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species (ROS)*)

SEC – sączenie molekularne (*Size Exclusion Chromatography*)

Tf – transferyna (*transferrin*)

TfR – receptor transferyny (*transferrin receptor*)

TNF- α – czynnik martwicy nowotworów α (*tumor necrosis factor*)

T_{reg} – limfocyty T regulatorowe (*regulatory T cell*)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*vascular endothelial growth factor*)

XOR – oksydoreduktaza ksantynowa (*xanthine oxidoreductase*)

Spis treści

1	Wstęp teoretyczny	17
1.1	Hipoksja w tkankach nowotworowych	17
1.2	Odpowiedź adaptacyjna komórek na hipoksję	19
1.3	Wykorzystanie środowiska redukującego nowotworów w terapii celowanej	22
1.4	Obrazowanie hipoksji w tkankach nowotworowych	24
1.5	Strategie projektowania sond fluorescencyjnych do obrazowania hipoksji	26
1.6	Oksydoreduktazy odpowiedzialne za redukcję sond fluorescencyjnych.....	28
1.7	Rusztowanie triazapentalenowe - nowy typ fluoroforów	34
1.8	Selektywne dostarczanie sond do komórek nowotworowych	36
1.9	Wykorzystanie transferyny do selektywnego dostarczania związków	38
	do komórek nowotworowych	
1.10	Hipoksja w procesie metastazy	40
1.11	Problem skuteczności terapii tlenozależnych w tkance hipoksycznej	44
1.12	Polipirydylowe kompleksy Ru w terapiach przeciwnowotworowych	45
2	Cel pracy	47
3	Metody	49
3.1	Reagenty i syntezy	49
3.1.1	Koniugacja holo-transferyny z sondą 3-NO ₂ -NHS-ester	51
3.1.2	Synteza [RuCl ₂ (dip) ₂]	52
3.1.3	Synteza [Ru(dip) ₂ (dpb)]Cl ₂ , [Ru(dip) ₂ (dpq)]Cl ₂ oraz [Ru(dip) ₂ (Me ₂ dpq)]Cl ₂	52
3.2	Charakterystyka sond	54
3.2.1	Spektroskopia absorpcyjna	54
3.2.2	Spektroskopia fluorescencyjna	54
3.3	Ocena fotostabilności sond	55
3.4	Redukcja sond przez nitroreduktazę typu I	55
3.4.1	Pomiary spektrofotometryczne	56
3.4.2	Pomiary spektrofluorymetryczne	56
3.4.3	Pomiary chromatograficzne	56
3.4.4	Wyznaczanie limitu detekcji NTR	57
3.4.5	Inhibicja nitroreduktazy	58
3.4.6	Wpływ potencjalnych interferentów na redukcję sond	58
3.5	Redukcja sond przez nitroreduktazę typu II	58
3.6	Oznaczenie poziomu RFT w roztworze	59
3.7	Wpływ ludzkiej albuminy surowiczej na właściwości fluorescencyjne sond	60

3.8	Badania <i>in vitro</i>	61
3.8.1	Hodowle komórkowe.....	61
3.8.2	Ocena cytotoksyczności.....	63
3.8.3	Ocena fotocytotoksyczności.....	64
3.8.4	Ocena fotostabilności w komórkach.....	64
3.8.5	Ocena akumulacji.....	64
3.8.6	Ocena poziomu ekspresji nitroreduktazy.....	66
3.8.7	Detekcja nitroreduktazy w komórkach za pomocą sond.....	66
3.8.8	Oznaczanie poziomu ekspresji HIF-1 α oraz enzymów oksydoredukcyjnych metodą Western Blot.....	67
3.8.9	Ocena poziomu zahamowania wychwytu biokoniugatu przez receptor transferyny (TfR).....	70
3.8.10	Ocena poziomu zatrzymania biokoniugatu transferyny wewnątrz komórek.....	71
3.8.11	Test odporności na trypsynizację.....	71
3.8.12	Test zdolności do re-adhezji.....	72
3.8.13	Ocena migracji.....	72
3.8.14	Ocena inwazji.....	74
3.8.15	Ocena transmigracji.....	75
3.9	Analiza statystyczna.....	76
4	Wyniki i dyskusja.....	77
4.1	Zastosowanie sond fluorescencyjnych o rusztowaniu nitropirazynotriazapentalenowym do ilościowego oznaczania nitroreduktazy (NTR) oraz poziomu niedotlenienia w komórkach nowotworowych.....	77
4.1.1	Charakterystyka spektralna.....	79
4.1.2	Ocena stabilności oraz fotostabilności w warunkach fizjologicznych.....	81
4.1.3	Ocena zdolności redukcji sond przez nitroreduktazy.....	83
4.1.4	Powinowactwo wobec ludzkiej albuminy surowiczej (HSA).....	94
4.1.5	Cytotoksyczność i fotostabilność sond <i>in vitro</i>	99
4.1.6	Wykrywanie nitroreduktaz <i>in vitro</i>	101
4.1.7	Podsumowanie.....	107
4.2	Biokoniugacja sondy o rusztowaniu nitropirazynotriazapentalenowym z holo-transferyną w celu selektywnego obrazowania niedotlenionych komórek nowotworowych.....	109
4.2.1	Biokoniugacja holo-transferyny z sondą 3-NO ₂ -NHS-estrem i jego charakterystyka.....	111
4.2.2	Ocena zdolności redukcji biokoniugatu przez nitroreduktazę typu I oraz II.....	112
4.2.3	Cytotoksyczność oraz akumulacja biokoniugatu <i>in vitro</i>	117

4.2.4	Detekcja niedotlenionych komórek nowotworowych z wykorzystaniem biokoniugatu.....	119
4.2.5	Uwalnianie biokoniugatu transferyny z komórek	121
4.2.6	Dostarczanie biokoniugatu za pośrednictwem receptora transferyny	123
4.2.7	Podsumowanie.....	126
4.3	Wpływ hipoksji na poziom ekspresji oksydoreduktaz – weryfikacja potencjału aplikacyjnego sond fluorescencyjnych <i>in vitro</i>	129
4.3.1	Stabilizacja HIF-1 α przy zastosowaniu różnych modeli niedotlenienia.	130
4.3.2	Wpływ niedotlenienia na poziom ekspresji oksydoreduktaz jednoelektronowych	131
4.3.3	Wpływ niedotlenienia na poziom ekspresji oksydoreduktaz dwuelektronowych	134
4.3.4	Ekspresja oksydoreduktaz a redukcja sondy nitropirazynotriazapentalenowej	135
4.3.5	Podsumowanie.....	137
4.4	Wpływ niedotlenienia na aktywność cytostatyczną i antymetastatyczną polipirydylowych kompleksów Ru(II).....	139
4.4.1	Cytotoksyczność oraz akumulacja	141
4.4.2	Wpływ na właściwości adhezyjne i re-adhezyjne komórek	143
4.4.3	Wpływ na migrację, inwazję i transmigrację komórek nowotworowych	146
4.4.4	Podsumowanie.....	152
4.5	Wpływ niedotlenienia komórek nowotworowych na aktywność biologiczną polipirydylowych kompleksów Ru(II) w terapii fotodynamicznej.....	155
4.5.1	Generowanie anionorodnika ponadtlenkowego oraz rodnika hydroksylowego w roztworze.....	158
4.5.2	Cytotoksyczność oraz fotocytotoksyczność w warunkach hipoksji...	159
4.5.3	Wpływ kompleksów Ru(II) na cytotoksyczność cisplatyny	161
4.5.4	Zmiana właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych	163
4.5.5	Podsumowanie.....	165
5	Podsumowanie	167
6	Suplement.....	171
7	Bibliografia	172

Streszczenie

Jedną z głównych cech charakterystycznych mikrośrodowiska większości guzów litych jest obniżone stężenie tlenu w tkankach, zwane hipoksją. Z powodu wzmożonego metabolizmu, niekontrolowanej proliferacji oraz nieefektywnego tworzenia naczyń krwionośnych w tkance nowotworowej następuje zaburzenie równowagi między dostarczaniem tlenu a jego zapotrzebowaniem, co prowadzi do występowania tkanki hipoksycznej. Występowanie niedotlenienia w tkance nowotworowej klasyfikowane jest jako jeden z głównych wskaźników niekorzystnego rokowania dla pacjentów, gdyż aktywuje procesy przerzutowania oraz zwiększa oporność nowotworu na wiele rodzajów terapii. W związku z tym badania naukowców koncentrują się na opracowaniu sensorów, które wykrywają subtelne wahania stężenia tlenu, selektywnie gromadzą się jedynie w niedotlenionych tkankach nowotworowych oraz posiadają łatwy i tani system detekcji.

Niniejsza praca obejmuje poznanie różnych aspektów występowania hipoksji w komórkach nowotworowych. Skupiono się na jej oznaczaniu przy użyciu sensorów fluorescencyjnych, zbadaniu jej wpływu na właściwości cytotoksyczne oraz przeciwrzutowe kompleksów rutenu, oraz na jej efekcie na terapię fotodynamiczną, z wykorzystaniem kompleksów rutenu(II) jako fotosensybilizatorów.

Pierwsza część pracy dotyczyła charakterystyki nowej klasy sensorów fluorescencyjnych opartych na rusztowaniu pirazyńo-1,3a,6a-triazapentalenowym posiadających bioredukcyjne ugrupowanie nitroaromatyczne pod kątem ich wykorzystania do oceny stężenia tlenu w tkankach nowotworowych. Badania skupiły się głównie na ocenie właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych sond oraz poznaniu mechanizmów ich redukcji katalizowanej przez nitroreduktazy. Wykazano doskonałe właściwości fotochemiczne sond oraz ich selektywną redukcję jedynie przez nitroreduktazy, co umożliwiło jednoznaczne rozróżnienie komórek hipoksycznych od normoksycznych. Ukazano również korelację intensywności fluorescencji sond z poziomem ekspresji nitroreduktazy w komórkach w warunkach niedotlenienia. Bazując na uzyskanych wynikach, w drugiej części badań uwagę poświęcono poprawie selektywnego dostarczania znacznika jedynie do tkanki nowotworowej, którą osiągnięto dzięki sprzężeniu sondy z holo-transferyną oraz wykorzystaniu nadekspresji receptora transferyny w komórkach nowotworowych. Otrzymany biokoniugat holo-Tf z sondą fluorescencyjną będącą pochodną nitro-pirazyńotriazapentalenu wykazywał selektywną akumulację w komórkach nowotworowych charakteryzujących się zwiększoną ekspresją receptora transferyny oraz

dodatkowo zwiększoną fluorescencją w tkankach niedotlenionych. Wszystkie te cechy sprawiają, że jest on doskonałym kandydatem nie tylko do badań *in vitro*, ale również może mieć zastosowanie do śródoperacyjnego obrazowania fluorescencyjnego nowotworów. Zrozumienie mechanizmów działania sond czułych na niedotlenienie oraz skorelowanie ich aktywacji z ekspresją enzymów odpowiedzialnych za ich redukcję pozwoliłoby na oznaczenie poziomu niedotlenienia dla poszczególnych nowotworów u pacjentów, co jest niezbędne w wyborze najlepszej ścieżki leczenia oraz konieczne w przypadku rozwoju terapii w kierunku medycyny spersonalizowanej. W pracy poddano również ocenie wpływ hipoksji na poziom ekspresji oksydoreduktaz zaangażowanych w aktywację związków nitroaromatycznych dla różnych nowotworowych linii komórkowych oraz zbadano korelację ich ekspresji z aktywacją sond nitro-pirazynotriazapentalenowych. Otrzymane dane jeszcze bardziej podkreśliły ogromny wpływ poziomu ekspresji nitroreduktaz, szczególnie jednoelektronowych, na efektywność aktywacji badanych sond. Wykazano dużą różnorodność poziomu oksydoreduktaz w zależności od linii komórkowej i warunków hodowli, co pokazuje potrzebę weryfikacji ich poziomu dla poszczególnych typów nowotworu. Zaproponowane sensory mogą mieć zastosowanie do takich badań.

Zbadano również potencjał polipirydylowych kompleksów Ru(II) zawierających dwa ligandy 4,7-difenylo-1,10-fenantrolinowe (dip) w terapii przeciwprzerzutowej oraz terapii fotodynamicznej, ze szczególnym uwzględnieniem ich efektywności w warunkach niedotlenienia. W prezentowanej pracy wykazano istotny wpływ kompleksów typu $[Ru(dip)_2L]^{2+}$, gdzie ligand L to odpowiednio: bpy-SC (bipirydyna zmodyfikowana pochodną semikarbazonu), bpy-NitroIm (bipirydyna zmodyfikowana pochodną nitroimidazolu) oraz niezmodyfikowany ligand bpy, na wiele etapów kaskady przerzutowania. Kompleksy wykazały również efektywne działanie w warunkach niedotlenienia, co wskazuje na ich duży potencjał jako potencjalnych chemioterapeutyków w skutecznej terapii przeciwprzerzutowej. Kompleksy Ru(II), które jako ligand L zawierały pochodne 2,3-bis(2-pirydylo)chinoksaliny, badano pod kątem ich wykorzystania jako fotosensybilizatory w terapii PDT. Zbadano wpływ hipoksji na właściwości cytotoksyczne oraz fotocytotoksyczne badanych kompleksów oraz ich potencjalne synergistyczne działanie w połączeniu z cisplatyną. Wykazano, iż aktywność cytotoksyczna kompleksów Ru(II) zostaje zachowana w warunkach niedotlenienia, a ich dodatkowe właściwości antymetastatyczne oraz synergistyczne działanie w połączeniu z chemioterapią dają duże możliwości aplikacyjne w różnych typach terapii skojarzonej, nawet w przypadku występowania tkanki niedotlenionej.

Abstract

A reduced oxygen concentration, so called hypoxia, is a common feature of many solid tumors. Due to increased metabolism, uncontrolled proliferation, and ineffective formation of blood vessels in tumor tissue, there is an imbalance between oxygen supply and demand, leading to hypoxic tissue. The appearance of advanced hypoxia in tumor tissue is classified as one of the negative prognostic factors for patients, as it activates metastatic processes and increases tumor resistance to radiotherapy, photodynamic therapy, and some chemotherapeutic agents used in chemotherapy. Due to the multidirectional adverse effect of hypoxia on cancer treatment, it is urgently necessary to assess the hypoxia of cancer tissues and investigate the impact of hypoxia on the anticancer and antimetastatic therapies under development. Therefore, researchers focus on developing sensors that detect subtle fluctuations in oxygen concentration, selectively accumulate only in hypoxic tumor tissues, and have an easy and low-cost detection system.

The present work concentrates on the understanding various aspects of occurrence of hypoxia in cancer cells. The doctoral thesis focuses on the determination of the level of hypoxia in cancer cells using fluorescent sensors, investigation of hypoxia influence on the cytotoxic and antimetastatic properties of polypyridyl Ru(II) complexes, and its effect on photodynamic therapy when Ru(II) complexes are used as photosensitizers.

The first part of this work concerned the characterization of a new class of fluorescent sensors based on a pyrazine-1,3a,6a -triazapentalene scaffold that contains a bioreductive nitroaromatic group. The nitroaromatic group can be reduced by oxidoreductases that are often overexpressed under hypoxic conditions and, in this way, it can be related to the oxygen level in tumor tissues. The investigation was mainly focused on the evaluation of the physicochemical and biological properties of the probes and the understanding the mechanisms of their reduction catalyzed by nitroreductases. Excellent photochemical properties of the probes and selective reduction by nitroreductases were demonstrated. Furthermore, a clear distinction between cells cultured under hypoxia and cells cultured under normoxia was feasible, and the level of fluorescence intensity was positively correlated with the level of nitroreductase expression under hypoxic conditions. Based on the results obtained, the following study was focused on improving the selective delivery of the sensor only to tumor tissue, which was achieved by conjugating the probe with holo-transferrin and exploiting the overexpressed transferrin receptors in tumor cells. The obtained bioconjugate of holo-Tf with the fluorescent probe, which was a nitro-

pyrazinotriazapentalene moiety, showed selective accumulation in tumor cells characterized by increased expression of the transferrin receptor and additionally increased fluorescence intensity in hypoxic tissues. All these features make it an excellent candidate not only for *in vitro* studies but also potentially applicable for intraoperative fluorescence imaging of the tumor. Understanding the mechanisms of action of hypoxia sensitive probes and correlating probes' activation with the expression of the enzymes responsible for their reduction would allow to measure the level of hypoxia for individual tumors in patients, which is essential for choosing the best treatment schedule. Therefore, the effect of hypoxia on the level of expression of oxidoreductases involved in the activation of nitroaromatic compounds was assessed for various cancer cell lines. Additionally, their expression was correlated with the activation of nitro-pyrazinotriazapentalene probes. The obtained data highlighted the tremendous influence of the expression level of nitroreductases, especially one-electron nitroreductases, on the activation efficiency of the studied probes. There is a wide variation in the level of oxidoreductases depending on the cell line and culture conditions, demonstrating the need to verify their levels for individual types of cancer. The proposed sensors may be useful in such research.

The potential of Ru(II) polypyridyl complexes containing two 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline (dip) ligands in antimetastatic and photodynamic therapy was also investigated, with particular emphasis on their efficacy under hypoxic conditions. The presented study showed a significant effect of $[\text{Ru}(\text{dip})_2\text{L}]^{2+}$ complexes, where the ligand L is, respectively: bpy-SC (bipyridine modified with a semicarbazone derivative), bpy-NitroIm (bipyridine modified with a nitroimidazole derivative) and unmodified bpy ligand, on multiple steps of the metastasis cascade. The compounds conserved their efficiency also under hypoxic conditions, which indicates their great potential as chemotherapeutic candidates in effective antimetastatic therapy. Ru(II) complexes that contained 2,3-bis(2-pyridyl)quinoxaline derivatives as the L ligand were investigated for their use as photosensitizers in PDT therapy. The effect of hypoxia on the cytotoxic and photocytotoxic properties of the tested compounds and the synergistic effect in combination with cisplatin were investigated. It has been shown that the cytotoxic activity of Ru(II) complexes was preserved under hypoxic conditions. In addition, antimetastatic properties and synergistic effect with traditional chemotherapy create great opportunities for use in various types of combination therapy, even under hypoxic conditions.

1 Wstęp teoretyczny

1.1 Hipoksja w tkankach nowotworowych

Utrzymanie homeostazy tlenowej jest kluczowym aspektem dla wszystkich ssaków, a zaburzenie tej równowagi prowadzi do ograniczenia funkcji narządów, tkanek lub komórek. Gradienty tlenu odgrywają ważną i korzystną rolę w procesach fizjologicznych, są kluczowe między innymi dla prawidłowego rozwoju embrionalnego, różnicowania komórek i utrzymania komórek macierzystych [1–3]. Hipoksja, czyli niedotlenienie, definiowana jako ciśnienie tlenu poniżej zakresu fizjologicznego w tkankach (<5 – 10 mmHg) indukuje stany patofizjologiczne, takie jak niedokrwienie mózgu i serca czy zaburzenie gojenia się ran, ale również jest odpowiedzialna za oporność nowotworów na chemo- i radioterapię. Niedotlenienie jest jedną z cech charakterystycznych mikrośrodowiska guzów litych i hematologicznych [4,5]. Wszystkie guzy lite oprócz komórek prawidłowo utlenowanych posiadają regiony stale lub przejściowo narażone na niedotlenienie [6]. Stan niedotlenienia guza spowodowany jest brakiem równowagi między podażą tlenu do tkanki a szybkością jego zużycia i może być sklasyfikowany jako niedotlenienie ostre lub przewlekłe. Należy jednak zwrócić uwagę, że ta klasyfikacja opiera się na obserwacjach empirycznych i może być nadmiernym uproszczeniem rzeczywistego obrazu [7]. Przewlekła hipoksja, dotyczy trwałego ograniczenia dyfuzji tlenu, wynikającego z ograniczonego zaopatrzenia komórek w tlen, spowodowanego tworzeniem się nieprawidłowych naczyń krwionośnych w szybko rosnących tkankach nowotworowych. Przewlekłe zmiany niedotlenienia przyczyniają się do częstych pęknięć DNA i gromadzenia się błędów genetycznych prowadzących do mutagenyzy. Ostra hipoksja jest spowodowana głównie miejscowymi, przejściowymi zaburzeniami perfuzji krwi wywołanymi fizyczną niedrożnością (np. agregacją komórek), mechaniczną kompresją wywieraną przez szybko narastającą tkankę nowotworową na pobliskie naczynia krwionośne lub zapadaniem się naczyń na skutek wahań ciśnienia śródmiąższowego. Ostra hipoksja może prowadzić do wytwarzania wysokiego poziomu reaktywnych form tlenu, zmniejszonego metabolizmu tlenu i aktywacji autofagii [8,9]. Odpowiedź komórek na warunki niedotlenienia zależy zarówno od czasu trwania, jak i nasilenia ekspozycji na hipoksję [10]. Niedotlenienie prowadzi przede wszystkim do upośledzenia zdolności proliferacyjnych komórek i ostatecznie do ich śmierci [7]. Jednak część komórek nowotworowych może dostosować się do stresu wywołanego przez hipoksję i przetrwać, uruchamiając modyfikacje

proteomiczne i genetyczne, prowadzące do zatrzymania lub ograniczenia wzrostu poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego, różnicowanie, programowaną śmierć komórkową lub nekrozę. Jednym z kluczowych regulatorów odpowiedzi na niedotlenienie i adaptację do stresu wywołanego przez hipoksję jest nadekspresja czynnika transkrypcyjnego wrażliwego na stężenie tlenu w środowisku tj. czynnika indukowanego hipoksją, HIF (ang. *hypoxia-inducible factor*). Aktywuje on ponad 30 genów zaangażowanych w różne szlaki komórkowe, w tym te promujące angiogenezę, metabolizm beztlenowy i odporność na apoptozę. Ponadto, niedobór tlenu obniża adhezję komórek, powodując ich odłączanie od guza pierwotnego i indukcję spontanicznych przerzutów [11]. Niedotlenienie może prowadzić do rozwoju bardziej agresywnego fenotypu guza oraz może być przyczyną opóźnionych nawrotów, uśpionych mikroprzerzutów i opóźnionego wzrostu obserwowanego w dużych guzach [12]. Niektóre badania kliniczne wykazały, że hipoksja jest negatywnym wskaźnikiem prognostycznym wyników leczenia pacjentów [6,13]. Należy jednak zauważyć, że niedotlenienie nie jest cechą wyłącznie guzów makroskopowych. Badania pokazują, że mikroprzerzuty naczyniowe (<1 mm średnicy) również mogą być silnie niedotlenione [14].

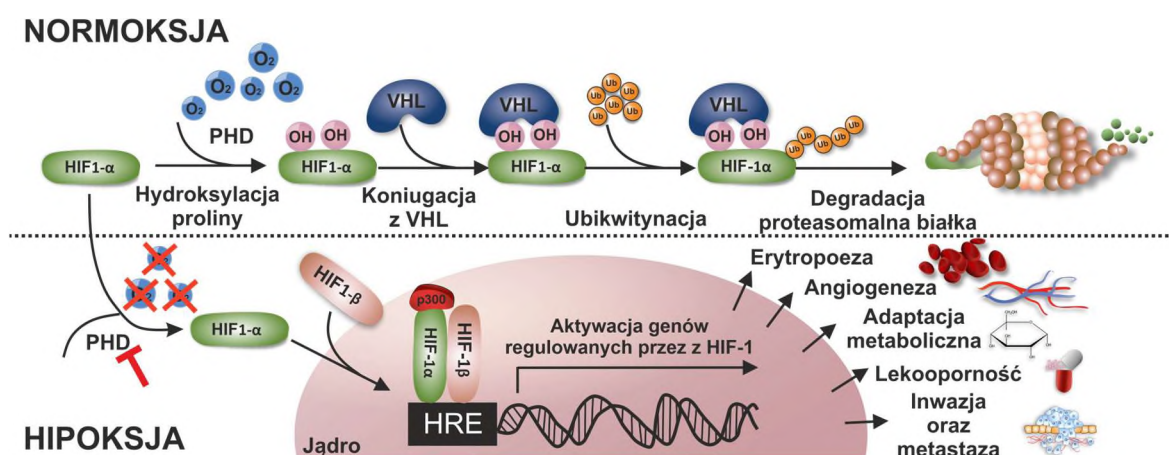
Oprócz złego rokowania nowotworów z obszarami niedotlenienia, hipoksja wiąże się również z opornością na różne niechirurgiczne terapie przeciwnowotworowe [7,15]. Niedotlenienie bezpośrednio zmniejsza skuteczność terapii tlenowych, takich jak standardowa radioterapia, chemioterapia zależna od tlenu (np. leki takie jak bleomycyna i doksorubicyna) oraz terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy* PDT). Stwierdzono, że aktywność szerokiej gamy leków cytotoksycznych (karboplatyny i cyklofosfamidu) jest zależna od tlenu, z powodu zwiększonej aktywności enzymów naprawczych DNA i zmniejszonej proliferacji komórkowej spowodowaną niedotlenieniem. Badania wykazały również zmniejszoną odpowiedź niedotlenionych guzów na chemo-, immuno- i hormonoterapię z powodu nieprawidłowego mikrokrażenia w guzie i indukowanych modyfikacjach potranskrypcyjnych. Chociaż opublikowano kilka badań klinicznych, które wykazały istotną, bezpośrednią korelację między niedotlenieniem guza a złymi wynikami klinicznymi po radioterapii [16–18], hipoteza, że niedotlenienie ogranicza wyleczalność nowotworów u ludzi tradycyjnymi metodami, opiera się w większości przypadków na różnych badaniach *in vitro* [11]. Pojawiają się jednak przesłanki, że markery niedotlenienia mogą być wykorzystywane do ustalania odpowiedniej terapii przeciwnowotworowej. Kilka niezależnych prób wykazało, że pacjenci z guzami niedotlenionymi odnieśli większe korzyści po zastosowaniu terapii modyfikującej

niedotlenienie, w tym radio- i chemioterapii, jak również terapii antyangiogennej [19]. Heterogeniczność niedotlenienia w guzach spowodowana fluktuacjami niedotlenienia w czasie (cykle niedotlenienia-normoksji) lub stromymi przestrzennymi gradientami tlenu (heterogeniczność 4D) wydaje się niezwykle istotna dla wyników klinicznych [7]. Ponadto istnienie makroskopowego regionalnego niedotlenienia charakteryzuje się obecnością dużej liczby pozornie funkcjonalnych naczyń, jednak poszczególne naczynia i ich rozgałęzienia pozostają niesparowane, co skutkuje wydłużonymi podłużnymi gradientami składników odżywczych, jak i również tlenu. Dodatkowo obraz heterogeniczności guzów jest dodatkowo komplikowany przez różne adaptacyjne i genetyczne konsekwencje niedotlenienia w zależności od różnych typów nowotworów, jak i w obrębie nawet jednego typu nowotworu, co stwarza ogromne wyzwanie w jego detekcji i zastosowania odpowiedniej metody leczenia [20].

1.2 Odpowiedź adaptacyjna komórek na hipoksję

Adaptacja komórek i tkanek do niskiego ciśnienia tlenu wymaga aktywacji szeregu genów modyfikujących między innymi angiogenezę, proliferację i metabolizm glukozy oraz żelaza. W komórkach eukariotycznych głównym regulatorem homeostazy tlenowej i mediatorem odpowiedzi na niedotlenienie jest czynnik transkrypcyjny HIF-1 [5,21,22]. Czynnik indukowany hipoksją został po raz pierwszy zbadany jako czynnik transkrypcyjny, który w odpowiedzi na niski poziom tlenu we krwi reguluje ekspresję erytropoetyny (EPO), niezbędnej do produkcji czerwonych krwinek [23,24]. HIF-1 jest heterodimerskim białkiem składającym się z indukowalnej podjednostki α (HIF-1 α) i konstytutywnie ekspresowanej podjednostki β (HIF-1 β). HIF-1 α jest podjednostką wrażliwą na tlen, a jej ekspresja jest precyzyjnie kontrolowana w komórkach poprzez modyfikacje potranslacyjne. W warunkach fizjologicznych, przy wystarczającym poziomie O_2 białko HIF-1 α ulega szybkiej degradacji, a jego okres półtrwania szacowany jest na około 5-10 minut [25]. Mechanizm regulujący poziom aktywnej formy podjednostki HIF-1 α opiera się na zależnej od tlenu hydroksylacji. Hydroksylacja HIF-1 α zachodzi z wykorzystaniem dwóch enzymów, hydroksylazy prolinowej (PHD) i inhibitora czynnika indukowanego hipoksją 1 (FIH), które w obecności tlenu oraz jonów żelaza i askorbinianu, jako kofaktorów, wprowadzają grupę hydroksylową do reszty proliny lub asparaginy, jednocześnie utleniając α -ketoglutaran do bursztynianu [26]. PHD hydrolizuje dwie reszty proliny w HIF-1 α , które znajdują się w domenie degradacji zależnej od tlenu ODD (ang. oxygen-dependent degradation domain), co prowadzi do wiązania domeny hydroksylowanej z białkami von Hippel-Lindau (VHL).

Wiązanie podjednostki HIF-1 α z białkiem VHL aktywuje ubikwitynację i w konsekwencji kieruje podjednostkę α do degradacji proteosomalnej [27]. W warunkach hipoksji hydroksylacja proliny nie może być aktywowana z powodu braku tlenu jako substratu, w związku z czym dochodzi do akumulacji HIF-1 α i w konsekwencji aktywacji HIF-1. Ponadto, istnieje drugi mechanizm negatywnej regulacji szlaku HIF-1 α w warunkach tlenowych. FIH w obecności tlenu hydrolizuje resztę asparaginową w C-TAD (ang. *C-terminal transcriptional activation domain*) podjednostki α , co prowadzi do blokowania interakcji z jednym z istotnych kofaktorów, p300/CBP, a tym samym hamowania transkrypcji genów indukowanych tlenem [28,29]. W warunkach niedotlenienia HIF-1 α jest chroniony przed degradacją, co umożliwia jego gromadzenie się w cytoplazmie, a następnie po przedostaniu się do jądra, dimeryzuje z konstytutywną podjednostką HIF-1 β . Heterodimer poprzez wiązanie z elementem odpowiedzi na hipoksję (HRE – ang. *hypoxia responsive element*), aktywuje transkrypcję genów reagujących na poziom tlenu [30,31]. Aktywację HIF-1 przedstawiono schematycznie na **Rysunku 1.2.1**.



Rysunek 1.2.1. Mechanizm regulacji HIF-1 w komórkach nowotworowych w warunkach normoksji i hipoksji.

Badania genetyczne wskazują, że setki genów są związane z sekwencją konsensusową HRE [32–34] i obejmują aktywację złożonych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych umożliwiających komórkową adaptację do stresu hipoksycznego. W celu przystosowania metabolizmu do niskiego stężenia tlenu HIF-1 indukuje ekspresję genów związanych z aktywacją metabolizmu glikolitycznego, co skutkuje przejściem z fosforylacji oksydacyjnej na glikolizę beztlenową i w konsekwencji stymuluje konwersję glukozy do glikogenu, zapewniając magazynowanie energii w celu przetrwania długotrwałego stresu. Ponieważ szlak glikolityczny jest mniej wydajny, komórki hipoksyjne mają tendencję

do zużywania większej ilości glukozy w celu zaspokojenia swoich potrzeb energetycznych. Ponadto HIF-1 bierze udział w aktywacji transkrypcyjnej czynników proangiogennych, jak również innych czynników wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) zaangażowanych w rozwój nowych naczyń krwionośnych. Pomimo iż powstające na skutek angiogenezy naczynia krwionośne są nieregularne, nieodróżniane i mniej wydajne w porównaniu z prawidłowym unaczynieniem, umożliwiają zaopatrywanie komórek w niezbędne składniki odżywcze oraz tlen zapewniając ciągły wzrost nowotworu i rozprzestrzenianie się przerzutów. Jednocześnie aktywacja HIF-1 ma szeroki wpływ na każdy etap kaskady przerzutów i sprzyja powstawaniu bardziej agresywnego fenotypu guza poprzez transkrypcyjną aktywację onkogennych czynników wzrostu [13,31,35]. Co więcej, wykazano znaczenie kliniczne szlaku aktywacji poprzez HIF takich procesów komórkowych jak stan zapalny, odpowiedź immunologiczna, sygnalizacja komórkowa i różnicowanie komórek macierzystych [36–38].

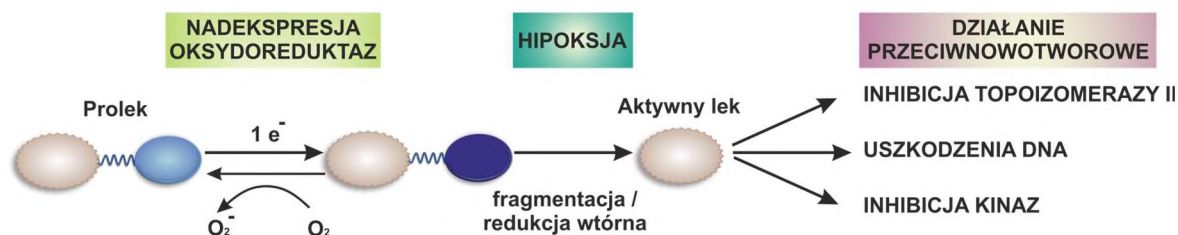
Oprócz kluczowej roli podjednostki HIF-1 α w regulacji odpowiedzi na hipoksję znane są jeszcze dwie inne izoformy HIF-2 α oraz HIF-3 α . HIF-2 α pełni równie ważną i bardzo specyficzną funkcję. Pomimo podobieństw regulacyjnych, strukturalnych i funkcjonalnych, te dwie jednostki mają znacząco różne, tkankowo specyficzne wzorce ekspresji, a ich wpływ na ekspresję niektórych genów jest odmienny [39]. HIF-1 α jest obecne we wszystkich tkankach organizmu, podczas gdy ekspresja HIF-2 α jest ograniczona do określonych tkanek, głównie śródbłonna, płuc i chrząstek stawowych. HIF-2 α sprzyja indukcji erytropoetyny (EPO) w warunkach hipoksji, a także aktywuje geny odpowiedzialne za przerzuty, zwłaszcza ekspresję metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) oraz czynników wzrostu. HIF-2 α jest stabilizowany i aktywowany przy wyższych stężeniach tlenu niż HIF-1 α , co sprawia, że HIF-1 α jest głównym motorem odpowiedzi na ostrą hipoksję, a HIF-2 α jest odpowiedzialny za mechanizmy adaptacyjne w przewlekłym niedotlenieniu [1]. HIF-3 α , zwany również inhibitorem PAS (IPAS), jest negatywnym regulatorem HIF-1, który dimeryzuje z podjednostką HIF-1 α , przez co hamuje wzrost ekspresji genów docelowych zależnych od HIF-1 [40].

1.3 Wykorzystanie środowiska redukującego nowotworów w terapii celowanej

Niedotlenienie stanowi wyjątkową cechę charakterystyczną dla większości typów nowotworów, co daje możliwość wykorzystania go do opracowania terapii selektywnych wobec guzów, u których występuje hipoksja [10,41]. W ostatnich latach podejmowane są zwiększone wysiłki w celu opracowania środków terapeutycznych, które selektywnie celują w niedotlenione komórki. Jednym z podejść terapeutycznych jest wykorzystanie zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej w komórkach niedotlenionych spowodowanego zmianą metabolizmu z fosforylacji oksydacyjnej na glikolizę [42]. Powstanie mikrośrodowiska bardziej redukującego, w porównaniu z prawidłowo utlenowanymi tkankami sprzyja nadekspresji wielu oksydoreduktaz, takich jak nitroreduktazy (NTR), azoreduktazy (AzoR), reduktazy cytochromu p450 (POR) i oksydoreduktazy ksantynowej (XOR) [43–45]. Wykorzystanie wzrostu aktywności tych enzymów w warunkach niedotlenienia jest jednym z podejść w projektowaniu proleków aktywowanych hipoksją (ang. *hypoxia-activated prodrugs* – HAPs). Co więcej, w ostatnich latach wykorzystuje się tę cechę metaboliczną komórek hipoksycznych do projektowania niskcząsteczkowych sond fluorescencyjnych w celu specyficznego obrazowania niedotlenienia komórek nowotworowych.

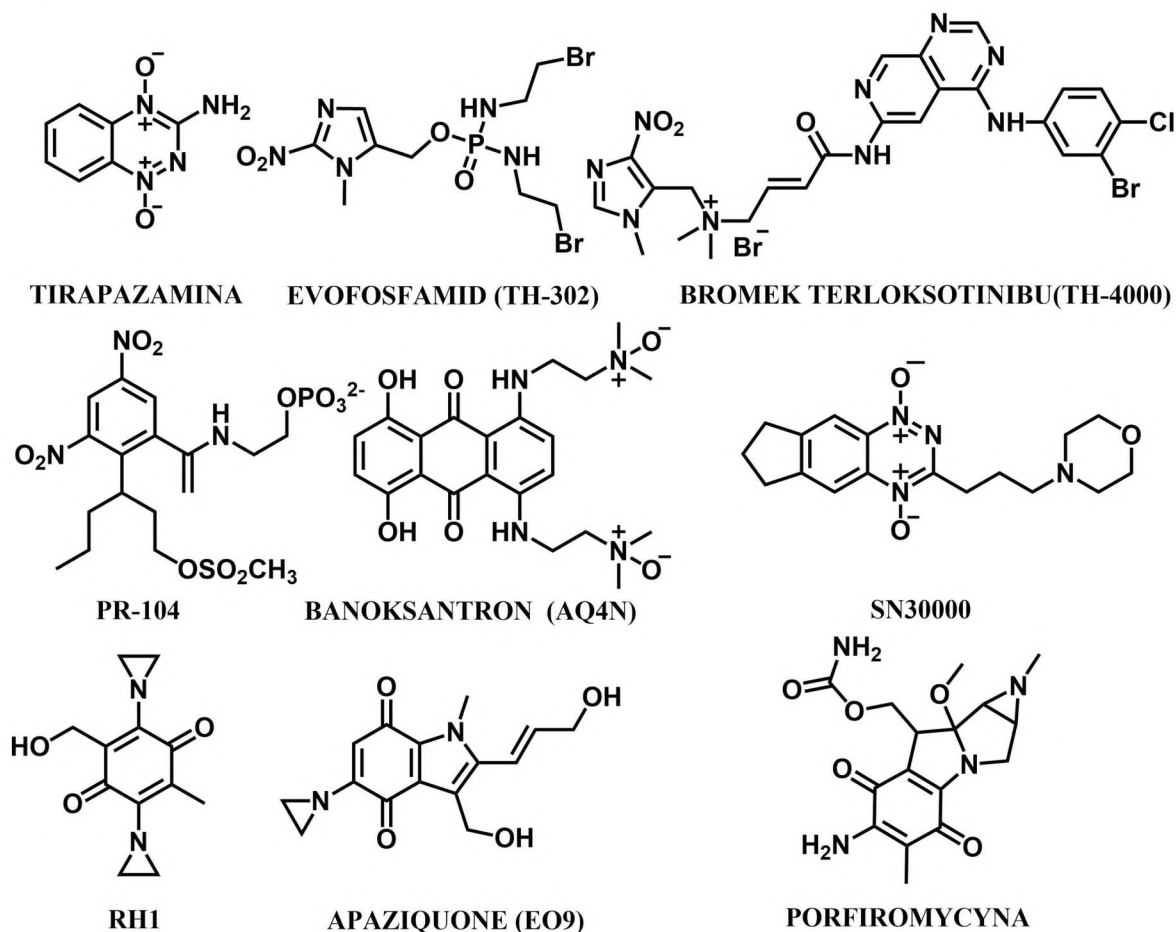
Proleki aktywowane hipoksją są związkami, które w warunkach hipoksji ulegają selektywnej redukcji z udziałem specyficznych oksydoreduktaz, tworząc związki cytotoksyczne. W ten sposób leki bio redukcyjne selektywnie celują w niedotlenione komórki nowotworowe, wykazując jednocześnie niewielką toksyczność wobec tkanek prawidłowych [46]. Dodatkowo HAPs będąc aktywnymi wobec hipoksyjnych mikroprzerzutów, mają potencjał, aby zapobiegać ich rozwojowi w guzy makroskopowe, zmniejszając tym samym szybkość przerzutów nowotworów [4]. Wśród przedstawicieli tych proleków znajdują się związki chinonowe, nitroaromatyczne, N-tlenki alifatyczne oraz N-tlenki heteroaromatyczne [4]. W przypadku większości HAPs proces ich aktywacji w nowotworach inicjowany jest nieodwracalną, enzymatyczną redukcją jednoelektronową przez oksydoreduktazy flawinowe, co prowadzi do wytworzenia anionorodnika proleku. W tkankach dobrze nasyconych tlenem jest on szybko zmiatany przez tlen molekularny, jednak w warunkach hipoksji anionorodnik ulega fragmentacji lub dalszej redukcji, tworząc cytotoksyczne formy efektorowe, które oddziałują z celem farmakologicznym. W efekcie dochodzi do alkilacji i uszkodzenia DNA, zahamowania kinaz lub inaktywacji topoizomerazy II, co prowadzi do śmierci komórek hipoksycznych (**Rysunek 1.3.1**).

Istnieje również grupa proleków (np. niektóre związki chinonowe i nitroaromatyczne oraz N-tlenki alifatyczne, np. banoksantron), które są aktywowane na drodze redukcji dwuelektronowej [46].



Rysunek 1.3.1 Ogólny mechanizm aktywacji proleków aktywowanych hipoksją.

W ciągu ostatnich dziesięcioleci kilkanaście związków zostało poddanych szerokim badaniom przedklinicznym i klinicznym między innymi tirapazamina, apaziquone/EO9, banoksantron, porfiromycyna, PR-104, RH1, evofosfamid/TH-302, SN30000 i bromek terloksofotinu/TH-4000 (**Rysunek 1.3.2**). Natomiast jedynie cztery z nich (TH-302, porfiromycyna, EO9, tirapazamina) osiągnęło III fazę badań, jednak żaden z tych związków jeszcze nie uzyskał akceptacji regulacyjnej [46–48]. Pomimo potwierdzonej przedklinicznej atrakcyjności i działania przeciwnowotworowego badanych proleków niestety badania kliniczne III fazy wykazują niską skuteczność oraz ograniczenia wszystkich związków [4,38,46]. Niepowodzenia kliniczne można tłumaczyć brakiem oceny poziomu tkanki niedotlenionej nowotworu u poszczególnych pacjentów, natomiast jest to czynnik krytyczny, od którego zależy skuteczność terapii. Niestety, ze względu na dużą niejednorodność guzów poziom niedotlenienia może znacznie różnić się u pacjentów, nawet z tym samym rodzajem guza [49,50]. Co więcej, wymóg enzymatycznej redukcji proleków w celu aktywacji ich efektu terapeutycznego powoduje, iż ekspresja aktywujących je reduktaz jest kluczowym aspektem zmienności pomiędzy poszczególnymi nowotworami pod względem wrażliwości na HAPs. Zbieżność tych dwóch czynników, a mianowicie niedotlenienia guza i ekspresji oksydoreduktaz, wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla dalszego rozwoju i zrozumienia obecnych niepowodzeń terapii HAPs. Dlatego istnieje silna, potrzeba właściwej stratyfikacji pacjentów w zależności od poziomu hipoksji guza na etapie badań klinicznych między innymi z wykorzystaniem kombinacji diagnostyki obrazowej do identyfikacji pacjentów z guzami hipoksycznymi z biomarkerami dla specyficznych oksydoreduktaz aktywujących proleki.



Rysunek 1.3.2 Struktury wybranych proleków aktywowanych hipoksją (HAPs).

1.4 Obrazowanie hipoksji w tkankach nowotworowych

Kwantyfikacja niedotlenienia umożliwia ocenę zaawansowania choroby, wyboru odpowiedniej terapii i ocenę rokowania pacjenta. Do tej pory oprócz bezpośredniego, ale inwazyjnego pomiaru tlenu za pomocą elektrody tlenowej opracowano wiele metod do selektywnego wykrywania niedotlenienia w warunkach klinicznych, między innymi wykorzystujących pozytonową tomografię emisyjną (PET), obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI) i obrazowanie metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPRI) [51,52].

Obecnie najbardziej powszechną, nieinwazyjną metodą ilościowego określania niedotlenienia guza jest PET, wykorzystująca krótkotrwałe radionuklidy emitujące pozytony, które selektywnie akumulują się w obszarach tkanki niedotlenionej [53]. Zwykle sondami są pochodne 2-nitroimidazolu zawierające ^{18}F (np. FMISO, FAZA lub EF5), które ulegają nieodwracalnej redukcji w tkance niedotlenionej. Produkty redukcji mają tendencję do silnego oddziaływania z makrocząsteczkami wewnątrzkomórkowymi, trwale pozostając uwięzionymi w żywych niedotlenionych komórkach, a tym samym umożliwiając

radioizotopowe obrazowanie niedotlenienia [53]. Jednym z najbardziej obiecujących markerów hipoksji jest EF5, który może być wykorzystywany do oceny hipoksji zarówno za pomocą immunohistochemii i cytometrii przepływowej, jak i do obrazowania PET po przyłączeniu odpowiedniego radionuklidu. Co ważne, aktywacja EF5 jest silnie skorelowana ze stężeniem tlenu w tkankach i poziomem oksydoreduktazy, co czyni ten związek podwójnym biomarkerem hipoksji i oksydoreduktaz [20,54,55]. W kilku badaniach potwierdzono, że efektywność aktywacji EF5 w warunkach hipoksji dobrze koreluje z aktywacją HAPs (SN30000 lub Tirapazaminy), co umożliwia wykorzystanie tej sondy do przewidywania skuteczności terapii HAPs [56–58].

W ostatnich latach również szeroko badane są pochodne tiosemikarbazonu $^{60/64}\text{Cu}$ ($^{60/64}\text{Cu}$ ATSM) oraz fluorodeoksyglukozy ^{18}F (^{18}F -FDG) jako radiofarmaceutyki PET [59]. Sondy PET oparte na tiosemikarbazonie wykorzystują nieodwracalną redukcję Cu^{2+} do Cu^{+} w warunkach niskiego stężenia tlenu, co powoduje ich akumulację w tkance hipoksycznej [60]. Natomiast fluorodeoksyglukoza ^{18}F -FDG odzwierciedla poziom metabolizmu glukozy w komórkach. Komórki niedotlenione zaspokajają swoje potrzeby energetyczne poprzez glikolizę beztlenową, co skutkuje zwiększonym zapotrzebowaniem na glukozę i nadekspresją transportera glukozy, i w konsekwencji prowadzi do dużo wyższej akumulacji ^{18}F -FDG w porównaniu do tkanki dobrze utlenionej [61].

Inną, wiodącą metodą wizualizacji niedotlenienia tkanek nowotworowych jest obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego zależnego od tlenu we krwi (BOLD MRI), które wykorzystuje paramagnetyczne właściwości deoksyhemoglobiny, umożliwiając tym samym ocenę natlenienia krwi. Głównym ograniczeniem tej metody jest obrazowanie zmian utleniania krwi, które niekoniecznie odzwierciedla poziom tlenu w tkankach. Zastosowanie środków kontrastowych znakowanych ^{19}F lub ^{31}P umożliwia ilościowe mapowanie niedotlenionej tkanki i stanowi obiecującą alternatywę dla ^1H MRI [52].

Bardzo czułą i bezpośrednią metodą ilościowego określania natlenienia tkanek jest spektroskopia EPR. Pomiar stężenia tlenu metodą oksymetrii EPR polega na wykorzystaniu zewnętrznej sondy paramagnetycznej, która oddziałuje z niesparowanym elektronem tlenu, powodując zmianę prędkości relaksacji spinowo-spinowej. Technika EPR czyni obecnie znaczne postępy, lecz nadal istnieje duża potrzeba zaprojektowania odpowiednich sond i sprzętu do prowadzenia badań klinicznych [62].

W ciągu ostatnich dziesięcioleci obrazowanie optyczne stało się jedną z intensywnie rozwijających się metod ilościowego określania niedotlenienia. Metody optyczne, w szczególności sondy fluorescencyjne przyciągają uwagę naukowców, ponieważ

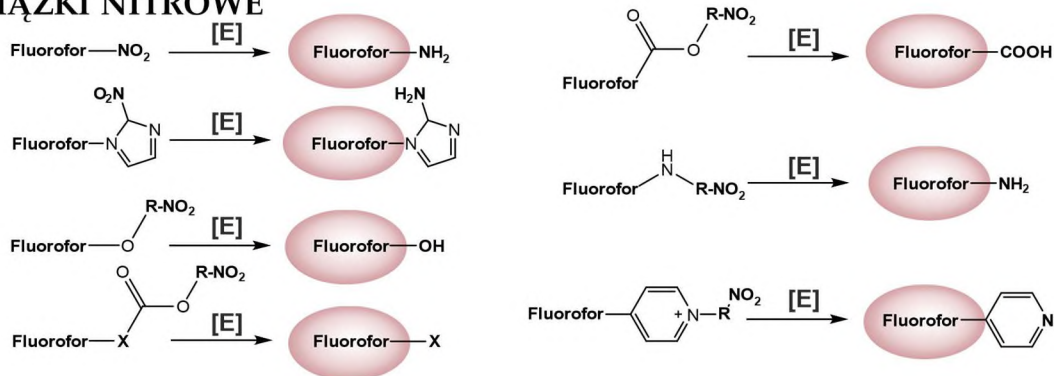
zapewniają monitorowanie tkanki w czasie rzeczywistym, bez uszkodzenia analitu. Sondy fluorescencyjne są stosunkowo tanie, a jednocześnie oferują wysoką czułość i rozdzielczość przestrzenno-czasową oraz nie narażają pacjenta na promieniowanie jonizujące [63]. W związku z tym są one doskonałym narzędziem do precyzyjnego lokalizowania nowotworu podczas obrazowania śródoperacyjnego. Fizyczne usunięcie nowotworu drogą chirurgiczną jest jedną z najskuteczniejszych metod leczenia, jednak decydujące znaczenie ma całkowita resekcja złośliwej tkanki z odpowiednimi marginesami wolnymi od guza [64]. Aby pomóc w rozpoznaniu zakresu marginesu nowotworu, a następnie wycięciu odpowiedniej tkanki wokół guza pierwotnego stosuje się między innymi chirurgię sterowaną fluorescencją, która w czasie rzeczywistym umożliwia precyzyjne określenie rozmieszczenia guza [65,66]. Zastosowanie obrazowania optycznego ogranicza głębokość penetracji, dlatego preferowane są fluorofory emitujące w bliskiej podczerwieni (NIR), które umożliwiają głębszą penetrację światła w głąb tkanki, minimalizują fotouszkodzenie materiału biologicznego i jednocześnie nie są zakłócanie przez autofluorescencję endogennych barwników tkankowych [67]. W celu uzyskania selektywnego obrazowania niedotlenienia tkanki nowotworowej w ostatnich latach opracowano grupy sond fluorescencyjnych czułych na stany redoksove komórek, poziom tlenu cząsteczkowego lub reagujące zarówno na tlen, jak i pH środowiska [68].

1.5 Strategie projektowania sond fluorescencyjnych do obrazowania hipoksji

Jednym z podejść w projektowaniu sensorów hipoksji jest wykorzystanie redukującego mikrośrodowiska guza do nieodwracalnej redukcji katalizowanej przez oksydoreduktazy ulegające nadekspresji w takich warunkach. Takie niskocząsteczkowe sondy do obrazowania poziomu niedotlenienia, składają się z chromoforu, łącznika i ugrupowania wrażliwego na hipoksję, którym mogą być pochodne nitroaromatyczne, chinonowe, azobenzenowe lub azydkowe (**Rysunek 1.5.1**) [68]. Ugrupowania te powodują wygaszenie fluorescencji fluoroforu, natomiast po dotarciu do miejsca docelowego zawierającego określone oksydoreduktazy, następuje redukcja odpowiedniej grupy, co w konsekwencji powoduje odblokowanie zdolności emisyjnych związków. Główne mechanizmy wyłączania i włączania fluorescencji obejmują fotoindukowane przeniesienie elektronów (PET), wewnątrzcząsteczkowy transfer ładunku (ICT), wewnątrzcząsteczkowy transfer protonów w stanie wzbudzonym (ESIPT) i Försterowski rezonansowy transfer energii (FRET) [67,69]. Najszerszej rozwiniętą grupą sond małowcząsteczkowych są związki z grupą nitroaromatyczną, które można podzielić na dwie grupy.

Pierwsza z nich składa się z sond opartych na bezpośrednim połączeniu grupy reakcyjnej z fluoroforami, które są redukowane przez NTR do odpowiedniej aryloaminy. Z kolei druga grupa związków wrażliwych na NTR posiada wiązanie ulegające zerwaniu. W obecności enzymu następuje reakcja kaskadowa, prowadząca do nieodwracalnego zerwania wiązania skutkującego uwolnieniem wolnych fluoroforów. Do tego typu połączeń zaliczają się głównie wiązania eterowe, benzyloaminowe, estrowe, węglanowe lub pirydynowe.

ZWIĄZKI NITROWE



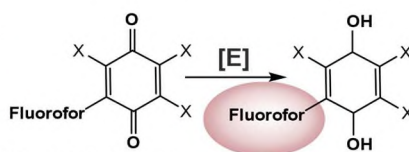
[E] : NTR (mainly), POR, NQO, XO, AzoR

ZWIĄZKI AZOWE



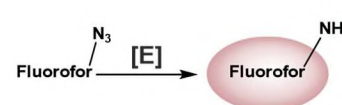
[E] : AzoR, NQO

ZWIĄZKI CHINONOWE



[E] : NQO, CYB5R

ZWIĄZKI AZYDKOWE



[E] : NTR

Rysunek 1.5.1 Zestawienie strategii projektowania sond fluorescencyjnych do obrazowania hipoksji. [E]-oksydooreduktaza, NTR - nitroreduktaza, POR - reduktaza cytochromu P450, NQO - oksydoreduktaza chinonowa, XOR - oksydoreduktaza ksantynowa, AzoR, -Azoreduktaza, CYB5R - reduktaza cytochromu b5, R-reszta benzyłowa, imidazolowa, tiofenowa lub pirolowa.

Oprócz grup nitroaromatycznych, pochodne azowe również mogą stanowić inny typ cząsteczek wykrywających niedotlenienie. W zależności od poziomu niedotlenienia grupa azowa może ulec redukcji do pochodnych aniliny. Inną grupą sond fluorescencyjnych są związki z ugrupowaniem chinonowym, które w mikrośrodkowisku hipoksji może być przekształcone w hydrochinon, co jest katalizowane przez oksydoreduktazy. Chinony są akceptorami elektronów, które skutecznie tłumią emisję fluoroforów [63]. Po redukcji powstałe hydrochinony efektywnie dostarczają elektrony do układu, co przywraca fluorescencję.

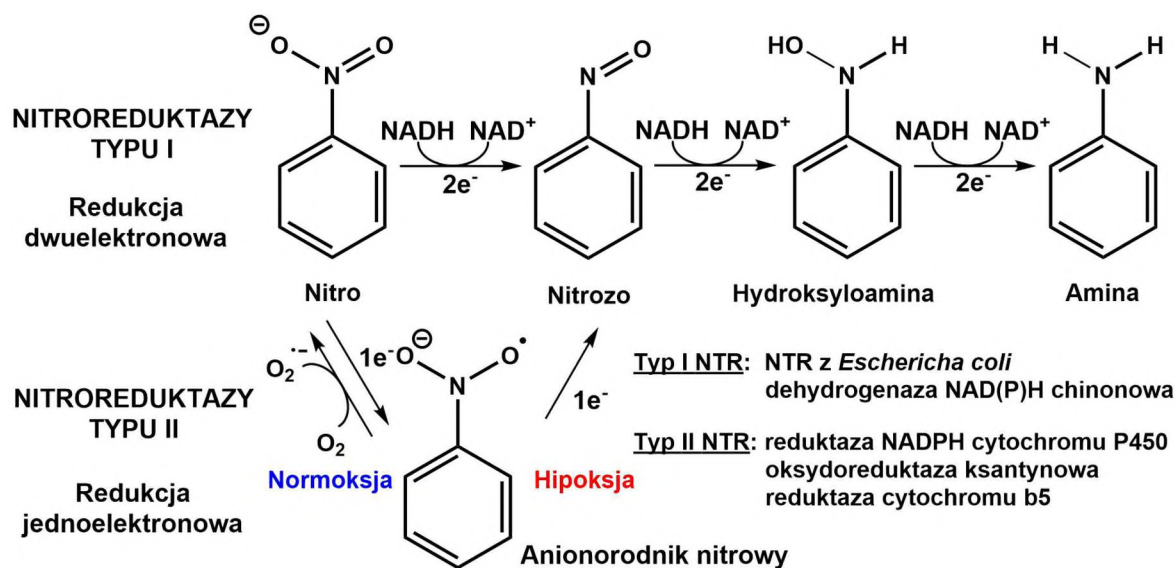
Należy nadmienić, że aby możliwe było wykorzystanie wyżej opisanej strategii do projektowania sond fluorescencyjnych, konieczna jest wiedza na temat aktywności oksydoreduktaz w tkankach nowotworowych w zależności od zawartości w nich tlenu.

1.6 Oksydoreduktazy odpowiedzialne za redukcję sond fluorescencyjnych

Identyfikacja oksydoreduktaz zaangażowanych w redukcję HAPs oraz sond fluorescencyjnych oznaczających niedotlenienie jest wciąż tematem niewystarczająco poznanym. Niestety pomimo zaawansowanych badań nad lekami aktywowanymi niedotlenieniem i obrazowaniem optycznym hipoksji większość prac nie poświęca wystarczająco dużo uwagi na temat oznaczania ilościowego tych enzymów w komórkach lub tkankach w zależności od poziomu natlenienia.

Głównymi enzymami zaangażowanymi w procesy aktywacji leków i sond do oznaczania hipoksji są nitroreduktazy (NTR). Jest to grupa enzymów katalizujących redukcję związków nitroaromatycznych z wykorzystaniem NAD(P)H jako czynnika redukującego oraz mononukleotydu flawinowego (FMN) lub dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD) jako grupy prostetycznej [70]. W ostatnich latach nitroreduktazy zyskały duże zainteresowanie ze względu na ich zastosowanie w bioremediacji, antybiotykoterapii oraz aktywacji proleków w celowanych terapiach przeciwnowotworowych [71]. Związki nitroaromatyczne są selektywnie redukowane przez nitroreduktazy w warunkach niedotlenienia, tworząc reaktywne produkty, które mogą nieodwracalnie wiązać się biomolekułami wewnątrzkomórkowymi [72]. W grupie nitroreduktaz zostały wyodrębnione dwie kategorie reduktaz, w zależności od występowania jedno- lub dwuelektronowej redukcji oraz wrażliwości na tlen [73]. NTR typu I, które są niewrażliwe na tlen, katalizują dwuelektronowy transfer elektronów z NAD(P)H na grupę nitrową, przechodząc przez półprodukty nitrozowe i hydroksloaminowe do w pełni zredukowanej formy aminowej. Proces redukcji katalizowany przez NTR typu I jest niezależny od stężenia tlenu. Redukcja związków nitroaromatycznych przebiega w oparciu o mechanizm ping-pong. W pierwszym etapie następuje utlenienie NAD(P)H z przeniesieniem wodorku do układu flawinowego, a następnie substrat ulega redukcji z jednoczesnym ponownym utlenieniem flawiny. Typ I NTR występuje u bakterii i grzybów, przy czym najlepiej zbadana jest nitroreduktaza z *Escherichia coli* [74]. Dehydrogenazę chinonową NAD(P)H (NQO) można uznać za typ I NTR funkcjonujący w układzie ssaków.

Drugi typ reduktaz, nitroreduktazy typu II, w przeciwieństwie do poprzedniej grupy są wrażliwe na tlen i funkcjonują prawidłowo jedynie w ekstremalnych warunkach niedotlenienia. NTR typu II katalizują proces jednoelektronowej redukcji, generując anionorodnik nitrowy, który w obecności tlenu jest szybko ponownie utleniany do pierwotnego związku nitroaromatycznego, wytwarzając jednocześnie anionorodnik ponadtlenkowy. W ten sposób powstaje tzw. bezproduktywny cykl redoks, który może być źródłem stresu oksydacyjnego [69,70]. Jednak w środowisku beztlenowym ponowne utlenianie rodnika jest nieskuteczne, co powoduje, że redukcja grupy nitrowej jest całkowita i nieodwracalna (**Rysunek 1.6.1**). Zredukowane formy nitropochodnych, a w szczególności pochodne nitroimidazolu mogą oddziaływać z wewnątrzkomórkowymi biomolekułami głównie z białkami, DNA i glutationem, co umożliwia ich zatrzymanie w tkance hipoksycznej [75,76]. NTR typu II występują głównie w układach ssaków i ze względu na selektywne działanie w hipoksji mają szczególne znaczenie w projektowaniu proleków i sensorów do obrazowania hipoksji. Nitroreduktazy typu II związane są z cytoplazmą, mitochondriami i mikrosomami, a należą do nich reduktaza NADPH-cytochromu p450 (POR), oksydoreduktaza ksantynowa (XOR) czy reduktaza cytochromu b5 (CYB5R).



Rysunek 1.6.1 Mechanizm redukcji związków nitroaromatycznych przez nitroreduktazy typu I oraz II.

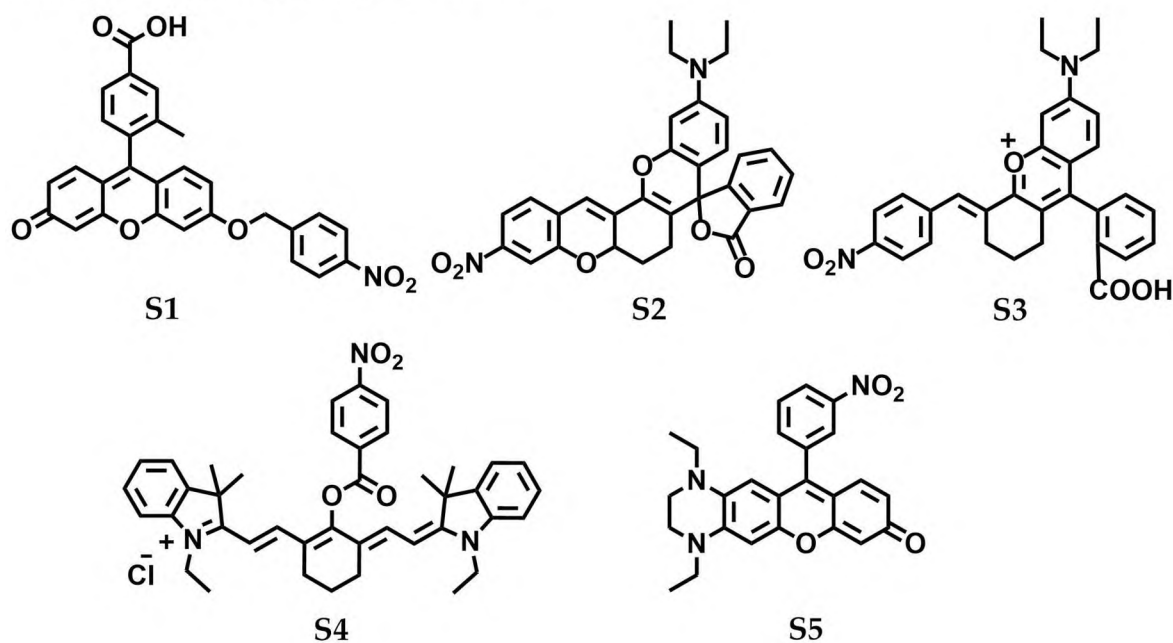
Nitroreduktazy są szeroko badany celem terapeutycznym do aktywacji proleków ukierunkowanych na komórki nowotworowe. Ponadto sugeruje się, że ocena poziomu NTR może być bezpośrednio wykorzystana do oceny stopnia niedotlenienia, co umożliwiłoby określenie stanu chorobowy, rokowania pacjenta oraz wyboru odpowiedniego leczenia [69].

Pomimo szerokiego zainteresowania wykorzystania NTR jako skutecznego biomarkera niedotlenienia, dane dotyczące bezpośredniego związku między stężeniem NTR a stopniem niedotlenienia są sprzeczne. Dodatkowo w wielu badaniach nie ma wyraźnego wskazania, który typ NTR jest badany. Poniżej przedstawiono dostępne dane dotyczące enzymów zaangażowanych w procesy aktywacji leków i sond z uwzględnieniem ich oznaczenia ilościowego lub półilościowego w warunkach *in vitro*, lub *in vivo* w powiązaniu do zastosowanych warunków natlenienia komórek.

W 2017 roku Shenzheng Luo wraz z grupą badawczą wykazali, dla trzech linii komórkowych (HepG-2, A549 i SKOV-3), że poziom NTR, określony za pomocą testu ELISA dla każdej linii komórkowej pozostawał na podobnym poziomie niezależnie od stężenia tlenu. Komórki poddawano 8-godzinnej inkubacji przy różnych stężeniach O_2 w zakresie 20 - 0,1% w komorze AnaeroPack [77]. Co więcej, w modelu mysim, oznaczenie stężenia NTR w litych guzach HepG-2 wykazało, że nitroreduktazy pozostały na stałym poziomie, niezależnie od wielkości guza oraz czasu od wszczepienia podskórnego komórek nowotworowych. Pomimo braku nadekspresji NTR w komórkach hipoksycznych *in vitro* oraz modelu *in vivo*, przeprowadzono badania z wykorzystaniem sondy, będącej pochodną fluoresceiny sprzężonej z grupą paranitrobenzylową (**S1, Rysunek 1.6.2**), która w obecności NTR oraz NADH ulegała rozpadowi z uwolnieniem wysoce fluorescencyjnej pochodnej fluoresceiny. Badania *in vitro*, przeprowadzone na trzech liniach komórkowych (HepG-2, A549 i SKOV-3) wykazały silną korelację między intensywnością fluorescencji sondy a stopniem niedotlenienia komórek (15%, 8%, 5% lub 0,1% O_2) określoną za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej. Większa aktywność sondy w niedotlenieniu nie wynikała ze zwiększonego poziomu NTR w komórkach, który był na stałym poziomie, lecz prawdopodobnie z hamowania reoksydacji wolnych anionorodników nitrowych w warunkach niedotlenienia. Ponadto wykazano, że sonda może być również wykorzystana do rozróżnienia etapów wzrostu guzów, które były skorelowane ze stopniem niedotlenienia w modelach *in vivo*. Pomimo stałego poziomu NTR w guzach różnej wielkości, intensywność fluorescencji różniła się ponad 2-krotnie w guzie 14 mm w porównaniu z guzem 7 mm.

W 2022 roku grupa Yu Zhang przedstawiła pracę na temat dwóch sond emitujących w bliskiej podczerwieni opartych o fluorofor rodaminy do obrazowania NTR [78]. Badania przeprowadzono na linii komórkowej HeLa, dla której stężenie NTR wykrywane testem ELISA istotnie zależało od stopnia niedotlenienia. Ośmiogodzinna inkubacja komórek w różnych stężeniach tlenu spowodowała wzrost ekspresji NTR proporcjonalny do stężenia

tlenu. Stężenia 15%, 10% i 1% O₂ odpowiadały 2-, 5- i 10-krotnemu wzrostowi stężeń NTR w komórkach, w porównaniu z poziomem NTR dla kontroli hodowanej w 20% O₂. Dla przedstawionych w pracy sond wykazano, że w celu zwiększenia czułości na NTR konieczne jest ograniczenie rotacji wewnątrzcząsteczkowej poprzez usztywnienie cząsteczki, które osiągnięto, wprowadzając pierścień piranowy między ugrupowanie rodaminy i nitrobenzenu w cząsteczce sondy (S2, Rysunek 1.6.2). Fluorescencja sondy była silnie skorelowana ze stężeniem tlenu w atmosferze oraz poziomem ekspresji NTR. Ponadto stwierdzono, że sonda jest selektywnie gromadzona w mitochondriach i może być wykorzystana do oznaczania egzogennych i endogennych nitroreduktaz w komórkach. Zdolność sondy do obrazowania *in vivo* testowano na mysim modelu guza HeLa. Wykazano, że sonda selektywnie gromadziła się po około 20 min tylko w komórkach guza i była usuwana w ciągu 6 h. Przedstawione wyniki wskazują na potencjał sondy do ilościowego obrazowania hipoksyjnych guzów *in vivo*.



Rysunek 1.6.2 Struktury wybranych sond fluorescencyjnych aktywowanych niedotlenieniem.

Nadekspresję NTR w warunkach niedotlenienia potwierdziły również badania *in vivo* przeprowadzone przez grupę Yuhao Li na mysim modelu guza A549 [79]. W tych badaniach obecność niedotlenienia w guzie A549 u myszy potwierdzono za pomocą obrazowania PET. Wynik ten był następnie skorelowany z poziomem nitroreduktaz oznaczonym za pomocą metody Western Blot. Pasma odpowiadające masie cząsteczkowej enzymu wykryto jedynie w tkance nowotworowej. Ponadto przetestowano opracowaną przez badaczy sondę emitującą w bliskiej podczerwieni, będącą pochodną cyjaninową do wykrywania poziomu

NTR. Przedstawioną na **Rysunku 1.6.2** sondę **S4** wybrano spośród grupy związków po wstępnej analizie strukturalnej i dokowaniu do nitroreduktazy. Sygnał fluorescencji w komórkach A549 inkubowanych z sondą wzrastał proporcjonalnie do malejącego stężenia tlenu (10%, 5%, 3% i 1% O₂), jednakże wyniki te nie zostały skorelowane z poziomem ekspresji NTR w tych komórkach. Obrazowanie *in vivo* w modelu guza myszy A549 przy użyciu sondy wykazało bardzo szybkie i dokładne wykrycie guza, a wzmocnienie fluorescencji odpowiadało poziomowi niedotlenienia w guzach o różnej wielkości. Wykazano, że sonda może służyć do rozróżniania wielkości guzów różniących się stopniem niedotlenienia i ekspresją NTR. Dodatkowo możliwe było odróżnienie guzów niedotlenionych od tkanek zapalnych. Co ważne, ze względu na dużą głębokość penetracji sond i niską moc wzbudzenia sond, prezentowane badania mogą stanowić nową obiecującą strategię dalszego rozwoju nowatorskich sond do wysoce czułych badań obrazowania nitroreduktazy *in vivo*.

Inne podejście do oznaczania nitroreduktazy w komórkach obejmuje oznaczenie poziomu anhidrazy węglanowej 9 (CA9), jako markera zastępczego NTR [80,81]. Już wcześniej wykazano, że ekspresja CA9 jest indukowana w hipoksji i powszechnie uważa się, że może być skorelowana z poziomem tlenu [81]. Jak jednak ostatnio ustalono, jest ona zależna od linii komórek nowotworowych i typu nowotworu [82]. Kenneth Hettie wraz z zespołem badawczym odnotowali dodatnią korelację między poziomem niedotlenienia, a całkowitą ekspresją CA9 dla czterech linii komórkowych glejaka [80]. Analiza Western Blot wykazała, że komórki U87, U251, GBM2 i GBM39 hodowane 24 h w 2% O₂ wykazywały odpowiednio 2-, 4-, 4- i 8-krotny wzrost ekspresji CA9 w porównaniu z warunkami fizjologicznymi (20% O₂). Ponadto, zastosowana sonda fluorescencyjna aktywowana przez NTR (**S5, Rysunek 1.6.2**) ulegała aktywacji, powodując podobny wzrost intensywności emisji (8-krotny) po inkubacji z komórkami GBM39 w tych samych warunkach odpowiednio 2% i 20% O₂. Na podstawie tej obserwacji zasugerowano korelację pomiędzy ekspresją CA9, a NTR. Konieczne są jednak dalsze badania, aby zaobserwować, czy wykazana korelacja jest specyficzna dla danej linii, czy też może być stosowana bardziej uniwersalnie.

Przedstawione powyżej badania nie analizowały dokładnie konkretnych nitroreduktaz odpowiedzialnych za redukcję sond fluorescencyjnych, natomiast pojawiają się w ostatnim czasie prace badające wpływ danego enzymu na aktywację proleków i sond czułych na niedotlenienie.

Do oksydoreduktaz 2-elektronowych należy dehydrogenaza NAD(P)H chinonowa 1 (NQO1 – ang. *NAD(P)H quinone dehydrogenase 1*), która pomimo aktywności w normalnych tkankach może być wykorzystywana do obrazowania niedotlenienia ze względu na możliwą nadekspresję w niektórych nowotworach. Poziom NQO1 koreluje z niedotlenieniem [83] ponieważ stabilizuje HIF-1 α i zapobiega jego interakcji z PHD [84]. Wiele badań wykazało, że zwiększona redukcja grup azowych zachodzi w warunkach hipoksji, co może być skuteczną strategią projektowania proleków i sond czułych na hipoksję [85–90]. Grupa badawcza Surendra Punganuru w 2019 r. wykazała, że komórki nowotworowe zawierały bardzo wysokie poziomy NQO1 w przeciwieństwie do nienowotworowych linii komórkowych, dla których nie wykryto tego białka [91]. Poziom ekspresji NQO1 dobrze korelował z intensywnością fluorescencyjnej sondy NIR opartej na połączeniu fluoroforu z substratem NQO1 – ugrupowaniem chinonowym. Również badania *in vivo* na modelu mysim potwierdziły, że NQO1 był obecny jedynie w tkance guza, a użyta sonda wykazywała wysoką selektywność względem guzów o zwiększonej ekspresji tego białka. Niestety badania porównujące ekspresję NQO1 w warunkach niedotlenienia i normoksji dla różnych liniach nowotworowych dostarczają sprzecznych informacji. Badania przeprowadzone przez O'Dwyer wykazały 4-krotny wzrost mRNA NQO1 w ludzkich komórkach HT29 inkubowanych przez 24 godziny w warunkach beztlenowych [92]. Warto jednak zauważyć, że niedotlenienie osiągnięto poprzez wdmuchiwanie do butelek hodowlanych N₂ za pomocą igły, co niezbyt dobrze obrazuje warunki niedotlenienia. Do innych wniosków doprowadziły badania grupy badawczej Manleya, która zbadała 15 różnych linii komórek nowotworowych pod kątem poziomów NQO1 w normoksji i niedotlenieniu. Analiza Western Blot wykazała, że poziomy NQO1 wahały się w zależności od linii komórkowej od bardzo wysokich do niskich, podczas gdy w komórkach linii nowotworowej T47D i MDA-MB-231 nie wykryto w ogóle NQO1. Jednak nie stwierdzono różnic w poziomie NQO1 między komórkami hodowanymi w warunkach niedotlenienia i normoksji [93].

Do najważniejszych oksydoreduktaz 1-elektronowych zaangażowanych w proces aktywacji związków oksydoredukcyjnych należy zaliczyć reduktazę cytochromu p450 [94]. Reduktaza cytochromu p450 (POR) poza udziałem w metabolizmie leków, hormonów steroidowych oraz ksenobiotyków [95] jest głównym czynnikiem aktywacji chinonów i związków nitroaromatycznych w komórkach [96–99]. Zaobserwowano silną korelację między ekspresją reduktazy cytochromu p450, a bioaktywacją tirapazaminy [100,101] oraz PR-104A-metabolitu PR-104 w niedotlenieniu (struktury przedstawiono na **Rysunku 1.3.2**).

Zatem można stwierdzić, iż POR odgrywa ważną rolę w aktywowaniu proleków. Natomiast trzeba zwrócić uwagę, że w tych badaniach indukowano nadekspresję POR w komórkach, co nie opisuje rzeczywistego poziomu enzymu w tkance nowotworowej.

W 2007 roku Guise wraz z grupą badawczą badali wpływ inhibicji POR na aktywację proleku PR-104A. Zahamowanie ekspresji POR o 91% skutkowało obniżeniem toksyczności PR-104A o 47%, co potwierdza, że POR jest jedną z głównych, ale nie jedyną reduktazą odpowiedzialną za aktywację tego proleku w hipoksji [96]. Ponadto, inne badania wskazują, że potencjał antyproliferacyjny SN30000 (strukturę przedstawiono na **Rysunku 1.3.2**) w warunkach beztlenowych był znacznie zwiększony na skutek nadekspresji POR [57]. Podobnie, genetyczne badania przesiewowe dla enzymów wymaganych dla aktywności HAPs w niedotlenieniu zidentyfikowały reduktazę cytochromu p450 jako główny wyznacznik wrażliwości na HAPs [102]. Chociaż przeprowadzono wiele prac w celu potwierdzenia udziału POR w aktywacji HAPs, nadal nie ma wystarczających badań określających ilościowo poziom enzymu w niezmodyfikowanych komórkach nowotworowych w warunkach normoksji i hipoksji. Grupa Nytko wykazała, że na poziom ekspresji POR dla linii komórkowej raka głowy i szyi (UT-SCC-14) oraz raka płuc (A549) nie wpływało niedotlenienie [103]. Poziom białka był jednak zależny od linii komórkowej oraz dobrze korelował z wrażliwością komórek na ewofosfamid (strukturę przedstawiono na **Rysunku 1.3.2**).

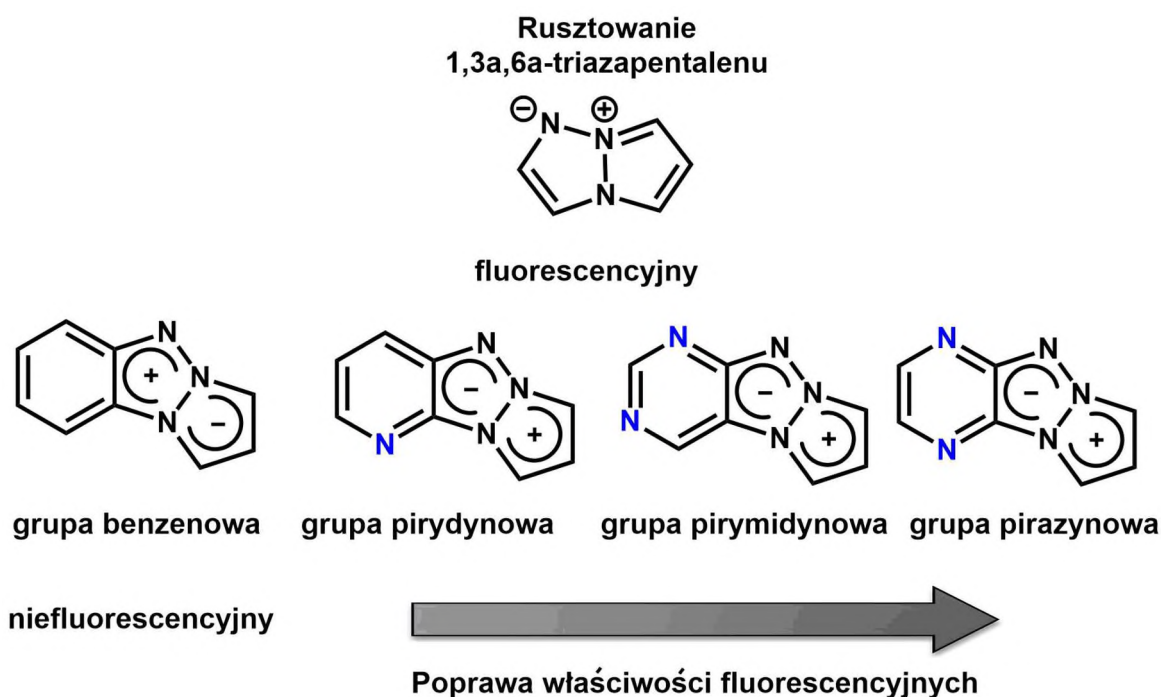
Przytoczenie przykłady pokazują znaczenie oceny poziomu oksydoreduktaz w celu zwiększenia efektywności proleków aktywowanych przez dany enzym. Należy zauważyć, że rodzaj oksydoreduktazy zaangażowanej w redukcję danego typu związków może być różny. W związku z tym profilowanie reduktaz istotnych dla testowanych związków wraz z oceną poziomu ich ekspresji lub aktywności w komórkach nowotworach jest kluczowe do osiągnięcia pozytywnych wyników.

1.7 Rusztowanie triazapentalenowe - nowy typ fluoroforów

Niskocząsteczkowe sondy fluorescencyjne stały się niezwykle ważnym narzędziem w wielu dziedzinach nauki, w tym w badaniach biologicznych, biomedycznych i biochemicznych, jak również w diagnostyce i analizie środowiskowej [104]. Od czasów odkrycia pierwszego fluoroforu, chininy, w połowie XIX wieku, nastąpił ogromny postęp w tej dziedzinie. Do najczęściej stosowanych rusztowań fluorescencyjnych wykorzystywanych w bioobrazowaniu należą pochodne kumaryny, ksantenu, cyjaniny, naftalimidu, rodaminy oraz BODIPY [104,105]. Fluorofory można funkcjonalizować

i dostrajac z dużą precyzją, aby oznaczać różnorodne cele biologiczne, niestety wiele z nich nie spełnia wszystkich kryteriów stawianym sondom optycznym. Główne problemy wielu cząsteczek fluorescencyjnych to ograniczona rozpuszczalność w wodzie, niska selektywność względem danego obszaru badań, niewystarczająca fotostabilność oraz toksyczność. Bardzo ważnym kryterium są również odpowiednie długości fali emisji i wzbudzenia mieszczące się w zakresie tkankowego okna optycznego (650-900 nm) oraz odpowiednio duże przesunięcie Stokesa, aby zapobiec samowygaszeniu oraz zniwelować autofluorescencję [106]. Dlatego, nieustannie trwają badania nad poszukiwaniem nowych klas fluoroforów będącymi alternatywnymi narzędziami molekularnymi do nowych zastosowań biomedycznych.

Kilka lat temu zespół Namby zapoczątkował badania nad pochodnymi triazapentalenowymi w kontekście wykorzystania ich jako nowej grupy chromoforów o obiecujących właściwościach spektroskopowych [107]. Zaletą rusztowanie 1,3a,6a-triazapentalenu (**Rysunek 1.7.1**) o wysoce skondensowanej strukturze dipolarnej jest stosunkowo niewielki rozmiar, co umożliwia interakcję z celami biologicznymi.



Rysunek 1.7.1 Przykłady związków i ich właściwości fluorescencyjnych opartych o rusztowanie 1,3a,6a-triazapentalenu

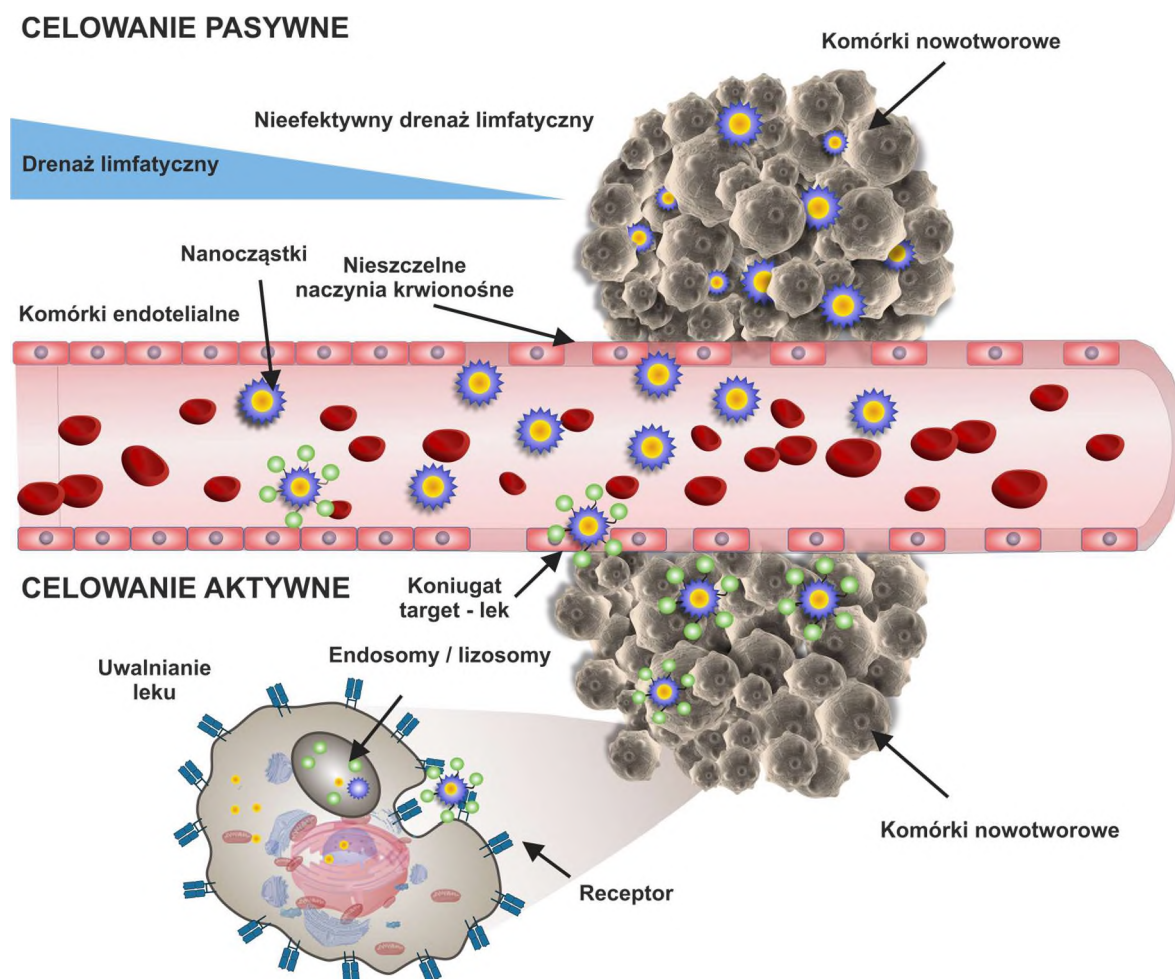
Co więcej, posiadają one dobrą rozpuszczalność nie tylko w rozpuszczalnikach organicznych, ale również niektóre z nich charakteryzuje dobra rozpuszczalność w środowisku wodnym. Rusztowanie fluoroforu można wytworzyć w krótkiej syntezie

organicznej oraz łatwo go funkcjonalizować w celu optymalizacji właściwości optycznych oraz selektywności na dany analit. Grupa Francka Suzenet rozbudowała rusztowanie triazapentalenowe o dodatkowy pierścień heteroaromatyczny oraz wykazała, że ugrupowanie pirydynowe oraz pirazyńowe wpływa pozytywnie na poprawę właściwości fluorescencyjnych w przeciwieństwie do pierścienia benzenowego sprzężonego z rusztowaniem, który całkowicie wygasza fluorescencję [108]. Zaobserwowano wzrost stabilności chemicznej, wydajności kwantowej fluorescencji oraz przesunięcie batochromowe pasm absorpcji i emisji wraz z wprowadzaniem dodatkowych atomów azotu do pierścienia aromatycznego, osiągając najlepsze wyniki dla pierścienia pirazyńo-1,3a,6a-triazapentalenu (PyTAP). Dalsze badania nad funkcjonalizacją PyTAP wykazały możliwości modyfikacji pierścienia w pozycji 2 oraz 8, które pozytywnie wpływały na poprawę właściwości spektroskopowych szczególnie podczas modyfikacji pozycji 2 [109,110]. Modyfikacje w pozycji 8 grupami alkilowymi, aromatycznymi lub heteroaromatycznymi nie wpływały w znaczącym stopniu na zmianę wydajności fluorescencji oraz długości fal wzbudzenia oraz emisji, co potwierdza brak delokalizacji elektronowej między rusztowaniem PyTAP a nienasyconymi podstawnikami w tej pozycji. Badania *in vitro* przeprowadzone na najbardziej obiecujących sondach potwierdziły brak ich toksyczności oraz doskonałą fotostabilność [106,110]. Małe rozmiary cząsteczkowe, dobra fotostabilność, ulepszone właściwości fotofizyczne, duże przesunięcia Stokesa i wszechstronność sond pirazyńo-1,3a,6a-triazapentalenowych sprawiają, że ta nowa grupa fluoroforów stanowi obiecujące narzędzie do projektowania nowych sond do zastosowań biomedycznych.

1.8 Selektywne dostarczanie sond do komórek nowotworowych

Systemy do selektywnego dostarczania chemoterapeutyków do tkanki nowotworowej są aktualnie szeroko rozwijaną tematyką, ponieważ umożliwiają poprawę skuteczności i efektu terapeutycznego leków przy jednoczesnym zmniejszeniu toksyczności względem prawidłowych tkanek [111]. Ukierunkowane dostarczanie można również zastosować podczas obrazowania komórek nowotworowych, co może polepszyć właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne oraz poprawić selektywność i internalizację sond. Ukierunkowane dostarczanie środków terapeutycznych selektywnie do nowotworu zazwyczaj obejmuje zastosowanie nanocząstek polimerowych, liposomów, polimerosomów, dendrymerów, ligandów białkowych lub przeciwciał monoklonalnych [112,113]. Systemy te wykorzystują różne strategie celowania w mikrośrodowisko guza,

oparte na celowaniu pasywnym oraz aktywnym (**Rysunek 1.8.1**) [111,114]. Pasywne ukierunkowane dostarczanie terapeutyków do tkanki nowotworowej opiera się na efekcie zwiększonej przepuszczalności i retencji (EPR), który powszechnie jest obserwowany w guzach litych. Układ krwionośny guza wykazuje patofizjologiczne nieprawidłowości w porównaniu z normalnymi komórkami. Nowo powstałe naczynia mają nieprawidłowy kształt oraz architekturę, charakteryzują się niewłaściwym ułożeniem komórek śródbłonna oraz brakiem mięśni gładkich, co prowadzi do zwiększonej przepuszczalności naczyń i umożliwia wynaczynienie nanocząstek i ich działanie jedynie w obrębie guza. Co więcej, ze względu na występowanie ograniczonych i niefunkcjonalnych naczyń limfatycznych występuje zmniejszony drenaż limfatyczny, co skutkuje niską dyfuzywnością terapeutyków i ich przedłużonym zatrzymaniem.



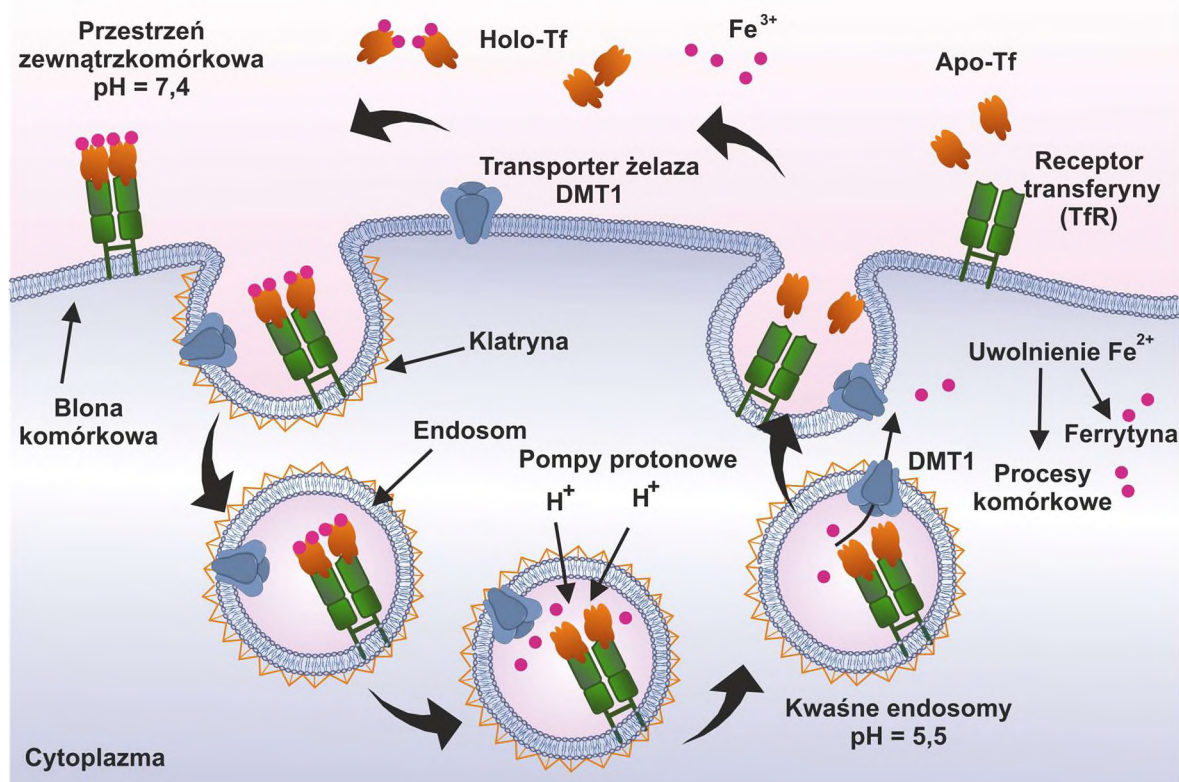
Rysunek 1.8.1 Strategia pasywnego oraz aktywnego dostarczania związków do tkanki nowotworowej.

Strategia aktywnego kierowania terapeutyków do komórek nowotworowych polega na sprzężeniu związku z ligandem, który łączy się ze specyficznymi receptorami komórek nowotworowych ulegającymi nadekspresji. Ligandami kierującymi do tkanki nowotworowej mogą być polisacharydy, przeciwciała i ich fragmenty, hormony, białka, lipoproteiny oraz cząsteczki o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak kwas foliowy lub witaminy. Takie zmodyfikowane lekiem ligandy kierujące wiążą się z receptorami na powierzchni komórki, po czym następuje ich internalizacja do komórek. W przeciwieństwie do pasywnego celowania, które charakteryzuje się względną selektywnością będącą konsekwencją efektu EPR, aktywne dostarczanie umożliwia celowanie w zmiany przerzutowe, w których nie wytworzyło się jeszcze charakterystyczne unaczynienie oraz w nowotwory hematologiczne, dla których efekt EPR nie odgrywa istotnej roli.

1.9 Wykorzystanie transferyny do selektywnego dostarczania związków do komórek nowotworowych

Jednym z podejść do aktywnego dostarczania terapeutyków oraz związków diagnostycznych specyficznych dla tkanki nowotworowej jest wykorzystanie transferyny (Tf), która uznawana jest za doskonały nośnik, umożliwiający dostarczanie substancji do wnętrza komórki. Tf jest glikoproteiną osocza, której podstawową funkcją jest transport żelaza w surowicy oraz dostarczanie go z krwiobiegu do wnętrza komórki. Pojedynczy łańcuch peptydowy transferyny tworzy dwa homologiczne płaty N oraz C połączone krótkim peptydem [115,116]. W każdym płacie można wyodrębnić dwie subdomeny o naprzemiennym ułożeniu α -helis i β -arkuszy, które łącząc się ze sobą, tworzą szczelinę, w której znajduje się miejsce wiązania Fe^{3+} . Jony żelaza(III) w każdym z płatów skoordynowane są z dwoma atomami tlenu pochodzącymi od dwóch tyrozyn, atomem azotu z histydyny, jednym tlenem z reszty asparaginowej i dwoma atomami tlenu pochodzącymi z anionów węglanowych, tworząc centrum koordynacyjne o zaburzonej geometrii oktaedrycznej. Transferyna ulega zmianom konformacyjnym podczas wiązania i uwalniania Fe^{3+} , co uważa się za kluczowe dla rozpoznawania receptorów komórkowych. Zmiany konformacji białka umożliwiające otwierania i zamykania płatów obejmują interakcje międzydomenowe zależne od pH. W krwiobiegu przy pH 7,4 apo-transferyna (apo-Tf) odwracalnie wiąże dwa jony żelaza(III) z dużym powinowactwem (10^{-22} M^{-1}) przechodząc w holo-transferynę (holo-Tf). Główną drogą wychwytu holo-Tf jest internalizacja za pomocą endocytozy zależnej od receptora transferyny (TfR).

W niskim pH, panującym w endosomie następuje protonowanie zewnętrznych Lys (Lys209 i Lys301) kompleksu, co skutkuje zmianą konformacji holo-Tf i uwolnieniem żelaza, które następnie jest transportowane do cytozolu poprzez transporter żelaza DMT1, podczas gdy apo-Tf i TfR są zawracane do środowiska pozakomórkowego [117]. Holo-Tf ma od 10 do 100 razy większe powinowactwo do TfR w porównaniu z apo-Tf w warunkach fizjologicznych [118]. Schematyczny przebieg endocytozy za pośrednictwem receptora transferyny przedstawiono na **Rysunku 1.9.1**.



Rysunek 1.9.1 Cykl transferynowy umożliwiający transport żelaza do komórki za pośrednictwem receptora transferyny.

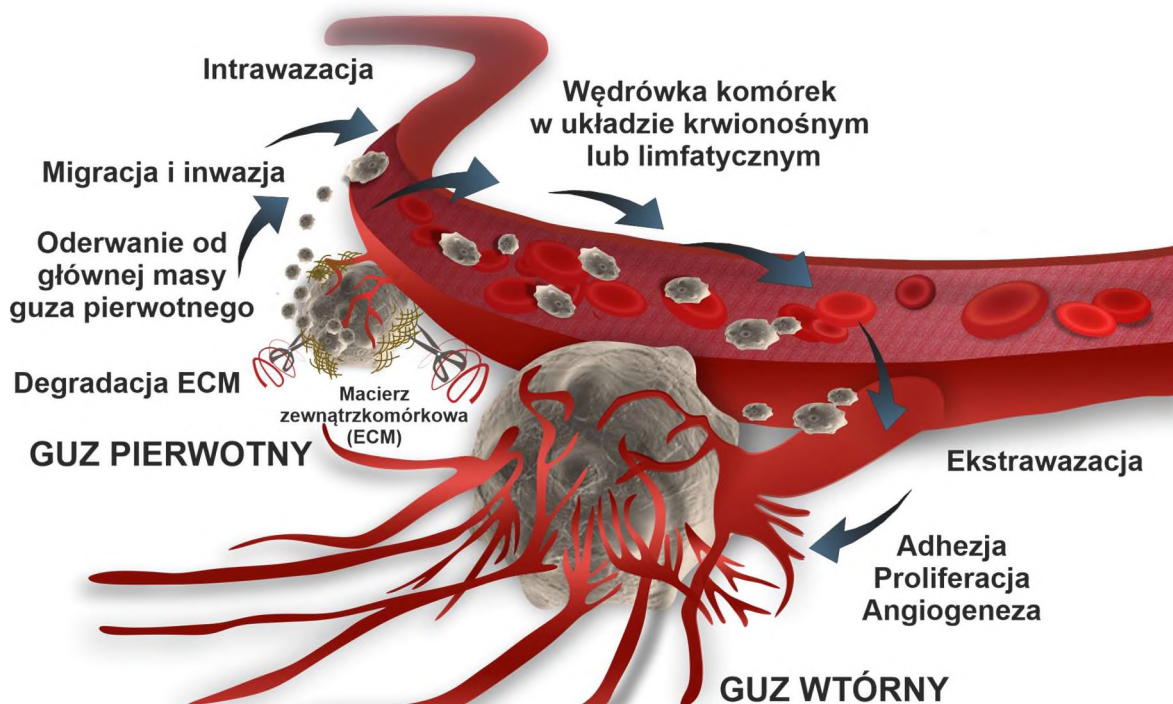
Zwiększona specyficzność koniugatu lek-holo-Tf względem nowotworu wynika z nadekspresji receptora transferynowego w tej tkance. Komórki nowotworowe na skutek nieprawidłowej proliferacji i zwiększonej syntezy DNA wykazują zwiększone zapotrzebowanie na żelazo, w porównaniu z komórkami zdrowymi [119]. Aby spełnić te wymagania, w komórkach nowotworowych następuje nadekspresja grupy białek biorących udział w metabolizmie żelaza, zwłaszcza TfR, którego rolą jest dostarczanie żelaza do wnętrza komórki poprzez wiązanie holo-Tf oraz jej internalizację do wnętrza komórki poprzez endocytozę [120]. TfR ulega ekspresji w komórkach nowotworowych na poziomie wielokrotnie wyższym niż w komórkach prawidłowych, a jego ekspresja jest skorelowana

ze stopniem zaawansowania nowotworu i jego progresją. W związku z tym TfR jest atrakcyjnym celem diagnostycznym i terapeutycznym [121,122]. Jego naturalny ligand, holo-Tf, jest wybierana do sprzęgania leków lub związków diagnostycznych, poprawiając ich internalizację i selektywność dostarczania do tkanki nowotworowej przy jednoczesnej minimalizacji skutków ubocznych [123]. W fazie badań klinicznych znalazł się koniugat Tf z białkiem toksyny błonicy (Tf-CRM107) dedykowany do leczenia glejaka złośliwego, który skutecznie i selektywnie akumulował się w mózgu, nie powodując toksyczności ogólnoustrojowej [124,125]. Niestety, pomimo obiecujących wyników w zakresie zmniejszenia objętości guza w II fazie badań klinicznych podczas kolejnych badań III fazy został wycofany ze względu na brak skuteczności [126]. Należy zwrócić uwagę na fakt, że około 85-95% kompleksu TfR-Tf przechodzi szlak recyklingu, który usuwa Tf z powrotem na powierzchnię komórki [117]. Dlatego ważnym aspektem jest, aby związek (lek lub sonda) został skutecznie uwolniony w endosomie lub zmodyfikowana transferyna została zatrzymana wewnątrz komórki.

1.10 Hipoksja w procesie metastazy

Głównym wzywaniem w leczeniu nowotworów nie są guzy pierwotne, a ich zdolność do tworzenia przerzutów, czyli metastazy. Szacuje się, że guzy przerzutowe są odpowiedzialne za ponad 90% wszystkich zgonów spowodowanych chorobą nowotworową [127,128]. Wysoka śmiertelność pacjentów spowodowane jest trudną diagnostyką przerzutów oraz zbyt małą skutecznością leczenia chirurgicznego lub konwencjonalnej chemioterapii i radioterapii. Powstanie przerzutów to złożony i dynamiczny proces selekcji wysoce agresywnych komórek nowotworowych, które uzyskują zdolność do rozprzestrzeniania się w obrębie otaczającej tkanki, a następnie migracji i przetrwania w odległym miejscu, co skutkuje inicjacją nowej zmiany nowotworowej [127,129,130]. W pierwszych stadiach przerzutu następuje zmniejszenie interakcji komórek z guzem pierwotnym oraz degradacja proteolityczna macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), co umożliwi naciekanie komórek na sąsiednie tkanki i ich migrację. Po przedostaniu się komórek nowotworowych w okolicę naczyń krwionośnych lub limfatycznych następuje ich inwazja przezśródbłonkowa do światła naczyń, zwana intrawazacją. Aby powstał przerzut, komórki nowotworowe muszą przetrwać w układzie krwionośnym, a następnie po przetransportowaniu do odległego miejsca, zacząć oddziaływać z komórkami śródbłonka naczyń w celu ekstrawazacji, czyli wynaczynienia. Komórki nowotworowe, które przetrwały w obcym mikrośrodkowisku, aktywują procesy proliferacyjne oraz angiogenezę,

tworząc guzy wtórne. Etapy procesu metastazy zostały przedstawione schematycznie na **Rysunku 1.10.1**.



Rysunek 1.10.1 Schemat procesu metastazy.

Jednym z kluczowych czynników mikrośrodowiskowych promującym metastazę jest chroniczne niedotlenienie guza, które ma istotny wpływ na wiele etapów kaskady przerzutów [131–133].

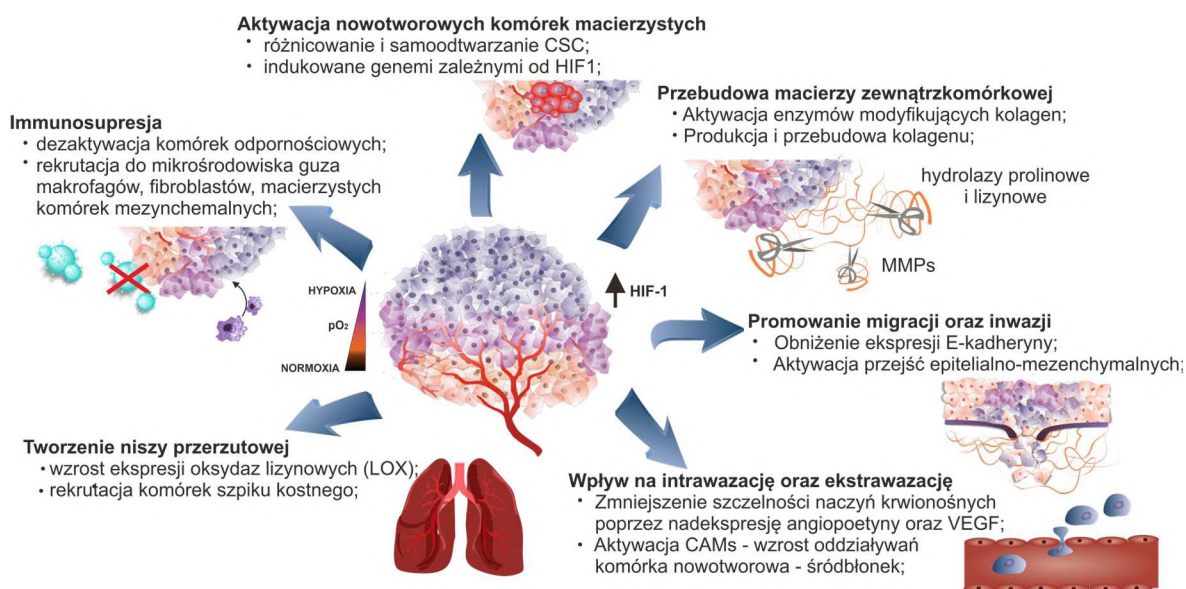
Krytycznym etapem w progresji metastazy jest zdolność komórek nowotworowych do unikania odpowiedzi immunologicznej [134]. Niedotlenienie znane jest jako ważny czynnik promujący fenotypy immunosupresyjne komórek nowotworowych poprzez modulację genów związanych z opornością. Niedotlenienie zwiększa oporność komórek nowotworowych na lizę za pośrednictwem cytotoksycznych limfocytów T, poprzez aktywację odpowiedzi antyapoptotycznej i wyzwalanie autofagii. Co więcej, HIF-1 indukuje ekspresję liganda receptora programowanej śmierci 1 (PD-L1) w komórkach nowotworowych, hamując tym samym aktywację limfocytów T, co skutkuje tłumieniem przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Dodatkowym mechanizmem immunosupresyjnym jest rekrutacja, zależna od HIF, do mikrośrodowiska guza regulatorowych limfocytów T (T_{reg}), makrofagów oraz komórek mieloidalnych, które promują tolerancję immunologiczną. Ekspresja HIF-1 α , poprzez różne szlaki aktywacyjne promuje unikanie odpowiedzi immunologicznej, umożliwiając tym samym wzrost guza

pierwotnego, jak również przetrwanie komórek metastatycznych w nowym środowisku, co ostatecznie umożliwia utworzenie przerzutu [135].

Nabycie właściwości migracyjnych i inwazyjnych przez komórki nowotworowe jest kluczowym aspektem w procesie metastazy [136,137]. Niedotlenienie indukuje plastyczność śródbłonna oraz aktywuje migracyjne i inwazyjne fenotypy komórek poprzez bezpośrednią, oraz pośrednią regulację czynników transkrypcyjnych SNAIL1, SLUG oraz TWIST [137]. Skutkuje to zmniejszeniem ekspresji E-kadheryny, kluczowego białka, odpowiedzialnego za adhezję komórek nowotworowych między sobą oraz komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej. Sygnalizacja HIF indukuje inwazję ECM poprzez zwiększenie wydzielania enzymów proteolitycznych takich jak metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), katepsyny oraz oksydazy lizynowe, które uczestniczą w degradacji kolagenu typu IV, głównego składnika błon podstawnych [138]. Chociaż degradacja ECM przez proteazy uznawana jest za kluczowy mechanizm inwazji, na uwagę zasługują odkrycia z ostatnich lat, wskazujące znaczenie odkładania się włókien kolagenowych na progresję nowotworu. Komórki nowotworowe w celu efektywnego przemieszczania się muszą jednocześnie degradować oraz przebudowywać rusztowanie macierzy zewnątrzkomórkowej. HIF-1 α promuje syntezę kolagenu poprzez aktywację transkrypcji hydroksylaz prolinowych (P4HA1 i P4HA2) oraz lizynowych (PLOD1 i PLOD2) kolagenu, które poprzez hydrolizę kolagenu, promują wiązania poprzeczne w białku, co prowadzi do reorganizacji ECM, zwiększenia inwazji i promocji metastazy [139]. Zależna od HIF aktywacja szlaków sygnalizacji komórkowych takich jak Notch, TGF- β jak również kinaz tyrozynowych pośrednio promuje przejścia nabłonkowo-mezynchemalne. Oprócz bezpośredniego wpływu niedotlenienia na komórki nowotworowe, obniżony poziom tlenu indukuje ekspresję cytokin oraz chemokin, które rekrutują makrofagi oraz mezynchemalne komórki macierzyste do mikrośrodowiska guza w celu wspierania migracji oraz inwazji metastatycznych komórek nowotworowych.

Niedotlenienie moduluje również interakcje między komórkami śródbłonna oraz komórkami nowotworami promując proces intrawazacji oraz ekstrawazacji [135,136]. Nadekspresja angiopoetyny oraz VEGF, indukowana niedotlenieniem, przyczynia się do zmniejszenia oddziaływań między komórkami śródbłonna, umożliwiając przeciekanie komórek nowotworowych przez naczynia krwionośne. Jednocześnie aktywacja cząsteczek adhezyjnych (*cell adhesion molecules*, CAMs) za pośrednictwem szlaku HIF zwiększa adhezję komórek nowotworowych do śródbłonna [140].

Niedotlenienie wpływa również na nowotworowe komórki macierzyste (CSC ang. *Cancer Stem Cells*), które mają wysoki potencjał inicjowania nowotworów, zdolność do samoodnawiania i różnicowania w różne typy komórek [141,142]. Niski poziom tlenu wspiera wytwarzanie i utrzymywanie CSC poprzez zależną od HIF aktywację genów odpowiedzialnych za ich odnawianie oraz różnicowanie w tym OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 oraz c-MYC [135]. Ostatnie badania wskazują, że sygnalizacja HIF w guzie pierwotnym umożliwia również tworzenie niszy przedprzerzutowej w narządach wtórnych na bardzo wczesnych etapach kaskady przerzutowania [142]. W komórkach raka piersi niedotlenienie aktywuje ekspresję oraz wydzielanie białek z grupy oksydaz lizynowych, które modyfikują ECM w płucach, co powoduje rekrutację komórek szpiku kostnego, które przygotowują tkankę do kolonizacji przerzutów.



Rysunek 1.10.2 Wpływ niedotlenienia na aktywację poszczególnych etapów przerzutowania.

Jak pokazano powyżej, niedotlenienie oraz aktywacja sygnalizacji HIF wpływa aktywująco na każdy z etapów procesu metastazy (**Rysunek 1.10.2**). Niestety, pomimo coraz szerszego zrozumienia mechanizmu przerzutowania oraz wpływu hipoksji na aktywację metastazy, rozwój terapii przeciwprzerzutowych z uwzględnieniem poziomu tlenu w komórkach jest nadal niewystarczający. Każdy z etapów procesu przerzutowania stwarza możliwości terapeutyczne, jednak ze względu na dużą złożoność mechanizmu przerzutowania, obecne możliwości leczenia, w tym chemioterapia, są tylko częściowo skuteczne. Dotychczasowe badania kliniczne skupiają się głównie na inhibitorach metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej oraz inhibitorach angiogenezy [143],

niestety obie te grupy charakteryzują się niewystarczającą efektywnością. W związku z tym, coraz więcej uwagi skupia się na jednoczesnym celowaniu leków na kilka procesów metastazy w celu zwiększenia skuteczności terapii.

1.11 Problem skuteczności terapii tlenozależnych w tkance hipoksycznej

Niedotlenienie jest jedną z najtrudniejszych barier w onkoterapii, które może powodować oporność na różne metody leczenia nowotworów, w tym oporność na radioterapię, niektóre rodzaje chemioterapii, immunoterapii oraz terapii fotodynamicznej. Niski poziom tlenu w tkankach wpływa na efektywność terapeutyków w sposób bezpośredni oraz pośredni [144–147]. Hipoksja działa bezpośrednio na obniżenie wrażliwości komórek na tlenozależne terapeutyki, które wymagają komórkowego tlenu do osiągnięcia maksymalnej skuteczności. Badania dowodzą, że niedotlenione komórki nowotworowe są odporne na związki alkilujące DNA, takie jak melfalan, ze względu na zwiększoną produkcję substancji nukleofilowych w warunkach hipoksycznych, które mogą być konkurencyjnie alkilowane, zamiast DNA. Z powodu spowolnienia cyklu komórkowego w warunkach hipoksji, leki alkilujące lub antymetabolity działające podczas syntezy DNA będą charakteryzować się zmniejszoną skutecznością. Wykazano również oporność hipoksycznych komórek nowotworowych na cisplatynę, co można wytłumaczyć zwiększoną w tych komórkach ekspresją metalotioneiny, grupy białek, które mają silne powinowactwo do metali ciężkich, ale również do Pt czy Pd. Pośrednią dezaktywację leków powodują zmiany genomu zależne od HIF, między innymi mutacje p53, prowadzące do lekooporności poprzez utratę potencjału apoptotycznego. Problemy z dostateczną skutecznością terapii wynikają również z niskiego pH tkanek niedotlenionych oraz ograniczonej efektywności dostarczania leku przez nieprawidłowe naczynia krwionośne lub ich brak w tkance hipoksyjnej, co ogranicza w znacznym stopniu dyfuzję leku [148].

Hipoksja, poprzez tworzenie immunosupresyjnego mikrośrodowiska guza oraz wpływ na punkty kontrolne układu odpornościowego zwiększa oporność komórek nowotworowych na immunoterapię [149]. Powstanie mikrośrodowiska hipoksycznego utrudnia skuteczność terapii fotodynamicznej, ograniczając wytwarzanie reaktywnych form tlenu [150,151]. PDT z wykorzystaniem fotosensybilizatorów typu II, które wytwarzają tlen singletowy, również może przyczyniać się do zwiększonej konsumpcji tlenu w tkance, a tym samym przyczynia się do pogłębienia hipoksji. W związku z negatywnym wpływem niedotlenienia na wiele aspektów terapii przeciwnowotworowych w ostatnich latach podejmuje się liczne próby przezwyciężenia oporności terapeutycznej spowodowanej niedotlenieniem.

1.12 Polipirydyłowe kompleksy Ru w terapiach przeciwnowotworowych

Wraz z odkryciem oraz wprowadzeniem do onkoterapii chemioterapeutyków opartych na metalach, takich jak cisplatyna, szeroko rozwinął się obszar zastosowania kompleksów metali w różnych terapiach przeciwnowotworowych [152]. Kompleksy rutenu mogą być obiecującymi kandydatami jako nowa generacja leków opartych o związki metali w chemioterapii, terapii przeciwrzutowej, terapii fotodynamicznej lub terapii celowanej [153–155]. Związki rutenu były od wielu lat badane pod kątem ich zastosowania w terapii przeciwnowotworowej jako środki cytotoksyczne, co doprowadziło do badań klinicznych nad związkiem KP1019 oraz jego solą sodową KP1339 [155,156]. Natomiast stosunkowo niedawne badania wykazały, że oprócz ich dobrze udokumentowanej aktywności cytotoksycznej mogą wykazywać właściwości antymetastatyczne. Głównym przedstawicielem związków przeciwrzutowych zawierających ruten jest NAMI-A ($[(\text{ImH})[\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]]$) oraz jego sól sodowa (NAMI), który jako pierwszy, nietoksyczny związek metalu o właściwościach przeciwrzutowych wszedł do badań klinicznych [152,157,158]. Wykazano, że NAMI-A charakteryzuje się znacznie wyższą skutecznością i selektywnością wobec metastatycznych komórek nowotworowych w porównaniu z nowotworami pierwotnymi, jednocześnie nie wykazując toksyczności wobec prawidłowych tkanek oraz narządów. Skuteczność NAMI-A spowodowana jest wpływem kompleksu na wiele etapów procesu przerzutowania, w tym na modyfikację mikrośrodowiska guza, oderwaniem pierwotnych komórek nowotworowych od masy guza, migrację, inwazję oraz ponowną adhezję we wtórnym miejscu. Badania *in vitro* przeprowadzone na komórkach czerniaka B16F10 wykazały znaczny wzrost adhezji komórek traktowanych nietoksycznym stężeniem NAMI-A, ponadto związek efektywnie obniżał inwazję oraz transmigrację komórek przez śródbłonek. Wykazano również wpływ NAMI-A na zahamowanie degradacji proteolitycznej macierzy zewnątrzkomórkowej, poprzez obniżenie ekspresji metaloproteinaz MMP-2 oraz MMP-9 [159,160]. Co więcej, NAMI-A wpływa na mikrośrodowisko guza poprzez oddziaływanie z kolagenem, inhibicję integryn na powierzchni komórek nowotworowych oraz zmianę ekspresji cząsteczek adhezyjnych między innymi CD44, CD54 [160]. Kompleks rutenu posiada również potencjał do modulowania angiogenezy, kluczowego etapu wzrostu guza oraz powstawania przerzutów. NAMI-A charakteryzowało się silną skutecznością hamowania przerzutów nowotworu *in vitro* oraz *in vivo*, jednak badania kliniczne fazy II wykazały, że powodował

on poważne skutki uboczne u pacjentów oraz nie udowodniono również jego skuteczności przeciwprzerzutowej, w związku z czym dalsze badania kliniczne nie zostały kontynuowane. Pomimo tego, odkrycie NAMI-A wyznaczyło nowe trendy w projektowaniu związków terapeutycznych na bazie kompleksów metali, koncentrujących się na hamowaniu procesu metastazy.

Innym przykładem związku będącego w badaniach klinicznych jest TLD1433, polipirydylowy kompleks rutenu, który wykorzystano jako fotosensybilizator w terapii fotodynamicznej w nieinwazyjnym leczeniu raka pęcherza [161–163]. Polipirydylowe kompleksy rutenu w ostatniej dekadzie pojawiły się jako wiodąca grupa związków wykorzystywana jako związki przeciwnowotworowe [164]. Poprzez odpowiednią modyfikację struktury liganda można łatwo dostosowywać właściwości kompleksów Ru(II), co pozwala na projektowanie związków o określonych właściwościach. Większość polipirydylowych kompleksów rutenu(II) charakteryzuje się wysoką stabilnością w szerokim zakresie warunków, nie ulegając utlenieniu ani też reakcjom podstawienia liganda. Dużym zainteresowaniem cieszą się kompleksy Ru(II) wykazujące luminescencję, mogące łączyć właściwości terapeutyczne oraz diagnostyczne [165]. Dzięki połączeniu unikatowych cech optycznych, między innymi długożyjących stanów wzbudzonych i wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji, wraz z korzystnymi właściwościami biologicznymi możliwe jest ich zastosowanie jako związków cytotoksycznych z możliwością obrazowania ich miejsca działania [166]. Ze względu na wysoką cytotoksyczność większości polipirydylowych kompleksów Ru(II), znaczna część najnowszych badań była ukierunkowana na projektowanie cytostatyków, jak również na wyjaśnieniu mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowane efekty biologiczne [164]. Natomiast, w ostatnich latach polipirydylowe kompleksy Ru(II) są coraz szerzej badane jako fotosensybilizatory w terapii fotodynamicznej [162,163,167] czy też leki przeciwprzerzutowe, ukierunkowane na wiele etapów przerzutowania [166,168–170].

2 Cel pracy

Niedotlenienie tkanek, zwane hipoksją, zostało zidentyfikowane jako cecha charakterystyczna dla mikrośrodowiska guzów litych i klasyfikuje się ją jako niekorzystny czynnik prognostyczny w diagnostyce nowotworów. Wykazano, że niedotlenienie może sprzyjać inwazji guza i przerzutom, jak również wpływa na wzrost oporności komórek nowotworowych na różnego rodzaju terapię, a szczególnie terapię tlenozależną, czyli radioterapię, terapię fotodynamiczną jak również chemioterapię w przypadku wielu stosowanych chemioterapeutyków. Ze względu na dużą niejednorodność guzów poziom niedotlenienia może znacznie różnić się u pacjentów, nawet z tym samym rodzajem nowotworu. Dlatego, obecnie istnieje pilna potrzeba oceny poziomu niedotlenienia. Określenie poziomu hipoksji umożliwia ocenę stopnia zaawansowania choroby, oraz poznania wpływu terapii na jej rozwój, co pozwala lepiej ocenić rokowania pacjenta. W związku z tym, badania naukowców koncentrują się na opracowaniu sensorów, które wykrywają subtelne wahania stężenia tlenu, selektywnie gromadzą się jedynie w niedotlenionych tkankach nowotworowych oraz posiadają łatwy oraz tani system detekcji. Zrozumienie mechanizmów działania sond czułych na niedotlenienie oraz skorelowanie ich aktywacji z ekspresją enzymów odpowiedzialnych za ich redukcję pozwoliłoby na lepsze poznanie poziomu niedotlenienia dla poszczególnych nowotworów u pacjentów, co jest niezbędne w wyborze konkretnej ścieżki leczenia.

W pracy doktorskiej zaplanowano trzy ścieżki badań obejmujące różne aspekty występowania hipoksji w komórkach nowotworowych. Skupiono się na jej oznaczaniu przy użyciu sensorów fluorescencyjnych (część I), jej wpływie na właściwości cytotoksyczne oraz przeciwrzutowe kompleksów rutenu (część II) oraz na jej efekcie na terapię fotodynamiczną, w której jako fotosensibilizatory wykorzystano również kompleksy rutenu (część III).

Głównym celem I części pracy doktorskiej jest charakterystyka nowej klasy sensorów fluorescencyjnych opartych na rusztowaniu pirazyno-1,3a,6a-triazapentalenu pod kątem ich wykorzystania do oceny stężenia tlenu w tkankach nowotworowych. Poszczególne cele badawcze obejmowały następujące aspekty:

- Ocenę właściwości fizykochemicznych i biologicznych sond fluorescencyjnych zawierających bioredukcyjną nitroaromatyczną grupę połączoną z ugrupowaniem triazapentalenowym;

Cel pracy

- Szczegółowe poznanie mechanizmów redukcji sond pod wpływem nitroreduktaz typu I oraz II;
- Ocenę wpływu białka (HSA) na właściwości fotochemiczne oraz efektywność redukcji sond;
- Zbadanie potencjału sond *in vitro* do rozróżnienia komórek nowotworowych hipoksycznych od normoksycznych;
- Optymalizację biokoniugacji sond do holo-transferyny w celu selektywnego dostarczania sond do komórek nowotworowych za pomocą receptora transferyny;
- Analizę mechanizmu wychwytu komórkowego biokoniugatu zależnego od receptora transferyny oraz ocenę właściwości biokoniugatu *in vitro* do obrazowania komórek nowotworowych o obniżonym poziomie tlenu;
- Zbadanie wpływu niedotlenienia na poziom ekspresji oksydoreduktaz zaangażowanych w aktywację związków nitroaromatycznych dla różnych nowotworowych linii komórkowych oraz korelacji ich poziomu ekspresji z efektywnością aktywacji sond triazapentalenowych.

W części II i III rozprawy zwrócono uwagę na niekorzystny wpływ niedotlenienia na skuteczność terapii przeciwnowotworowych opartych o związki wykazujące potencjał cytotoksyczny, przeciwprzerzutowy czy też mogących zostać wykorzystane w terapii fotodynamicznej. Szczegółowe cele badawcze dotyczyły:

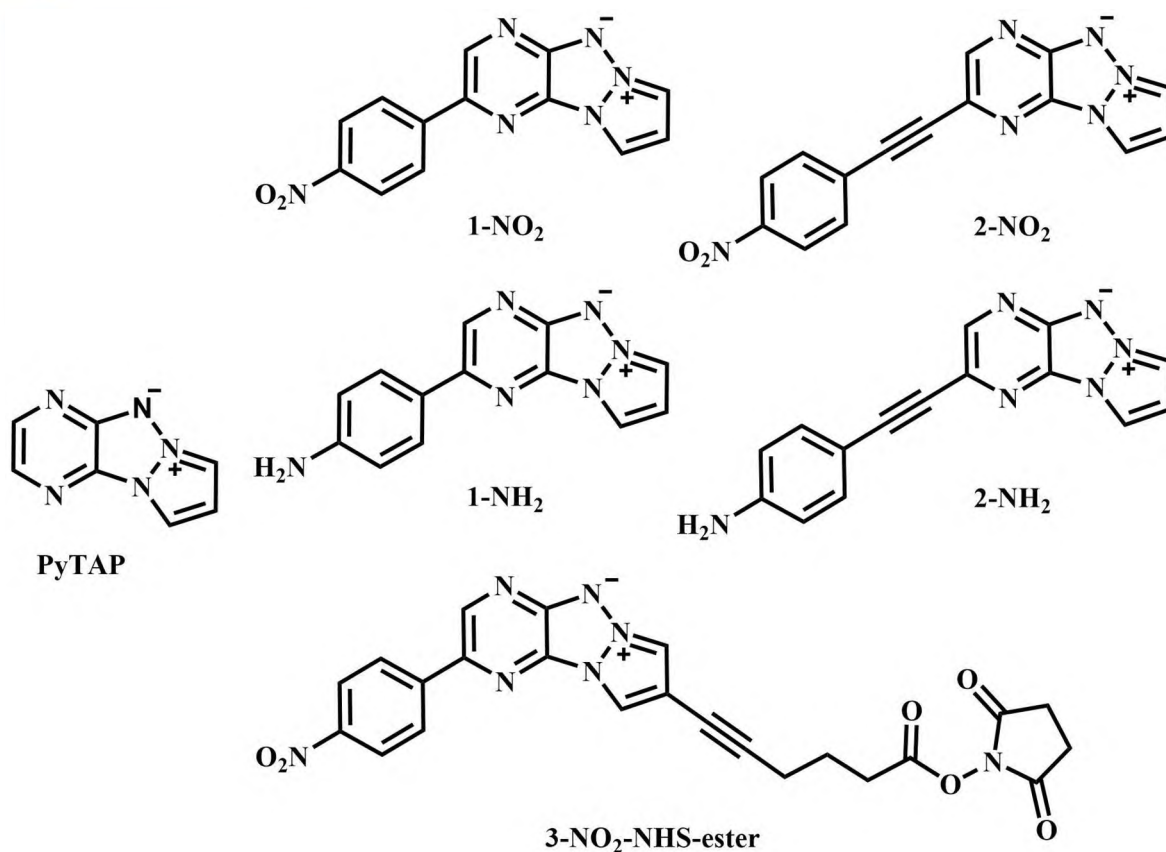
- Działania polipirydylowych kompleksów Ru(II) na poszczególne etapy przerzutowania oraz ocenie wpływu warunków niedotlenienia na efektywność tej terapii;
 - Zbadania wpływu niedotlenienia komórek nowotworowych na aktywność biologiczną polipirydylowych kompleksów Ru(II) w terapii fotodynamicznej.
-

3 Metody

3.1 Reagenty i syntezy

- Wszystkie sondy do obrazowania niedotlenienia:
 - 2-(4-nitrofenylo)pirazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pirazyn-6-ium-5-ide (**1-NO₂**),
 - 2-(4-aminofenylo)pirazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pirazyn-6-ium-5-ide (**1-NH₂**),
 - 2-((4-nitrofenylo)etynylo)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pirazyn-6-ium-5-ide (**2-NO₂**),
 - 2-((4-aminofenylo)etynylo)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pirazyn-6-ium-5-ide (**2-NH₂**),
 - pirazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pirazyn-6-ium-5-ide (**PyTAP**)
 - 8-(6-((2,5-dioksopirolidyno-1-yl)oksy)-6-oksoheks-1-yno)-2-(4-nitrofenylo)pirazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pirazyn-6-ium-5-ide (**3-NO₂-NHS-ester**)

zostały zsyntezowane w grupie prof. Francka Suzenet w Instytucie Chemii Organicznej i Analitycznej (ICOA) na Uniwersytecie w Orleanie. Na **Rysunku 3.1.1** przedstawiono ich struktury.

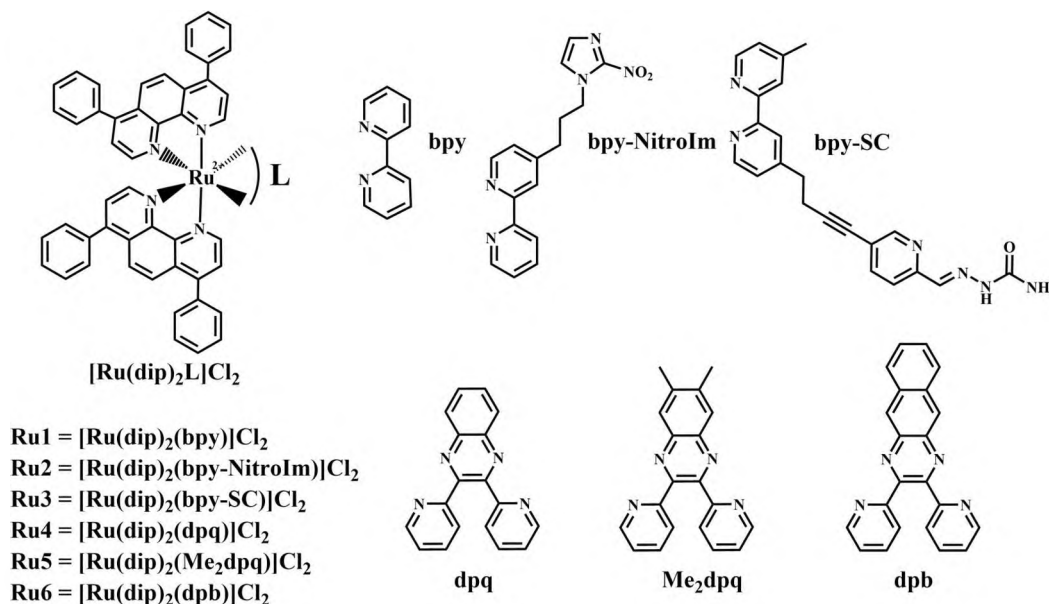


Rysunek 3.1.1 Wzory strukturalne badanych sond fluorescencyjnych (1-NO₂, 2-NO₂ oraz 3-NO₂-NHS-estru), ich pochodnych aminowych (1-NH₂ oraz 2-NH₂) oraz związku referencyjnego (szkieletu pirazyno-1,3a,6a-triazapentalenu) (PyTAP).

- Koniugat holo-transferyny (holo-Tf) z 3-NO₂-NHS-ester (**holo-Tf-3-NO₂**) został otrzymany przeze mnie a jego syntezę opisano poniżej;
- Ligandy: 2,7-difenyl-1,10-phenantrolina (**dip**), 6,7-dimetylo-2,3-bis(2-pirydylo)chinoksalina (**Mezdpq**) zostały zakupione w Sigma-Aldrich;
- Ligandy: 2,3-bis(2-pirydylo)chinoksalina (**dpq**), oraz 2,3-bis(2-pirydylo)benzo[g]chinoksalina (**dpb**) zostały zsyntezowane przez dr Olę Mazuryk, WCh UJ [171] według opublikowanej procedury [172];
- Ligand **bpy-SC** został zsyntetyzowany przez dr Michała Łomzika, WCh UJ we współpracy z prof. Philippem Gros z CNRS, Nancy, Uniwersytet w Lotaryngii;
- Ligand **bpy-NitroIm** został zsyntezowany w grupie Prof. Francka Suzenet, ICOA, Uniwersytet w Orleanie;
- Kompleksy **Ru1**, **Ru2**, **Ru3** zostały zsyntezowane przez dr Ilonę Gurgul, WCh UJ według opublikowanych procedur [166,173,174];

- Kompleksy **Ru4**, **Ru5**, **Ru6** zostały zsyntezowane przeze mnie na podstawie opublikowanych procedur [175] i opisano je dokładnie poniżej.

Na **Rysunku 3.1.2** przedstawiono struktury polipirydylowych kompleksów Ru(II) badanych w ramach pracy.



Rysunek 3.1.2 Wzory strukturalne badanych kompleksów Ru(II) typu [Ru(dip)₂(L)]²⁺ gdzie (L = bpy – **Ru1**, bpy-NitroIm **Ru2**, bpy-SC – **Ru3**, dpq – **Ru4**, Me₂dpq – **Ru5**, dpb – **Ru6**).

3.1.1 Koniugacja holo-transferyny z sondą 3-NO₂-NHS-ester

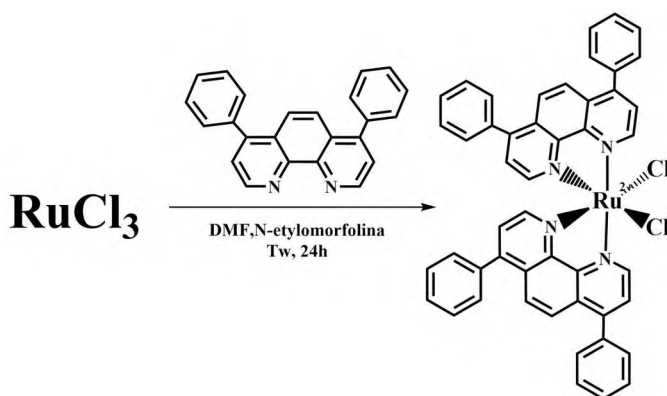
Roztwór ludzkiej holo-transferyny (holo-Tf) (Sigma Aldrich, ≥ 98%) przygotowano poprzez rozpuszczenie liofilizatu w buforze wodorowęglanowym (0,1 M, pH 8,3), stężenie wyznaczano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem prawa Lamberta-Beera ($\epsilon_{280\text{nm}} = 8,64 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Do roztworu holo-transferyny (75 μM) w buforze wodorowęglanowym (0,1 M, pH 8,3) dodano dziesięciokrotny nadmiar estru **3-NO₂-NHS-ester** (750 μM) rozpuszczonego w bezwodnym DMSO. Końcowe stężenie DMSO w roztworze ustalono na 5% (v/v). Mieszaninę reakcyjną delikatnie mieszano przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem. W celu zatrzymania reakcji do roztworu dodano hydroksyloaminę (0,15 M, pH 8,5) i inkubowano przez kolejną godzinę. Następnie skoniugowane z sondą białko oddzielono od nieprzereagowanego związku przez ultrafiltrację (cut-off, 30 kDa, Amicon), a koniugat białkowy scharakteryzowano za pomocą spektrofotometrii absorpcyjnej i przechowywano w - 20°C. Dla otrzymanego koniugatu każdorazowo określono stopień wiązania barwnika do białka (DOL ang. *degree of labeling*). Stężenie białka wyznaczono za pomocą testu Bradforda, a liczbę ligandów (**3-NO₂**)

związanych z holo-Tf obliczono z wykorzystaniem wyznaczonego współczynnika absorpcji dla **3-NO₂-NHS-ester** ($\epsilon_{450\text{nm}} = 1,9 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).

Reakcje koniugacji analizowano również przy użyciu systemu Bio-Rad FPLC wyposażonego w detektor z matrycą diodową. Do rozdzielania zastosowano kolumnę anionowymienną Mono Q $5 \times 50 \text{ mm}$ (GE HealthCare). Metoda rozdziału: eluent A: 2,4 mM TRIS, 1,5 M imidazol, 11,6 mM piperazyna, 50 mM NaCl pH 8,5 eluent B: 2,4 mM TRIS, 1,5 M imidazol, 11,6 mM piperazyna, 50 mM NaCl pH 2,5; szybkość przepływu 1 ml/min; przepływ izokratyczny 100% A od 0 do 3 min; gradient od 0% do 100% B od 3 min do 23 min; przepływ izokratyczny 100% B w 23 min do 38 min. Chromatogramy rejestrowano stosując detektor UV dla $\lambda = 280 \text{ nm}$.

3.1.2 Synteza $[\text{RuCl}_2(\text{dip})_2]$

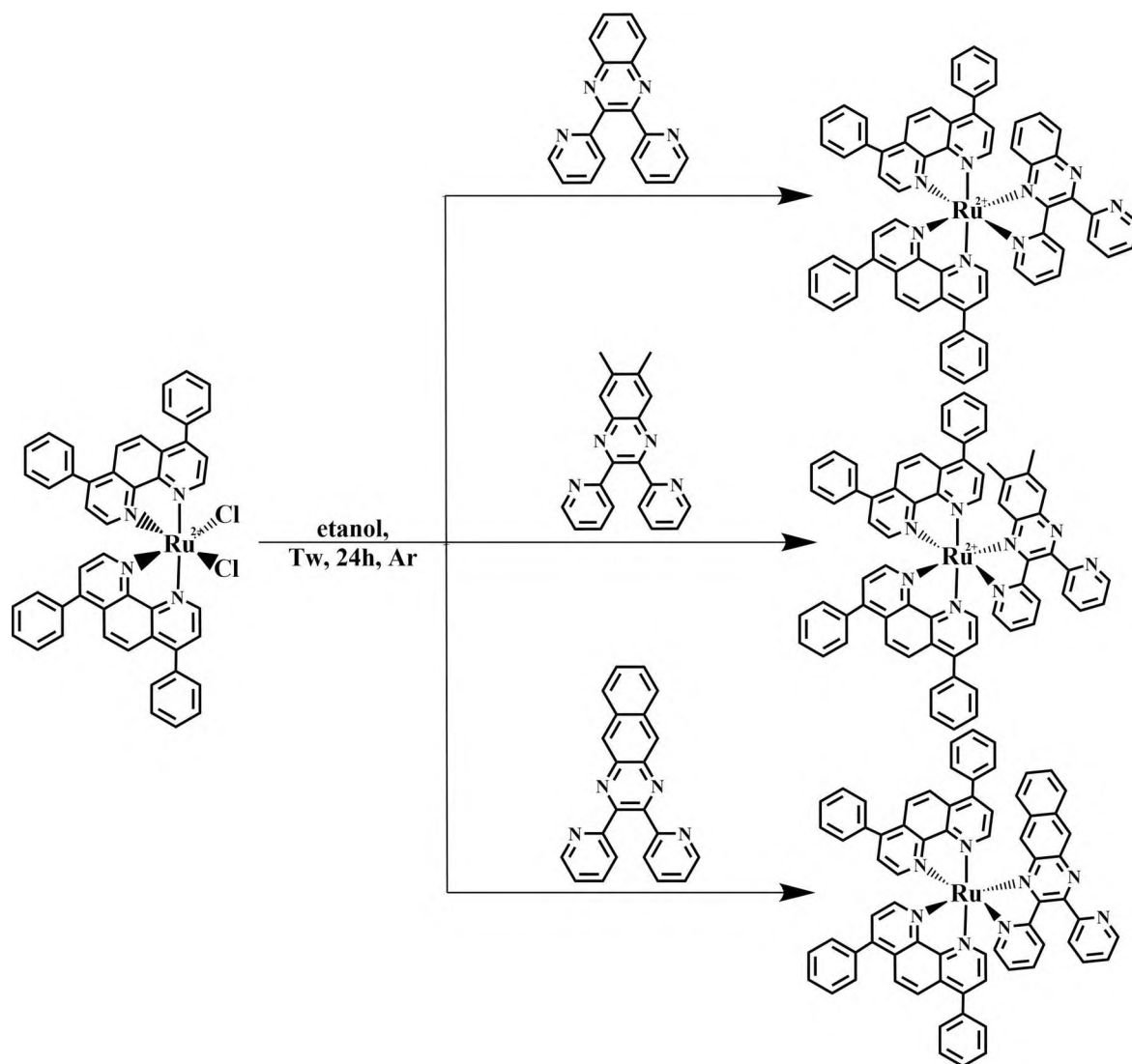
Syntezę przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [176]. $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (50 mg, 0,24 mmol) oraz 4,7-difenylo-1,10-fenantrolinę (dip) (126 mg, 0,38 mmol) rozpuszczono w dimetyloformamidzie (DMF) oraz dodano 2 krople N-etylmorfoliny. Mieszaninę ogrzewano przez 24 h w temperaturze wrzenia DMF pod chłodnicą zwrotną. Następnie rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Czysty produkt otrzymano po krystalizacji z zimnego acetonu (125 mg, 62 %). Czystość potwierdzono metodą HPLC porównując otrzymane chromatogramy z danymi otrzymanymi wcześniej dla tych związków w zespole, dla których czystość potwierdzono metodą HRMS [174].



3.1.3 Synteza $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{dpb})]\text{Cl}_2$, $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{dpq})]\text{Cl}_2$ oraz $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{Me}_2\text{dpq})]\text{Cl}_2$

Syntezę przeprowadzono na podstawie opublikowanych procedur [175]. $\text{Ru}(\text{dip})_2\text{Cl}_2$ (40 mg, 0,05 mmol) wraz z odpowiednim ligandem: 2,3-bis(2-pirydylo)chinoksaliną (dpq) (13,9 mg, 0,036 mmol), 6,7-dimetylo-2,3-bis(2-pirydylo)chinoksaliną (Me_2dpq) (15,6 mg,

0,05 mmol) lub 2,3-bis(2-pirydylo)benzo[g]chinoksaliną (dpb) (16,72 mg, 0,05 mmol) rozpuszczono w etanolu (8 ml). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 24 godziny w atmosferze argonu. Następnie rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstały osad rozpuszczono w wodzie (10 ml) i przesączono. Przesącz odparowano do sucha, a następnie rozpuszczono w dichlorometanie z kilkoma kroplami metanolu i wytrącono eterem dietylowym. Osad przemyto eterem dietylowym i wysuszono, otrzymując czysty produkt ($\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{dpq})\text{Cl}_2$ – 31 mg, 58%, $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{Me}_2\text{dpq})\text{Cl}_2$ – 41 mg, 75 %, $\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{dpb})\text{Cl}_2$ – 29 mg, 52%). Czystość potwierdzono metodą HPLC, porównując otrzymane chromatogramy z danymi otrzymanymi wcześniej dla tych związków w zespole, dla których czystość potwierdzono metodą HRMS.



3.2 Charakterystyka sond

3.2.1 Spektroskopia absorpcyjna

Charakterystykę spektralną badanych sond (**1-NO₂**, **2-NO₂** i **3-NO₂-NHS-ester**) przeprowadzono rejestrując widma absorpcyjne UV-Vis za pomocą spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 35 w temperaturze 25°C w DMSO lub wodnym roztworze zawierającym minimalną ilość DMSO (< 0,25% v/v). Współczynniki absorpcji molowej zostały wyznaczone za pomocą równania Lamberta-Beera:

$$A = \epsilon lc$$

Naważki poszczególnych sond rozpuszczono w DMSO w celu otrzymania stężenia 16 mM, a następnie dodawano niewielką ilością tego roztworu do 2 mL DMSO i rejestrowano każdorazowo widma w kuwecie z drogą optyczną 1 cm. W przypadku wyznaczenia współczynników absorpcyjnych w roztworze wodnym początkowy roztwór sondy w DMSO rozcieńczono do stężenia 1 mM w wodzie, a następnie tym roztworem miareczkowano. Dla każdej naważki uzyskano 10 punktów pomiarowych. Przeprowadzono trzy, niezależne powtórzenia dla każdego ze związków. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną wraz z niepewnością wyznaczoną metodą różniczki zupełnej.

3.2.2 Spektroskopia fluorescencyjna

Pomiary luminescencji rejestrowano na spektrofluorymetrze Perkin Elmer LS55 w zakresie 470 - 800 nm po wzbudzeniu przy maksimum absorpcji dla każdej sondy w warunkach równowagi z powietrzem (zwane dalej **warunki tlenowe**) oraz dla roztworów poddanych argonowaniu w celu usunięcia tlenu (zwane dalej **warunki beztlenowe**). Warunki beztlenowe uzyskano przedmuchując roztwór argonem w gazoszczelnych, zakręcanych kuwetach. Wydajność kwantową luminescencji wyznaczono metodą porównawczą stosując [Ru(bpy)₃]Cl₂ jako wzorec wewnętrzny o znanej wydajności fluorescencji w warunkach tlenowych, w wodzie, równej 0,028 [177]. W celu uniknięcia efektu filtra wewnętrznego widma rejestrowano przy stężeniu niższym niż 0,05 jednostki absorbancji w paśmie wzbudzenia. Obliczono wydajność kwantową zgodnie z poniższym równaniem:

$$\Phi = \Phi_{ref} \cdot [A_{ref} / A] \cdot [I / I_{ref}] \cdot [n^2 / n_{ref}^2] \quad [178]$$

(I, I_{ref} - zintegrowana intensywność pasma emisji próbki i wzorca; A, A_{ref} - gęstość optyczna w paśmie wzbudzenia próbki i wzorca; n, n_{ref} - współczynnik refrakcji rozpuszczalnika zastosowanego do sporządzenia roztworów próbki i wzorca).

Dla każdego związku przeprowadzono trzy, niezależne pomiary i obliczono wartość średnią wraz z niepewnością.

Pomiary czasu życia luminescencji przeprowadzono techniką zliczania pojedynczych fotonów przy użyciu Fluorologu-3 firmy Horiba Jobin Yvon w temperaturze pokojowej. Pomiary wykonano przy użyciu długości fali wzbudzenia ustalonej na 464 nm (dioda NanoLed), natomiast średni czas życia luminescencji został zmierzony przy maksimum emisji danej sondy. Analiza zaników fluorescencji została wykonana na podstawie 10000 zliczeń. Funkcje odpowiedzi aparatury zmierzono stosując rozpraszający światło roztwór Ludox (krzemionka koloidalna, Sigma-Aldrich). Do dekonwolucji uzyskanych zaników emisji i wyznaczenia średnich wartości czasów życia dla poszczególnych związków wykorzystano oprogramowanie DAS6 (HORIBA Scientific).

3.3 Ocena fotostabilności sond

Fotostabilność pochodnych aminowych sond badano na podstawie pomiaru ich absorbancji i intensywności fluorescencji w roztworze wodnym po naświetleniu. W tym celu na płytce 96-dołkowej przygotowywano roztwory **1-NH₂** oraz **2-NH₂** w buforze TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM) o stężeniu 40 μM, a następnie naświetlano monochromatycznym światłem niebieskim (465 nm, 7,35 mW/cm²), dawką światła z zakresu 4,4 - 13,2 J/cm². Dawka światła została zmierzona za pomocą dozymetru światła (Nova II, Ophir). Po naświetleniu monitorowano absorbancję w maksimum absorpcji oraz intensywność fluorescencji przy 564 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 447$ nm) za pomocą czytnika mikropłytek Tecan Infinite 200. Dodatkowo zarejestrowano widma absorbancji i fluorescencji przed eksperymentem oraz po ekspozycji roztworu na maksymalną dawkę światła. Eksperyment dla każdego związku został powtórzony trzykrotnie. Wyniki znormalizowano względem roztworu niepoddanego naświetlaniu i przedstawiono jako wartości średnie wraz z błędem standardowym.

3.4 Redukcja sond przez nitroreduktazę typu I

W celu zbadania mechanizmu redukcji sond fluorescencyjnych przez I typ nitroreduktazy niewrażliwej na tlen wykorzystano nitroreduktazę (NTR) pochodzącą z *Escherichia Coli* (Sigma-Aldrich). Typowymi warunkami do redukcji związków nitrowych (**1-NO₂** i **2-NO₂**) przez NTR było wprowadzenie 16 μM sondy (rozpuszczonej w DMSO, końcowe stężenie DMSO 0,1%), 160 μM NADH (10-krotny nadmiar względem sondy) oraz 2,4 μg/mL NTR do 50 mM buforu TRIS/HCl (pH = 7,4). Reakcję prowadzono w 37°C w warunkach atmosferycznych, jak również beztlenowych. Przed każdym

pomiarem badane roztwory bez dodatku enzymu inkubowano przez 5 min w 37°C, po czym na samym końcu dodano enzym. Przygotowane zostały również „próby ślepe”, czyli roztwory sondy wraz z NADH bez dodatku NTR, które zmierzono w tych samych warunkach jak pozostałe próbki. Postęp reakcji monitorowano spektrofotometrycznie, spektrofluorymetrycznie oraz z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC).

Redukcję grup nitrowych w biokoniugacie **holo-Tf-3-NO₂** prowadzono w analogiczny sposób jak w przypadku wolnych sond. Typowe warunki obejmowały wprowadzenie 3,3 μM **holo-Tf-3-NO₂** (co odpowiada ok. 28 μM grup nitrowym w biokoniugacie), 400 μM NADH (15-krotny nadmiar względem grup nitrowych w skoniugowanym białku) i 4,8 μg/ml NTR do 50 mM buforu TRIS/HCl (pH = 7,4). Reakcję prowadzono w 37°C w warunkach atmosferycznych oraz beztlenowych.

3.4.1 Pomiary spektrofotometryczne

Pomiary spektrofotometryczne wykonano przy użyciu spektrofotometru Lambda 35 (Perkin Elmer), termostowanego modułami Peltiera PTP-6. Widma UV-Vis rejestrowano w 1 cm kuwetach kwarcowych w temperaturze 37°C. Początkowy etap redukcji był zbyt szybki, aby mógł zostać wykryty przez konwencjonalny spektrofotometr. W tym przypadku pierwszy etap reakcji badano przy użyciu spektrometru z zatrzymanym przepływem (stopped-flow) SX20 (Applied Photophysics).

3.4.2 Pomiary spektrofluorymetryczne

Pomiary luminescencji rejestrowano na spektrofluorymetrze Perkin Elmer LS55 w zakresie 480 - 800 nm po wzbudzeniu przy maksimum absorpcji pasma widzialnego dla każdej sondy.

3.4.3 Pomiary chromatograficzne

Oznaczenie produktów redukcji sond przeprowadzono za pomocą HPLC (Perkin Elmer HPLC Chromera). Elucję przeprowadzono na kolumnie Brownlee Validated IBD C18 (5 μm, 150 × 4,6 mm) w 25°C, stosując poniższą metodę rozdzielania. Eluent A: 0,1 M octan amonu, eluent B: acetonitryl; szybkość przepływu 1 ml/min; przepływ izokratyczny 40% B od 0 do 6 min; gradient od 40% do 95% B od 6 do 15 min; przepływ izokratyczny 95% B od 15 do 20 min. Chromatogramy rejestrowano stosując absorbancję przy 447 nm.

W celu identyfikacji produktów powstałych w wyniku redukcji sond zlecono analizę LC-HRMS, którą przeprowadzono na spektrometrze masowym Bruker max (Q-TOF) sprzężonym z systemem Dionex Ultimate 3000 RSLC. Elucję gradientową przeprowadzono w 40°C na kolumnie Phenomenex Kinetex C18 (150 × 2,1 mm; 1,7 μm) przy szybkości przepływu 0,5 ml/min stosując wodę + 0,1% roztwór kwasu mrówkowego (eluent A) i acetonitryl + 0,1% roztwór kwasu mrówkowego (eluent B) jako fazę ruchomą. Metoda rozdziału: 3% B od 0 do 0,5 min; gradient od 3% do 95% B od 0,5 do 10,5 min; przepływ izokratyczny 95% B od 10,5 do 12 min; równoważenie od 12 do 15 min. Widma masowe rejestrowano w trybie dodatnim przy użyciu źródła jonów ESI, a formuły generowano przy użyciu algorytmu SmartFormula z oprogramowania DataAnalysis 4.4 (Bruker) z dokładnością masową 3 ppm. Rozdział i analiza wyników LC-HRMS zostały wykonane przez dr Cyrila Colas w ICOA na Uniwersytecie w Orleanie, natomiast wszystkie próbki do analizy były przygotowywane przeze mnie.

W celu monitorowania redukcji biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** wykorzystano Perkin Elmer HPLC Chromera wyposażonego w detektor z matrycą diodową, stosując kolumnę BioBasic SEC 300, w temperaturze 25°C, wykorzystując roztwór 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, jako fazę ruchomą. Czas rozdziału wynosił 15 min, przy szybkości przepływu 0,35 ml/min. Chromatogramy rejestrowano przy użyciu detektora DAD (280 nm oraz 450 nm) oraz fluorescencyjnego (λ_{ex} 450 nm i λ_{em} 530 nm). Typowe warunki redukcji obejmowały 3,3 μM **holo-Tf-3-NO₂**, 400 μM NADH i 4,8 μg/ml NTR. Reakcję prowadzono w 50 mM buforze TRIS-HCl pH 7,4 w temperaturze 37°C w warunkach normoksji (21% pO₂) oraz w komorze beztlenowej „glovebox”. (Inert, I-Lab) z zawartością pO₂ poniżej 1 ppm przez 24 h. W celu analizy niskocząsteczkowych produktów redukcji biokoniugatu, po 24 h reakcji, białko oddzielono metodą ultrafiltracji (cut-off, 30 kDa, Amicon) a następnie przesącz analizowano na kolumnie BioBasic SEC 300 analogiczną metodą jak opisana powyżej (λ_{ex} 490 nm / λ_{em} 570 nm).

3.4.4 Wyznaczanie limitu detekcji NTR

Celem określenia granicy wykrywalności NTR w badanym układzie, zmierzono zależne od czasu widma fluorescencyjne (wzbudzeniu przy maksimum absorpcji dla każdej sondy) dla różnych stężeniach NTR (0 - 7,2 μg/mL) w buforze TRIS/HCl (pH = 7,4 37°C) przy końcowych stężeniach związku i NADH odpowiednio 16 μM oraz 160 μM. Granicę wykrywalności określono również dla badanego biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** (3,3 μM), stosując stężenia NTR w zakresie 0-30 μg/ml w obecności NADH (400 μM).

Eksperymenty powtórzone trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako wartości średniej intensywności fluorescencji po osiągnięciu plato wraz z odchyleniami standardowymi średniej. Wykreślono zależność intensywności fluorescencji w maksimum w funkcji stężenia NTR. Granicę wykrywalności (LOD) obliczono z równania:

$$LOD = 3s/S$$

Gdzie: σ -odchylenie standardowe ślepych pomiarów (na podstawie analizy 11 próbek), S - współczynnik nachylenia krzywej regresji.

3.4.5 Inhibicja nitroreduktazy

Hamowanie aktywności nitroreduktazy przez dikumarol (Sigma-Aldrich) zbadano, stosując jego różne stężenia (0-200 mM) podczas reakcji sond z NTR w buforze TRIS-HCl pH 7,4 w 37°C. Końcowe stężenia sondy, NADH oraz enzymu utrzymywano na stałym poziomie, odpowiednio 16 μ M, 160 μ M, 2,4 μ g/ml. Pomiar kinetyczny intensywności fluorescencji przeprowadzono przy użyciu spektrofluorymetru ($\lambda_{ex/em} = 447\text{nm}/538\text{ nm}$).

3.4.6 Wpływ potencjalnych interferentów na redukcję sond

Wpływ różnych klas związków występujących w środowisku zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowym na redukcję sond zbadano, monitorując zmiany intensywności fluorescencji ($\lambda_{ex/em} = 447\text{nm}/535\text{ nm}$) w ich obecności. W tym celu inkubowano badane sondy (5 μ M) w buforze TRIS-HCl pH 7,4 w 37°C w obecności różnych reduktorów: NADH (150 μ M), GSH (1 mM), witamina C (1 mM), Cys (1 mM); utleniaczy: H₂O₂ (1 mM); soli: NaCl (1 mM), KCl (1 mM), CaCl₂ (1 mM), MgCl₂ (1 mM), aminokwasów: Arg (1mM), Lys (1 mM); glukozy (1 mM); ksantyny (150 μ M) z oksydoreduktazą ksantynową (XOR, 0,01U/ml); NADH (150 μ M) z oksydoreduktazą ksantynową (XOR, 0,01U/ml) oraz NADH (150 μ M) z nitroreduktazę (NTR, 2,4 μ g/ml). Wszystkie dane zebrano 30 min po zmieszaniu reagentów i inkubacji w 37°C.

3.5 Redukcja sond przez nitroreduktazę typu II

Jako źródło nitroreduktazy typu II, wrażliwej na warunki tlenowe zastosowano szczurze mikrosomy wątrobowe (Sigma-Aldrich M9066). Standardowo reakcję redukcji sond prowadzono w 50 mM buforze TRIS-HCl pH 7,4 w temperaturze 37°C z końcowymi stężeniami wynoszącymi 16 μ M sondy, 1 mM NADH i 1 mg/ml mikrosomów wątrobowych. Reakcję prowadzono przez 3 lub 6 godzin i) w warunkach równowagi z powietrzem, ii) w komorze do hipoksji, w której utrzymywano 1% pO₂ oraz iii) w komorze beztlenowej

„glovebox” (Inert, I-Lab) o zawartości pO_2 poniżej 1 ppm. Postęp redukcji i identyfikację produktów reakcji określono za pomocą HPLC analogiczną metodą jak w przypadku redukcji przez nitroreduktazę typu I, z tą różnicą, iż przed nastrzykiem, próbki zwirowano (10000 obrotów/min, 5 min) w celu oddzielenia frakcji białkowej. Równocześnie zmierzono fluorescencję roztworu po redukcji, wykorzystując czytnik mikroplatek Infinite M200 (Tecan) ($\lambda_{ex} = 466$ nm).

Analogiczne badania przeprowadzono dla biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂**. Typowe warunki redukcji obejmowały 3,3 μ M **holo-Tf-3-NO₂**, 1 mM NADH i 1 mg/ml mikrosomów wątrobowych, reakcję prowadzono w 50 mM buforze TRIS-HCl pH 7,4 w temperaturze 37°C przez 6 godzin. Reakcję prowadzono w warunkach równowagi z powietrzem oraz komorze beztlenowej „glovebox”. Przebieg redukcji kontrolowano za pomocą czytnika płytek Infinite M200, monitorując widma emisyjne ($\lambda_{ex} = 450$ nm) oraz za pomocą HPLC metodą analogiczną jak dla nieskoniugowanych sond.

3.6 Oznaczenie poziomu RFT w roztworze

Generowanie reaktywnych form tlenu (RFT) analizowano za pomocą sond fluorescencyjnych, czułych na dany typ RFT. Pomiar fluorescencyjny przeprowadzono w temperaturze pokojowej przy użyciu spektrofluorymetru PerkinElmer LS55. Kuvetę zawierającą odpowiednią sondę fluorescencyjną i 1 μ M roztwór kompleksu Ru(II) w buforze Tris/HCl pH 7,4 naświetlano lampą ksenonową spektrofluorymetru przy długości fali odpowiadającej maksimum pasma MLCT (**Ru4** - 530 nm, **Ru5** - 528 nm, **Ru6** - 570 nm). Zastosowaną dawkę światła zmierzono za pomocą dozymetru światła Nova II (Ophir). Po naświetleniu zmierzono widmo fluorescencyjne sondy. Każdorazowo wykonywano pomiary próbki ślepej bez kompleksów Ru(II) w celu kontroli stabilności sondy podczas naświetlania. Badane kompleksy Ru nie były luminescencyjne, więc nie wykonywano korekcji związanej z potencjalną emisją związku Ru(II). Każdy eksperyment powtórzono co najmniej trzy razy.

Do oznaczenia fotoprodukcji anionorodnika ponadtlenkowego w roztworze przez kompleksy Ru(II) zastosowano dihydroetydynę (HE, 2,5 μ M). Sonda ta reaguje z reaktywnymi formami tlenu, głównie $O_2^{\cdot-}$, utleniając się do związku, który w obecności DNA staje się wysoce fluorescencyjny. Widmo emisji fluorescencji rejestrowano w obecności 250 μ M DNA, przy długości fali wzbudzenia 520 nm w zakresie od 550 do 750 nm. W celu ilościowego określenia produkcji $O_2^{\cdot-}$ użyto układu ksantyna/oksydaza ksantynowa w połączeniu z ferrytochromem C do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej.

Oksydaza ksantynowa jest enzymem, który katalizuje utlenianie ksantyny do kwasu moczowego z jednoczesną redukcją tlenu i tworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego [179]. Anionorodnik ponadtlenkowy redukuje żelazo(III) w centrum żelazo-hemowym cytochromu C do Fe(II) zgodnie ze stechiometrią 1:1. Stężenie zredukowanego cytochromu C określono metodą spektroskopii absorpcyjnej z wykorzystaniem molowego współczynnika absorpcji przy 550 nm dla różnicy między zredukowanym, a utlenionym cytochromem C ($21.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [180]. Efektywność redukcji tlenu/wytwarzania $\text{O}_2^{\cdot-}$ przez oksydazę ksantynową zależy od warunków eksperymentu, głównie od pH i stężenia tlenu [181,182]. Aby określić skuteczność redukcji tlenu przez oksydazę ksantynową, monitorowano redukcję cytochromu C ($10 \mu\text{M}$) w obecności oksydazy ksantynowej ($0,004 \text{ U/ml}$) i wzrastającego stężenia ksantyny. Następnie zmierzono wpływ układu oksydaza ksantynowa/ksantyna na intensywność fluorescencji HE ($2,5 \mu\text{M}$) i poprzez odniesienie zmian intensywności fluorescencji sondy do rzeczywistego stężenia $\text{O}_2^{\cdot-}$ uzyskano krzywą kalibracji.

Wytwarzanie rodników hydroksylowych ($\cdot\text{OH}$) wykrywano przy użyciu aminofenylfluoresceiny (APF, $2,5 \mu\text{M}$), która jest wrażliwa na $\cdot\text{OH}$, ONOO^- i ^-OCl i wytwarza silnie fluorescencyjny produkt po utlenieniu. Sonda ta była wzbudzana przy 490 nm i rejestrowano widmo między 500 – 650 nm. W celu ilościowego określenia poziomu $\cdot\text{OH}$ wykorzystano reakcję Fentona, która polega na generowaniu rodników hydroksylowych z H_2O_2 w obecności jonów Fe(II). W tym celu roztwór zawierający HE ($2,5 \mu\text{M}$) oraz H_2O_2 (1 mM) miareczkowano FeSO_4 ($0\text{--}110 \mu\text{M}$).

3.7 Wpływ ludzkiej albuminy surowiczej na właściwości fluorescencyjne sond

Stężony roztwór podstawowy białka sporządzono poprzez rozpuszczenie albuminy surowicy ludzkiej (HSA) w wodzie, a jego stężenie określono spektrofotometrycznie stosując prawo Lamberta-Beera ($\epsilon_{280\text{nm}} = 4,4 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$).

Wpływ albuminy na fluorescencję sond badano mierząc widma fluorescencji roztworu związków ($5 \mu\text{M}$) w obecności różnych ilości HSA ($0\text{--}67 \mu\text{M}$) w 50 mM buforze TRIS-HCl pH 7,4. Widma emisyjne rejestrowano między 480 a 800 nm po wzbudzeniu przy maksimum absorpcji odpowiednim dla każdej sondy. Eksperyment wiązania związku do białka przeprowadzono poprzez rejestrację widm fluorescencyjnych roztworu białka ($1 \mu\text{M}$) w obecności różnych stężeń związku ($0\text{--}7,5 \mu\text{M}$) w buforze TRIS-Cl (50 mM pH 7,4) w temperaturze 37°C .

Przed każdym pomiarem widm emisyjnych badane roztwory inkubowano przez 5 min w temperaturze 37°C. Widma emisyjne rejestrowano po wzbudzeniu przy 295 nm, co skutkuje selektywnym wzbudzeniem reszty tryptofanu [178,183]. Eksperymenty powtórzone trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi średniej.

Wpływ HSA na redukcję sond scharakteryzowano z wykorzystaniem sączenia molekularnego. Redukcję sond (16 µM) prowadzono w 50 mM buforze TRIS-HCl pH 7,4 w temperaturze 37°C w obecności 160 µM NADH, 2,4 µg/ml NTR oraz 16 µM HSA. Standardowo po 1 godzinie inkubacji mieszaninę poddano rozdzielni HPLC prowadzonej na kolumnie BioBasic SEC 300, w temperaturze 25°C, stosując fazę ruchomą roztwór 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃ (czas rozdzielni 10 min) przy szybkości przepływu 0,35 ml/min. Chromatogramy rejestrowano przy użyciu detektora DAD (280 nm oraz 447 nm) oraz fluorescencyjnego (λ_{ex} 490 nm i λ_{em} 550 nm). Zbadano również zależność intensywności fluorescencji od stężenia nitroreduktazy (NTR) oraz czasu trwania redukcji.

3.8 Badania *in vitro*

3.8.1 Hodowle komórkowe

Hodowlę komórkową prowadzono w warunkach sterylnych, w jednorazowych naczyniach hodowlanych, zapewniając stałą wilgotność powietrza, temperaturę 37°C. Standardowo komórki hodowano w atmosferze tlenowej (21% O₂) zawierającej 5% CO₂. Komórki po osiągnięciu konfluencji regularnie pasażowano zgodnie ze standardowymi procedurami aseptycznymi.

- Komórki linii **A2058** (linia komórkowa ludzkiego czerniaka o wysokim potencjale metastatycznym) oraz **MCF-7** (linia komórkowa estrogenozależnego raka piersi) hodowano w pożywce EMEM suplementowanej 2 mM glutaminą, 1% *Non-Essential Amino Acids* (NEAA) (v/v), 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) (v/v) i 1% roztworem penicyliny/streptomycyny (100 jednostek/ml - 100 µg/ml) (v/v).

- Komórki linii **A375** (linia komórkowa ludzkiego czerniaka o niskim potencjale metastatycznym) hodowano w pożywce DMEM, uzupełnionej 2 mM glutaminą, 15% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i 1% roztworem penicyliny/streptomycyny (100 jednostek/ml-100 µg/ml) (v/v).
- Komórki linii **HT-29** (linia komórkowa ludzkiego gruczolaka okrężnicy) hodowano w pożywce McCoy's 5A, uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i 1% roztworem penicyliny/streptomycyny (100 jednostek/ml-100 µg/ml) (v/v).
- Komórki linii **CT26** (linia komórkowa mysiego raka okrężnicy), **A549** (ludzka linia komórkowa gruczolaka płuc) oraz **PANC-1** (linia komórkowa ludzkiego raka trzustki) hodowano w pożywce DMEM, uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i 1% roztworem penicyliny/streptomycyny (100 jednostek/ml -100 µg/ml) (v/v).
- Komórki linii **HMEC-1** (linia komórkowa śródbłonna mikronaczyniowego) hodowano w pożywce MCDB131, z dodatkiem 1 µg/ml hydrokortyzonu, 10 mM glutaminy, 10 ng/ml epidermalnego czynnika wzrostu (EGF), 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) (v/v) oraz 1% roztworu penicyliny/streptomycyny (100 jednostek/ml-100 µg/ml) (v/v).
- Komórki linii **HaCaT** (nienowotworogenna, unieśmierteliona linia komórkowa ludzkich keratynocytów) hodowano w medium DMEM z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) (v/v) i 1% roztworem penicyliny/streptomycyny (100 jednostek/ml - 100 µg/ml) (v/v).

W celu utrzymania warunków hipoksji, niezbędnych do badań wykorzystano specjalną komorę do hipoksji (Coy) wypełnioną mieszaniną gazów zawierającą 94% N₂, 5% CO₂ i 1% O₂ oraz dodatkowo nawilżaną i ogrzewaną do temperatury 37°C. Do badań przeprowadzanych w warunkach hipoksji komórki wysiewano w sterylnych, tlenowych warunkach, a następnie przenoszono do hipoksycznej komory na co najmniej 24-godzinną preinkubację. Pożywkę przeznaczoną do użycia w eksperymentach z hipoksją również

wstępnie inkubowano w komorze do hipoksji przez co najmniej 24 godziny. Alternatywnie, w celu chemicznego wywołania niedotlenienia komórki inkubowano z 200 μM desferokysaminy (DFO) lub 400 μM CoCl_2 24 godziny przed docelowym eksperymentem.

3.8.2 Ocena cytotoksyczności

W celu oceny żywotności komórek po traktowaniu ich badanymi sondami, biokoniugatem holo-Tf lub kompleksami Ru(II) wykonano testy przeżywalności z wykorzystaniem soli tetrazolowej (test MTT) lub resazuryny (test AlamarBlue). W obu przypadkach komórki wysiano na 96-dółkową płytkę z gęstością 3×10^4 komórek/ cm^2 w pełnej pożywce i hodowano 24 h. Następnie komórki traktowano roztworami badanych sond lub kompleksów Ru(II) w różnym zakresie stężeń. Roztwory wyjściowe badanych związków przygotowano w DMSO, a następnie dodano do pożywki bez FBS w celu uzyskania końcowych stężeń. Końcowe stężenie DMSO utrzymywano na stałym poziomie 0,1% - 0,5% (v/v), w zależności od rozpuszczalności związków w roztworze wodnym. Po 24 godzinach inkubacji usunięto roztwór z nad komórek, przemyto je buforem PBS, a następnie przeprowadzono testy żywotności MTT lub test resazuryny. W tym celu do każdego dołka dodano 100 μl roztworu MTT (0,5 mg/ml) lub resazuryny (50 μM) i inkubowano w warunkach hodowlanych 3 h. Następnie, w przypadku testu MTT usunięto roztwór z nad komórek, a powstałe kryształy formazanu rozpuszczano w 100 μl mieszaniny metanolu i DMSO (1:1 v/v). Żywotność komórek określono na podstawie absorbancji przy długości fali 565 nm z uwzględnieniem długości fali referencyjnej 700 nm z wykorzystaniem czytnika płytek Infinite M200 (Tecan). W przypadku przeprowadzenia testu resazuryny po określonym czasie inkubacji zmierzono intensywność fluorescencji na czytniku płytek Infinite M200 (Tecan), przy długości 605 nm, przy użyciu światła wzbudzającego 560 nm. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, z trójkrotnym powtórzeniem w każdej z serii. Żywotność komórek znormalizowano względem kontroli. Wartość IC_{50} określono za pomocą równania Hill'a przy użyciu programu OriginPro (OriginPro 2018,2020).

$$y = y_0 + \frac{(y_{100} - y_0)[c]^H}{[\text{IC}_{50}]^H + [c]^H}$$

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie oraz błąd standardowy średniej.

3.8.3 Ocena fotocytotoksyczności

W celu określenia fotocytotoksyczności związków przeprowadzono analogiczny eksperyment do cytotoksyczności. Komórki wstępnie inkubowano 24 h z badanymi związkami, a następnie przemyto buforem PBS i naświetlano monochromatycznym światłem niebieskim (465 nm, 7,35 mW/cm²) przez dany czas do osiągnięcia określonej dawki światła. Po naświetleniu komórki inkubowano w świeżej, kompletnej pożywce przez 24 godziny, a następnie przeprowadzono test żywotności (AlamarBlue). Wartości IC₅₀ uzyskane po naświetleniu oznaczono jako IC₅₀^{hv}. Dla sond fluorescencyjnych niewykazujących efektu fotocytotoksycznego przedstawiono znormalizowaną do kontroli fluorescencję. Oceniono również odpowiedni efekt pochodzący z samego naświetlania komórek bez obecności związku. Utrata komórek wynosiła mniej niż 1%. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych z minimum trójrotnym powtórzeniem w każdej z serii. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie oraz błąd standardowy średniej. Parametry IC₅₀ wyznaczono za pomocą równania Hill'a (OriginPro 2020).

3.8.4 Ocena fotostabilności w komórkach

Fotostabilność związków *in vitro* przeprowadzono, wysiewając na 96-dółkową płytkę komórki nowotworowe z gęstością 3×10^4 komórek/cm² w pełnej pożywce. Po upływie 24 h pożywkę zastąpiono roztworami badanych związków w medium bez surowicy i poddano 24-godzinnej inkubacji. Po tym czasie usunięto medium znad komórek, przepłukano buforem PBS i naświetlano monochromatycznym światłem niebieskim (465 nm, 7,35 mW/cm²) uzyskując dawkę światła w zakresie 2,2-13,2 J/cm². Po naświetleniu określoną dawką światła monitorowano intensywność maksimum absorbancji oraz fluorescencji ($\lambda_{\text{ex}} = 447$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm) za pomocą czytnika mikropłytek Tecan Infinite 200. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych z trójrotnym powtórzeniem w każdej z serii. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie oraz błąd standardowy średniej.

3.8.5 Ocena akumulacji

Akumulację sond w komórkach nowotworowych w zależności o stężenia oraz czasu inkubacji przeprowadzono z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Komórki nowotworowe wysiano na 24-dółkową płytkę z gęstością 3×10^4 komórek/cm² w pełnej pożywce i hodowano przez 24 godziny. Następnie pożywkę usunięto, a komórki traktowano

różnymi stężeniami związków w pożywce bez serum przez określony czas (10 min - 72 godziny). Po tym czasie, komórki przemyto buforem PBS, oderwano za pomocą trypsyny, dwukrotnie zwirowano (1000 obrotów/min, 5 min) i analizowano metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem cytometru BD FACSVersé ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 527 \pm 16 \text{ nm}$ lub $\lambda_{\text{em}} = 700 \pm 27 \text{ nm}$). Eksperyment przeprowadzono trzy razy, przedstawiono wartości średnie wraz z błędem standardowym średniej. Pomiary na cytometrze przepływowym były prowadzone przez dr Olę Mazuryk, natomiast przygotowanie próbek oraz analiza wyników były wykonywane przeze mnie.

Akumulację biokoniugatu holo-Tf z przyłączoną sondą (**holo-Tf-3-NO₂**) w zależności od stężenia oraz czasu inkubacji oceniono wykorzystując czytnik mikroplętek Tecan Infinite 200. Komórki A2058 wysiano na 96-studzienkową płytkę o gęstości 3×10^4 komórek/cm² w pełnej pożywce 24 godziny przed eksperymentem. Po tym czasie pożywkę usunięto, a komórki traktowano różnymi stężeniami **holo-Tf-3-NO₂** w pożywce podstawowej uzupełnionej 20 mM glukozą przez różne okresy (1 h – 24 h) w warunkach normoksji. Następnie komórki przemyto PBS i zmierzono fluorescencję przy użyciu czytnika mikroplętek Tecan Infinite 200 ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$). Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych z trójrotnym powtórzeniem w każdej serii. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie i błąd standardowy średniej.

Do oceny akumulacji kompleksów Ru(II) w komórkach nowotworowych wykorzystano metodę ICP-MS. Komórki wysiano z gęstością 3×10^4 komórek/cm² na 6-dołkowej płytce w pełnej pożywce. Po 24 godzinach usunięto medium, a komórki poddano 24 godzinnej inkubacji z kompleksami Ru(II) o różnym stężeniu w pożywce podstawowej. Po tym czasie komórki przemyto buforem PBS, oderwano poprzez trypsynizację i policzono. Określoną ilość komórek odwirowano (1000 obrotów/min, 5 min) i poddano mineralizacji stężonym kwasem azotowym(V) w temperaturze pokojowej przez dobę. Roztwory rozcieńczono wodą (klasy Millipore) do końcowego stężenia kwasu azotowego(V) poniżej 1%. Próbkę analizowano za pomocą spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS, NexION 2000C, Perkin Elmer). Wyniki obliczono jako stężenie Ru na pojedynczą komórkę. Eksperymenty powtórzono trzy razy, a wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym średniej.

3.8.6 Ocena poziomu ekspresji nitroreduktazy

Poziom ekspresji nitroreduktazy w komórkach A2058 w warunkach niedotlenienia oceniono w lizatach komórkowych za pomocą testu Human Nitroreductase ELISA Kit (MyBioSource). Komórki linii A2058 wysiano do naczyń hodowlanych o powierzchni 75 cm² z gęstością 3×10^4 komórek/cm² i hodowano 24 h w atmosferze tlenowej (21% O₂), w warunkach hipoksji (1% O₂) lub w obecności 200 μM DFO. Po tym czasie komórki przemyto, oderwano trypsyną, odwirowano, zliczono i poddano lizie z wykorzystaniem 1% Triton-X 100 w PBS. Lizaty inkubowano na lodzie przez 30 min, a następnie odwirowywano (13000 obrotów/ min, 20 min, 4°C) i w supernatancie oznaczono stężenia białka metodą Bradford. Roztwory albuminy z surowicy bydłowej zastosowano jako wzorce. Test ELISA przeprowadzono zgodnie z procedurą producenta. Eksperymenty przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, aby uzyskać wartości średnie i błąd standardowy średniej.

3.8.7 Detekcja nitroreduktazy w komórkach za pomocą sond

Zdolność badanych sond do rozróżnienia komórek hodowanych w warunkach normoksji oraz hipoksji oceniono poprzez wysianie komórek A2058 na 24-dołkową płytkę z gęstością 3×10^4 komórek/cm² i inkubowano 24 godziny w warunkach normoksji lub hipoksji. Alternatywnie, komórki hodowane w normoksji inkubowano z deferoksamina (200 μM) przez różny czas (4, 6, 18 lub 24 godziny). W następnym kroku komórki inkubowano z sondami przez 2 godziny (wciąż w warunkach niedotlenienia lub normoksji), a następnie komórki przemyto buforem PBS, oddzielono przez traktowanie trypsyną i analizowano za pomocą cytometru BD Versa ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Analogicznie przebadano potencjał biokoniugatu sondy z holo-transferyną do detekcji niedotlenienia. W tym celu komórki A2058 wysiano na 6-dołkową płytkę o gęstości $1,5 \times 10^4$ komórek/cm² w pełnej pożywce i hodowano przez 24 godziny w warunkach normoksji (21% O₂) lub niedotlenienia (1% O₂). Następnie usunięto kompletną pożywkę i komórki inkubowano z **holo-Tf-3-NO₂** (0,6 μM lub 1,2 μM) w pożywce podstawowej suplementowanej 20 mM glukozą przez 2 lub 4 h (wciąż w warunkach niedotlenienia lub normoksji). Następnie komórki przemyto buforem PBS, a po oderwaniu trypsyną komórki zawieszono w buforze PBS i analizowano przy użyciu cytometru BD FACS Verse ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

W celu zbadania potencjału sondy **2-NO₂** do rozróżnienia komórek hipoksycznych dla różnych nowotworowych linii komórkowych przeprowadzono analogiczne badania jak powyżej. Komórki wysiano na 6-dołkową płytkę o gęstości $1,5 \times 10^4$ komórek/cm² w pełnej pożywce i hodowano przez 24 godziny w warunkach normoksji (21% O₂) lub niedotlenienia (1% O₂). Dodatkowo komórki hodowano w normoksji z deferoksamina (200 μM) lub CoCl₂ (400 μM) przez 24 godziny. Po tym czasie komórki inkubowano 4 godziny z sondą **2-NO₂** (4 μM) (wciąż w warunkach niedotlenienia lub normoksji). Następnie komórki przemyto buforem PBS, oderwano trypsyną i analizowano przy użyciu cytometru BD FACS Verse ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Pomiary na cytometrze przepływowym były prowadzone przez dr Olę Mazuryk, natomiast przygotowanie próbek oraz analiza wyników były wykonywane przez mnie. Eksperyment przeprowadzono trójrotnie. Przedstawiono wartości średnie wraz z błędem standardowym średniej. Fluorescencję komórek znormalizowano względem komórek hodowanych w warunkach normoksji.

Komórki obrazowano również za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Zdjęcia fluorescencyjne komórek wykonywano przy użyciu mikroskopu Olympus IX83 wyposażonego w komorę zapewniającą odpowiednie warunki temperatury, wilgotności i stężenia CO₂ (Incubation System cellVivo PECON) ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \pm 20 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \pm 25$). Zdjęcia zostały wykonane przez dr Olę Mazuryk.

3.8.8 Oznaczanie poziomu ekspresji HIF-1 α oraz enzymów oksydoredukcyjnych metodą Western Blot

Poziom ekspresji białka odpowiedzialnego za główne zmiany metaboliczne komórki narażonej na stan niedotlenienia – HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor - 1 α) oraz szeregu enzymów oksydoredukcyjnych posiadających potencjał do redukcji związków nitrowych (reduktaza cytochromu P450, cytochrom C, dehydrogenaza NAD(P)H chinonowa 1, reduktaza cytochromu b5, oksydoreduktaza ksantynowa) określono w lizatach wybranych linii komórkowych (A375, A2058, MCF-7, PANC-1, HT-29, A549) metodą Western Blot. Komórki wysiano do naczyń hodowlanych o powierzchni 25 cm² z gęstością sugerowaną dla danej linii komórkowej i hodowano 24 h w warunkach normoksji (21% O₂), hipoksji (1% O₂) lub w obecności 200 μM DFO albo 400 μM CoCl₂ przez 24 h, w celu chemicznej indukcji niedotlenienia. Po tym czasie komórki przemyto, oderwano trypsyną, odwirowano, zliczono i poddano lizie z wykorzystaniem buforu RIPA zawierającym roztwór inhibitorów proteazy i fosfatazy (Halt proteases inhibitor cocktail - Thermo Fisher Scientific).

Lizaty inkubowano na lodzie przez 30 min, następnie odwirowywano, a w supernatancie oznaczono stężenia białka metodą Bradford. Roztwory albuminy z surowicy bydlęcej zastosowano jako wzorce. W celu denaturacji białka lizaty komórkowe mieszano z buforem denaturująco-obciążającym (0,125 M TRIS o pH 6,8, 2,5% glicerol, b-merkaptioetanol, 5% SDS) i inkubowano przez 5 min w 95°C. Białka rozdzielano na 12% żelu poliakrylamidowym (20 min, 60 V; 60 min 170 V) w warunkach denaturujących SDS/PAGE w temperaturze pokojowej przy użyciu aparatu Bio-Rad z zasilaczem PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad, Inc., Hercules, Kalifornia, USA). PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) został użyty jako marker do określenia przybliżonej masy cząsteczkowej rozdzielonych białek. W celu przeniesienia rozdzielonych białek z żelu na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF) przeprowadzono elektrotransfer na mokro (2 godziny/200mA, Bio-Rad, Inc., Hercules, CA, USA). Następnie membranę inkubowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka (w buforze TBS-Tween) przez 60 min w temperaturze pokojowej w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał. Następnie, błonę inkubowano przez noc w 4°C w roztworze zawierającym odpowiednie przeciwciało pierwszorzędowe (**Tabela 3.8.1**). Nadmiar przeciwciała płukano 3-krotnie przez 10 minut w TBS-Tween, a następnie błonę inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze odpowiedniego drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z peroksydazą chrzanową. Niezwiązane, specyficznie przeciwciała usunięto poprzez 3-krotne płukanie błony przez 10 min w TBS-Tween, a reaktywne białko wykrywano, wykorzystując reakcję chemiluminescencji przy użyciu zestawu do detekcji GE Healthcare Amersham™ ECLPrime Western Blotting (GE Healthcare Inc., Chicago, IL, USA). Dane zebrano za pomocą systemu obrazowania ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Inc., Hercules, CA, USA) i analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Image Lab v. 6.1.0 (Bio-Rad, Inc., Hercules, CA, USA). Wyniki normalizowano w stosunku do intensywności α -tubuliny. W celu oznaczenia kolejnego białka, błony wykorzystane uprzednio inkubowano w 0,2 M NaOH, aby oderwać związane przeciwciała, płukano 3 \times 15 min w TBS-Tween, a następnie używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych.

Tabela 3.8.1 Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych oznaczeń poziomu białek

Oznaczone białko	Masa molowa [kD]	Przeciwciało I-rzędowe		Przeciwciało II rzędowe	
Cytochrom C	15	Mysie, Monoklonalne przeciwciało Anty-cytochrom C (Santa Cruz Biotechnology sc-13156)	1:250 w 1% mleku w TBS-Tween	Kozie, anty-mysie przeciwciało (Thermo Fisher #G21040)	1:10000 w 1% mleku w TBS-Tween
Dehydrogenaza NAD(P)H chinonowa 1 (NQO1)	31	Mysie, Monoklonalne przeciwciało Anty-NQO1 (Santa Cruz Biotechnology sc-32793)	1:500 w 1% mleku w TBS-Tween	Kozie, anty-mysie przeciwciało (Thermo Fisher #G21040)	1:10000 w 1% mleku w TBS-Tween
α-tubulina	52	Mysie monoklonalne anty- α -tubulina przeciwciało (Bio-Rad VMA00051)	1:1000 w 1% mleku w TBS-Tween	Kozie, anty-mysie przeciwciało (Thermo Fisher #G21040)	1:10000 w 1% mleku w TBS-Tween
Reduktaza cytochromu b5 (CYB5R)	59	Mysie, Monoklonalne przeciwciało Anty- CYB5R4 (Santa Cruz Biotechnology sc-390569)	1:500 w 1% mleku w TBS-Tween	Kozie, anty-mysie przeciwciało (Thermo Fisher #G21040)	1:10000 w 1% mleku w TBS-Tween
Reduktaza cytochromu P450 (CYPOR)	76	Mysie, Monoklonalne przeciwciało Anty-CYPOR (Santa Cruz Biotechnology sc-25270)	1:500 w 1% mleku w TBS-Tween	Kozie, anty-mysie przeciwciało (Thermo Fisher #G21040)	1:10000 w 1% mleku w TBS-Tween
HIF-1α – (Hypoxia Inducible Factor -1α)	92	Mysie, Monoklonalne przeciwciało Anty- HIF-1 α (Thermo Fisher # MA1-516)	1:1500 w 1% mleku w TBS-Tween	Kozie, anty-mysie przeciwciało (Thermo Fisher #G21040)	1:10000 w 1% mleku w TBS-Tween
Oksydoreduktaza ksantynowa (XOR)	150	Mysie, Monoklonalne przeciwciało Anty-XOR (Santa Cruz Biotechnology sc-398548)	1:100 w 1% mleku w TBS-Tween	Kozie, anty-mysie przeciwciało (Thermo Fisher #G21040)	1:10000 w 1% mleku w TBS-Tween

3.8.9 Ocena poziomu zahamowania wychwytu biokoniugatu przez receptor transferyny (TfR)

Mechanizm wychwytu koniugatu **holo-Tf-3-NO₂** oraz komercyjnie dostępnego koniugatu holo-transferyny ludzkiej z barwnikiem Alexa Fluor™488, **Tf-AF488** (TermoFisher) przez receptor transferyny (TfR) oceniano poprzez zablokowanie TfR za pomocą inhibitora – ferrystatyną II (Chlorazol Black, Sigma-Aldrich). Wstępne badania dotyczące wyznaczenia IC₅₀ dla ferrystatyny II przeprowadzono z koniugatem Tf-AF488. Komórki A2058 wysiano na 96-dołkową płytkę z gęstością 3×10^4 komórek/cm² w pełnym medium 24 godziny przed eksperymentami. Ferrystatynę II rozpuszczono w pożywce podstawowej z dodatkiem 20 mM glukozy i inkubowano z komórkami 24 h w różnych stężeniach. Po tym czasie komórki inkubowano przez 15 minut zarówno z **Tf-AF488** (0,6 lub 1,2 μM), jak i ferrystatyną II, następnie przemyto i zmierzono fluorescencję przy użyciu czytnika mikropłytek Tecan Infinite 200. Wartości IC₅₀ określono za pomocą równania Hill'a (OriginPro 2020).

Aby ocenić wpływ wychwytu za pomocą receptorów transferyny na akumulację **holo-Tf-3-NO₂** w komórkach, komórki A2058 wysiano na 96-dołkową płytkę z gęstością 3×10^4 komórek/cm² dzień przed eksperymentem. Następnie dodano 100 μM ferrystatyny II (inhibitora TfR1) rozpuszczonej w pożywce podstawowej uzupełnionej 20 mM glukozą i inkubowano przez 24 h. Po tym czasie pożywkę usunięto i dodano biokoniugaty **Tf-AF488** (0,6 lub 1,2 μM) lub **holo-Tf-3-NO₂** (2 lub 4 μM), a następnie inkubowano przez 4 godziny w pożywce podstawowej uzupełnionej 20 mM glukozy i 100 μM ferrystatyny II. Podobnie, oba biokoniugaty dodawano do komórek, które nie były preinkubowane z ferrystatyną II. Następnie inkubowane komórki przemywano PBS i wykonywano zdjęcia fluorescencyjne przy użyciu mikroskopu Olympus IX83 wyposażonego w komorę CellVivo ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \pm 20$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525 \pm 25$). Nietraktowane komórki były używane jako kontrola. Zdjęcia zostały wykonane przez dr Olę Mazuryk.

W eksperymencie dotyczącym wpływu natywnej holo-Tf na akumulację biokoniugatu komórki A2058 były przygotowane w taki sam sposób jak powyżej, a następnie traktowano je **holo-Tf-3-NO₂** (0,6 lub 1,2 μM) samodzielnie lub w obecności 10-krotnego nadmiaru holo-transferyny (6 lub 12 μM). Po 1 h inkubacji komórki przemywano PBS, a intensywność fluorescencji komórek oznaczano ilościowo przy długości fali 530 nm po wzbudzeniu przy 450 nm za pomocą czytnika płytek (Tecan Infinite 200). Nietraktowane komórki były używane jako kontrola.

3.8.10 Ocena poziomu zatrzymania biokoniugatu transferyny wewnątrz komórek

Aby ocenić szybkość usuwania sondy (w postaci biokoniugatu z transferyną lub wolnej sondy uwolnionej z biokoniugatu) z komórek, komórki A2058 wysiano na 6-dołkową płytkę o gęstości $1,5 \times 10^4$ komórek/cm² w pełnej pożywce i hodowano przez 24 godziny w normoksji (21% O₂) lub hipoksji (1% O₂). Następnie usunięto pełną pożywkę, a komórki inkubowano z **holo-Tf-3-NO₂** (0,6 μM lub 1,2 μM) w podstawowej pożywce z dodatkiem 20 mM glukozy przez 4 godziny. Następnie komórki przemyto buforem PBS i pozostawiono w nowej porcji buforu na określony czas po usunięciu sondy (0, 2, 4, 6 lub 24 h). Po tym czasie z nad komórek zebrano PBS, a komórki oderwano przez trypsynizację, zawieszono w buforze PBS i analizowano przy użyciu cytometru BD FACS Verse ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm). Supernatant komórkowy scharakteryzowano przy użyciu HPLC stosując kolumnę BioBasic SEC 300. Metoda rozdzielania: rozpuszczalnik: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃; szybkość przepływu 0,35 ml/min; czas rozdziału 15 min. Chromatogramy zarejestrowano stosując detektor fluorescencyjny ($\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm). Eksperyment przeprowadzono trzykrotnie i przedstawiono wartości średnie oraz błąd standardowy średniej.

3.8.11 Test odporności na trypsynizację

Wpływ kompleksów Ru(II) na zdolność komórek nowotworowych do oderwania od powierzchni podłoża oceniono sprawdzając ich odporność na działanie trypsyny. Komórki wysiano na 96-dołkową płytkę o gęstości 3×10^4 komórek/cm² w pełnym medium. Po upływie 24 godzin usunięto pożywkę z nad komórek, a komórki inkubowano z różnymi nietoksycznymi stężeniami kompleksów Ru(II) przez 24 godziny. Po tym czasie komórki przemyto, a następnie do każdego dołka dodano 30 μl roztworu trypsyny w stężeniach z zakresu 0,01 - 0,05% i inkubowano 5 lub 10 min w zależności od linii nowotworowej w warunkach hodowlanych. W kolejnym kroku komórki przemyto buforem PBS i przeprowadzono test żywotności resazuryny, w celu oceny ilościowej komórek adhezyjnych zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [184] oraz w **Rozdziale 3.8.2**. Aby wykluczyć możliwą toksyczność badanych kompleksów otrzymane wyniki znormalizowano względem odpowiadającym im próbką komórek inkubowanych z związkami rutenu, ale nie traktowanych trypsyną i przedstawiono jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych. W przypadku linii komórkowych czerniaka

doświadczenia przeprowadzono w warunkach normoksji i hipoksji. Eksperyment przeprowadzono w pięciu powtórzeniach biologicznych, z trójkrotnym powtórzeniem w każdej z serii w celu uzyskania wartości średnich i błędu standardowego średniej.

3.8.12 Test zdolności do re-adhezji

Wpływ badanych kompleksów na właściwości adhezyjne komórek nowotworowych został zbadany poprzez ocenę zdolności komórek traktowanych badanymi kompleksami Ru(II) do ponownej adhezji do podłoża. Komórki wysiano na 6-dołkowe płytki o gęstości 3×10^4 komórek/cm² w pełnej pożywce 24 godzin przed eksperymentem. Następnie pożywkę usunięto, dodano różne, nietoksyczne stężenia badanych kompleksów Ru(II) i inkubowano z komórkami przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie komórki przemyto buforem PBS, oderwano od podłoża nieenzymatycznym roztworem do dysocjacji komórek, zliczono i ponownie wysiano na 96-dołkową płytki z gęstością 6×10^4 komórek/cm². Płytki inkubowano przez 1 godzinę w warunkach hodowlanych, a następnie przemyto buforem PBS w celu usunięcia komórek, które nie uległy adhezji. W celu ilościowego określenia komórek adhezyjnych przeprowadzono test żywotności resazuryny zgodnie z procedurą opisaną w **Rozdziale 3.8.2**. W przypadku linii komórkowych czerniaka doświadczenia przeprowadzono w warunkach normoksji i hipoksji. Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a każdy eksperyment powtórzono pięć razy. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z błędem standardowej średniej.

3.8.13 Ocena migracji

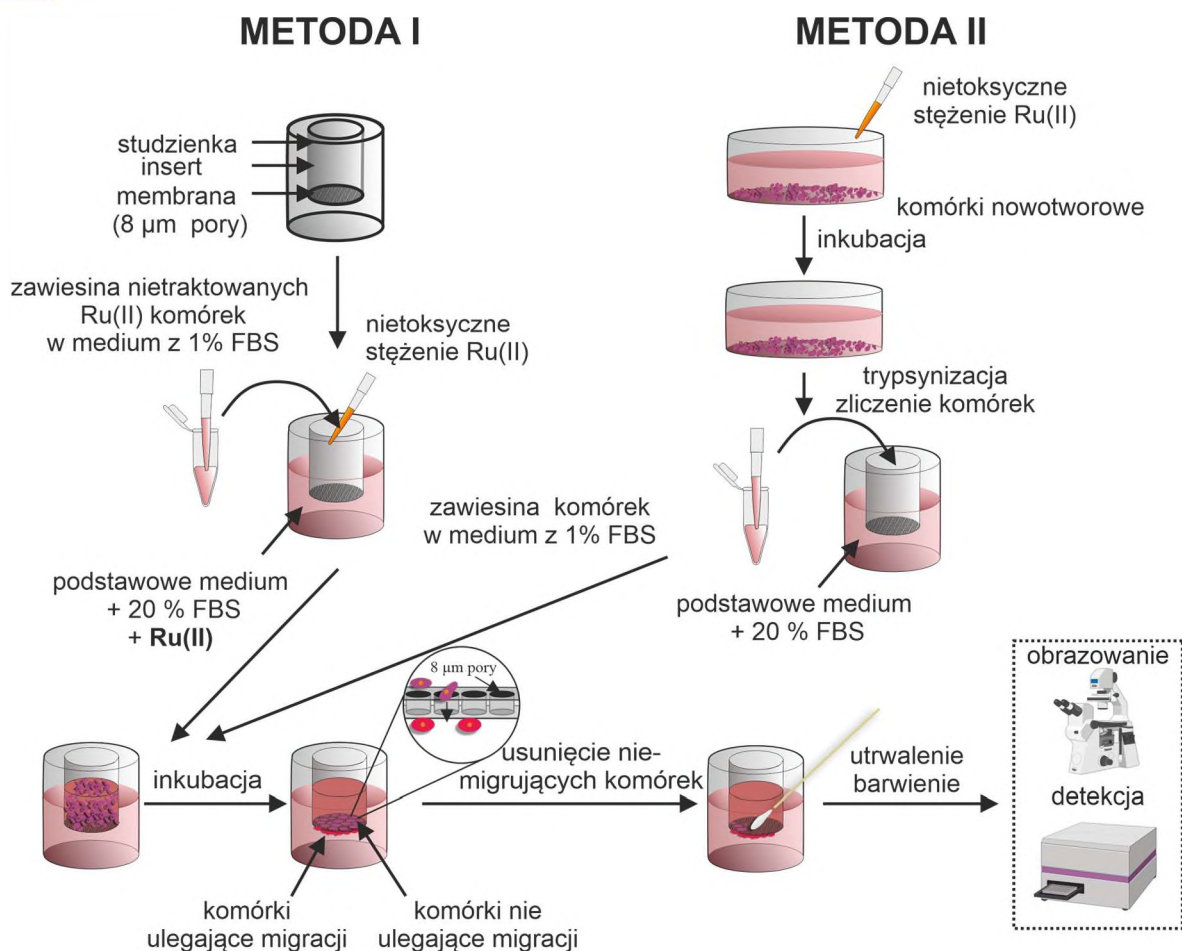
Zdolność komórek do migracji została oceniana z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych insertów z mikroporowatą membraną (Transwell, rozmiar porów 8 μm, Corning). 24 godziny przed eksperymentem komórki linii A2058 głodzono w pożywce pozbawionej surowicy, natomiast komórki linii A375 badano bez wcześniejszego przygotowania. Badania przeprowadzono dwoma metodami, a schemat przeprowadzenia eksperymentu przedstawiono na **Rysunku 3.8.1**. Eksperymenty przeprowadzono w warunkach normoksji i hipoksji.

Metoda 1: Bezpośrednia inkubacja komórek nowotworowych z kompleksami Ru(II) w insertach

Do insertów wprowadzono roztwór komórek zawierających 5×10^4 lub 1×10^5 komórek/insert odpowiednio dla linii komórkowej A375 oraz A2058 w medium podstawowym. Do studzienek 24-dołkowej płytki dodano pożywkę zawierającą 20% (v/v) FBS i umieszczono w nich inserty. Badane kompleksy rutenu(II) dodano w różnych, nietoksycznych stężeniach zarówno do insertów, jak i do studzienek płytki. Komórki inkubowano 16 godzin w 37°C. Po tym czasie usunięto medium z insertu, przemyto go buforem PBS, a następnie komórki na membranie utrwalono w 10% roztworze formaliny, po czym wybarwiono 0,5% fioletem krystalicznym. Komórki wewnątrz insertu, które nie uległy migracji, usunięto z górnej powierzchni membrany za pomocą patyczka kosmetycznego. Komórki migrujące, znajdujące się po zewnętrznej stronie insertu obrazowano z wykorzystaniem mikroskopii optycznej przy użyciu Olympus IX51. Dodatkowo fiolet krystaliczny rozpuszczono w metanolu i zmierzono absorbancje za pomocą czytnika mikroplitek Tecan Infinite200 przy długości fali 590 nm z uwzględnieniem długości fali referencyjnej 700 nm. Pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych z dwukrotnym powtórzeniem każdej próbki. Z otrzymanych wyników obliczono wartości średnie oraz odchylenia standardowe średniej. Wyniki przedstawiono jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych nietraktowanych związkami Ru(II).

Metoda 2: Wstępna akumulacja kompleksów Ru(II) w komórkach

Komórki wysiano na płytkach 6-dołkowych z gęstością 3×10^4 kom/cm² i hodowano 24 h w pełnym medium. Po tym czasie usunięto pożywkę, a komórki potraktowano różnymi, nietoksycznymi stężeniami kompleksów rutenu(II) w pożywce bez surowicy. Komórki inkubowano 24 godziny, a następnie przemyto, oderwano od podłoża przy użyciu trypsyny, zwirowano, policzono i wysiano do insertu z gęstością 5×10^4 lub 1×10^5 komórek/insert odpowiednio dla linii komórkowej A375 oraz A2058 w medium podstawowym. Inserty umieszczono w studzienkach 24-dołkowej płytki, do której uprzednio dodano pożywkę zawierającą 20% (v/v) FBS i inkubowano 16 h w warunkach hodowlanych. Dalsze etapy procedury były analogiczne jak w **Metodzie 1**.



Rysunek 3.8.1 Schemat procedury badania procesu migracji komórek z wykorzystaniem systemu Transwell z użyciem dwóch metod inkubacji komórek nowotworowych z badanymi kompleksami Ru(II).

3.8.14 Ocena inwazji

Zdolność komórek do inwazji została oceniana z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych insertów z mikroporowatą membraną (Transwell, rozmiar porów 8 μm , Corning), które przed eksperymentem pokryto Geltrex® (2 mg/ml, 2 h 37°C). Eksperymenty przeprowadzono w warunkach normoksji. Do insertów pokrytych usieciowaną macierzą Geltrex® wprowadzono roztwór komórek linii A375 zawierających 5×10^4 komórek/insert w pożywce bez FBS. Do studzienek 24-dołkowej płytki dodano pożywkę zawierającą 20% (v/v) FBS i umieszczono w nich inserty. Badane kompleksy rutenu(II) dodano w różnych, nietoksycznych stężeniach zarówno do insertów, jak i do studzienek płytki. Komórki inkubowano 16 godzin w 37°C. Następnie inserty przemyto buforem PBS, a komórki na membranie utrwalono w 10% formalinie, po czym wybarwiono 0,5% fioletem krystalicznym. W kolejnym kroku, komórki, które nie uległy inwazji, usunięto z górnej powierzchni membrany za pomocą patyczka kosmetycznego. Komórki inwazyjne, znajdujące się po zewnętrznej stronie insertu obrazowano z wykorzystaniem mikroskopii

optycznej przy użyciu Olympus IX51. Po wykonaniu zdjęć mikroskopowych fiolet krystaliczny rozpuszczono w metanolu i zmierzono absorbancje za pomocą czytnika mikroplętek Tecan Infinite200 przy długości fali 590 nm z uwzględnieniem długości fali referencyjnej 700 nm. Pomiarów wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych z dwukrotnym powtórzeniem każdej próbki. Z otrzymanych wyników obliczono wartości średnie oraz odchylenia standardowe średniej. Wyniki przedstawiono jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych nietraktowanych związkami Ru(II).

3.8.15 Ocena transmigracji

W celu oceny zdolności komórek do migracji przez monowarstwę komórek endotelialnych wykorzystano komercyjnie dostępne inserty z mikroporowatą membraną (Transwell, rozmiar porów 8 μm , Corning), które przed eksperymentem pokryto warstwą komórek śródbłonna. W tym celu komórki śródbłonna linii HMEC-1 wysiano do insertów z gęstością 3×10^4 komórek/insert i hodowano 24 godziny. Po tym czasie bezpośrednio przed rozpoczęciem eksperymentu komórki aktywowano TNF- α (czynnik martwicy nowotworów α) (10 $\mu\text{g/ml}$; 15 min). Równolegle komórki nowotworowe wysiano na 6-dołkową płytkę z gęstością 3×10^4 komórek/ cm^2 w pełnej pożywce. Po 24 godzinach pożywkę zastąpiono roztworami badanych kompleksów Ru(II) w różnych stężeniach i inkubowano z komórkami przez kolejne 24 godziny. Następnie komórki przemyto, oderwano od podłoża za pomocą trypsyny, zliczono i kolejno wybarwiono barwnikiem CellTracker Green CMFDA (dioctan 5-chlorometyfluoresceiny). Zawiesinę komórek nowotworowych wprowadzono do insertów pokrytych monowarstwą komórek endotelialnych w ilości 1×10^5 komórek/insert w pożywce bez FBS. Inserty umieszczono w studzienkach 24-dołkowej płytki, do której uprzednio wprowadzono pożywkę zawierającą 20% (v/v) FBS i inkubowano 16 h w warunkach hodowlanych. Po tym czasie inserty przepłukano buforem PBS, a niemigrujące komórki usunięto z górnej powierzchni membrany insertu za pomocą patyczka kosmetycznego. Komórki inwazyjne, znajdujące się po zewnętrznej stronie insertu obrazowano z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej przy użyciu Olympus IX51. Po wykonaniu zdjęć mikroskopowych, komórki znajdujące się na insertach poddano lizie z wykorzystaniem buforu RIPA. Otrzymane lizaty komórkowe scharakteryzowano mierząc fluorescencję za pomocą czytnika mikroplętek Tecan Infinite 200 ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$). Pomiarów wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych z dwukrotnym powtórzeniem każdej próbki.

Z otrzymanych wyników obliczono wartości średnie oraz odchylenia standardowe średniej. Wyniki przedstawiono jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych.

3.9 Analiza statystyczna

Przedstawione wyniki wyrażono jako wartość średnią i błąd standardowy średniej (SEM). Do analizy statystycznej istotności różnic między grupą kontrolną, a grupą eksperymentalną lub różnic między grupami wykorzystano test U Manna-Whitneya. Za istotne statystycznie przyjęto $p < 0,05$. (Statistica 13.3).

4 Wyniki i dyskusja

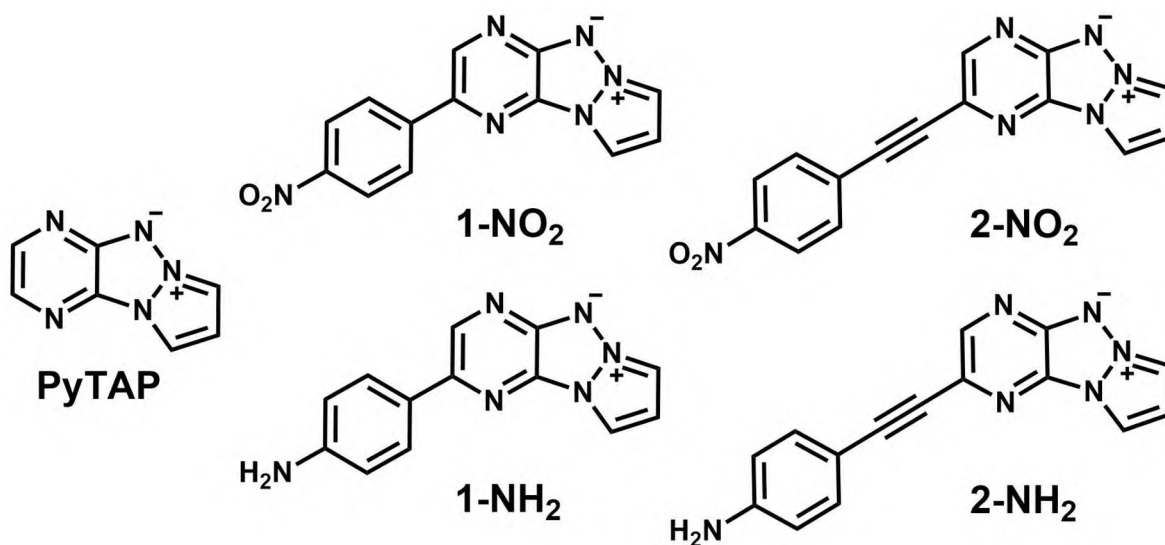
4.1 Zastosowanie sond fluorescencyjnych o rusztowaniu nitropirazynotriazapentalenowym do ilościowego oznaczania nitroreduktazy (NTR) oraz poziomu niedotlenienia w komórkach nowotworowych

Jednym z głównych mechanizmów adaptacyjnych komórek do niedotlenienia jest zmiana metabolizmu komórkowego z fosforylacji oksydacyjnej do glikolizy, co skutkuje zwiększoną produkcją NADH i zaburzeniem komórkowego potencjału redoks [42]. Powstanie bardziej redukującego środowiska w tkance niedotlenionej w porównaniu z normalnymi tkankami sprzyja nadekspresji wielu enzymów oksydoredukcyjnych, w tym nitroreduktaz (NTR) [43,44,78,80]. Określenie aktywności nitroreduktazy i skorelowanie jej z poziomem niedotlenienia wykorzystuje jedno z podejść w projektowaniu sond fluorescencyjnych monitorujących poziom hipoksji w guzach. Selektywna i nieodwracalna aktywacja sond jedynie w tkankach znajdujących się w stanie hipoksji charakteryzujących się podwyższonym poziomem nitroreduktaz może być skutecznym sposobem projektowania biomarkerów poziomu hipoksji. Umożliwiłoby to określenie stopnia zaawansowania stanu chorobowego i monitorowanie skuteczności leczenia oraz dalszych rokowań.

Niedawno odkryta, nowa klasa, sond fluorescencyjnych o niskich masach cząsteczkowych opartych na rusztowaniu pirazyno-1,3a,6a-triazapentalenu jest obiecującym narzędziem do zastosowań biomedycznych, w szczególności do obrazowania optycznego [185,186]. Skondensowana diazyna na pierścieniu triazapentalenowym przyczynia się do silnego przesunięcia batochromowego pasm emisji, a wysoka wydajność fluorescencji wraz z fotostabilnością, brakiem toksyczności i dużym przesunięciem Stokesa zwiększa atrakcyjność tej grupy związków jako fluoroforów do obrazowania optycznego. W świetle tych badań, we współpracy z grupą prof. Suzenet został zaprojektowany i zsyntezowany nowy typ sond niedotlenienia, sprzęgający fluorofor pirazyno-1,3a,6a-triazapentalenowy z selektywnym na hipoksję, bioredukcyjnym ugrupowaniem nitrofenylowym.

Ta część pracy dotyczy oceny właściwości fizykochemicznych i biologicznych dwóch sond fluorescencyjnych zawierających bioredukcyjną, nitroaromatyczną grupę połączoną z ugrupowaniem triazapentalenowym bezpośrednio lub poprzez łącznik alkilowy. Dodatkowo zbadany został również sam szkielet triazapentalenowy jako związek

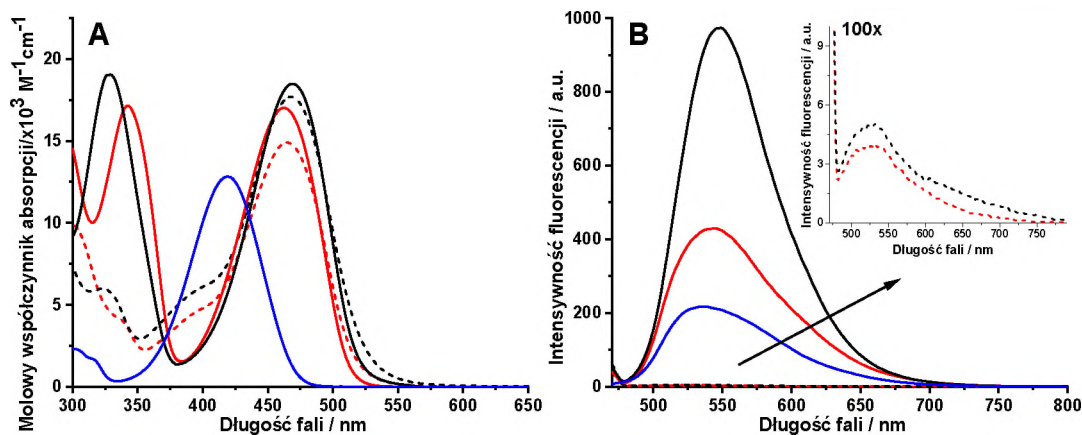
referencyjny oraz zredukowane odpowiedniki sond z grupą aminową, w celu oceny właściwości fotofizycznych oczekiwanych dla zredukowanych sond. Wszystkie badane związki zostały przedstawione na **Rysunku 4.1.1**. Badania sond fluorescencyjnych miały na celu wykazanie, możliwości rozróżnienia przy ich użyciu komórek nowotworowych hodowanych w warunkach niedotlenienia (hipoksji) od komórek hodowanych w warunkach stężenia tlenu zbliżonego do atmosferycznego (normoksja). Badania objęły również optymalizację warunków redukcji sond pod wpływem nitroreduktaz typu I (NTR I) oraz II (NTR II), a także detekcję i identyfikację produktów tej reakcji wraz z zaproponowaniem mechanizmu przebiegu reakcji dla enzymu NTR I. Poruszono również kwestie dotyczące wpływu białka (albuminy ludzkiej, HSA) na właściwości fotochemiczne oraz efektywność redukcji sond w jego obecności. Związki zostały zbadane w układzie *in vitro* pod kątem ich zastosowania jako detektorów stężenia nitroreduktazy w komórkach. Zbadano korelację pomiędzy nasileniem intensywności emisji sond a poziomem tlenu w środowisku komórkowym i jednocześnie poziomem ekspresji nitroreduktazy.



Rysunek 4.1.1 Wzory strukturalne badanych sond fluorescencyjnych (1-NO₂ oraz 2-NO₂), ich pochodnych aminowych (1-NH₂ oraz 2-NH₂) oraz związku referencyjnego (szkieletu pirazyno-1,3a,6a -triazapentalenu - PyTAP).

4.1.1 Charakterystyka spektralna

W pierwszym etapie badań przeanalizowano właściwości spektroskopowe wszystkich badanych związków. Widma absorpcyjne oraz emisyjne przedstawiono na **Rysunku 4.1.2**, a szczegółowe dane fotofizyczne zebrano w **Tabeli 4.1.1**.



Rysunek 4.1.2 Widma absorpcyjne UV-Vis (A) oraz emisyjne (B) dla **1-NO₂** (kolor czarny przerywany), **1-NH₂** (kolor czarny ciągły), **2-NO₂** (kolor czerwony przerywany), **2-NH₂** (kolor czerwony ciągły) oraz **PyTAP** (kolor niebieski ciągły) zarejestrowane w DMSO. Wzbudzenie przy maksimum absorpcji w widzialnym obszarze widma dla prezentowanych związków.

Tabela 4.1.1 Właściwości spektroskopowe badanych związków triazapentalenowych w DMSO oraz środowisku wodnym

	DMSO					H ₂ O			
	Absorbancja		Emisja			Absorbancja		Emisja	
	λ_{\max}^a [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{\max} [nm]	ϕ^b	τ [ns]	λ_{\max}^a [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{\max} [nm]	ϕ^b
1-NO₂	466	17900	541	0.0005	-	432	3700	-	-
1-NH₂	468	18200	546	0.76	6.65	447	17800	564	0.0021
2-NO₂	465	14500	541	0.00015	-	446	4600	-	-
2-NH₂	464	17200	542	0.50	6.67	449	20200	531	0.0009
PyTAP	418 ^c	15500	516	0.15 ^c	-	408	12300	545	0.0045

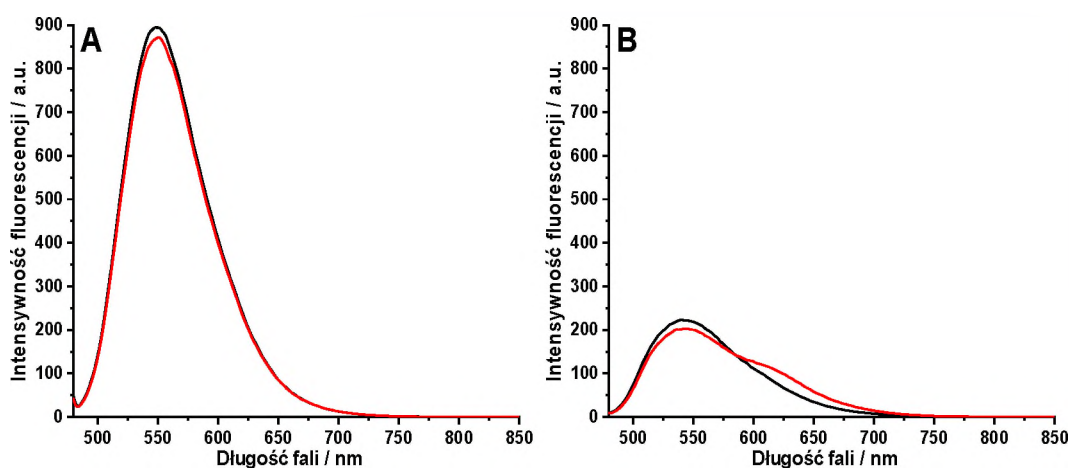
^a maksimum pasma absorpcji w widzialnym obszarze widma; ^b ϕ - wydajność kwantowa fluorescencji wyznaczona przy użyciu $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ ($\phi = 0,028$ w H₂O) jako wzorca odniesienia; ^c dane zaczerpnięte z literatury [185].

Wprowadzenie podstawników aromatycznych do pierścienia **PyTAP** skutkuje delokalizacją elektronową między rusztowaniem chromoforu a nienasyconymi grupami znajdującymi się w przyłączonym podstawniku, co powoduje przesunięcie maksimum pasma absorpcji w kierunku fal dłuższych. Szkielet pirazyntriazapentalenu posiadał maksimum absorpcji przy 418 oraz 408 nm odpowiednio w DMSO i wodzie, podczas gdy badane sondy posiadały pasma absorpcji w widzialnym obszarze widma w zakresie 464-468 nm w DMSO oraz 432 - 449 nm w środowisku wodnym. Efekt batochromowy był porównywalny dla obu badanych sond, a więc wprowadzenie łącznika alkilowego, który zwiększał układ

sprzężonych wiązań wielokrotnych, nie wpłynęło w znacznym stopniu na zmianę pasma absorpcji. Dla pochodnych nitrowych **PyTAP** (**1-NO₂** oraz **2-NO₂**) zaobserwowano bardzo znikomą fluorescencję. Fakt ten spowodowany jest efektywnym wygaszaniem fluoroforu przez elektroakceptorową grupę nitroaromatyczną, co zostało już wcześniej szeroko opisane w literaturze i jest podstawą do projektowania sond fluorescencyjnych aktywowanych tylko w określonych warunkach [187,188]. Natomiast odpowiednie pochodne aminowe sond **1-NH₂** i **2-NH₂** wykazywały intensywną fluorescencję, z bardzo wysoką wydajnością kwantową fluorescencji odpowiednio 0,76 i 0,50 w DMSO. W porównaniu do szkieletu **PyTAP** fluorescencja zredukowanych form sond, z elektrodonorową grupą aminową, charakteryzowała się silnym przesunięciem batochromowym, a ich wydajności kwantowe fluorescencji były 5- lub 3-krotnie wyższe odpowiednio dla **1-NH₂** oraz **2-NH₂**. Trójpierścieniowe rusztowanie **PyTAP** posiadało bardzo duże przesunięcie Stokesa wynoszące 98 nm w DMSO, natomiast wprowadzenie modyfikacji do układu nieco zmniejszyło przesunięcie maksimum pasma absorpcji względem pasma emisji do 78 nm. Jak podają dane literaturowe, dla pochodnych **PyTAP** przy zmianie rozpuszczalnika z apolarnego na polarny obserwuje się wyraźny efekt batochromowy pasma fluorescencyjnego bez znaczącej zmiany maksimum absorpcji, co skutkuje zwiększeniem przesunięcia Stokesa [185]. W badanych związkach również zaobserwowano powyższą zależność, przesunięcie Stokesa w wodzie wzrosło do 117 nm dla **1-NH₂** oraz 82 nm dla **2-NH₂**. Fluorescencja pochodnych aminowych sond oraz szkieletu **PyTAP** w roztworze wodnym była bardzo niska, z wydajnością kwantową fluorescencji poniżej 0,2% (**Tabela 4.1.1**). Taki efekt wygaszania przez wodę jest dobrze poznany i opisany w literaturze [189,190], a pogorszenie właściwości emisyjnych w roztworze wodnym również zaobserwowano dla opisywanych wcześniej pochodnych **PyTAP** [185]. W takim przypadku woda może działać jako wygaszacz, który konkuruje z radiacyjnymi i innymi niepromienistymi procesami dezaktywacji [189].

Istotnym aspektem badań przy projektowaniu sond fluorescencyjnych do ilościowego oznaczania oksydoreduktaz jest zbadanie wpływu tlenu cząsteczkowego na ich właściwości fluorescencyjne. Jak wiadomo, tlen cząsteczkowy skutecznie wygasza fluorescencję wielu fluoroforów poprzez wygaszanie dynamiczne [178]. W związku z tym w warunkach obniżonego stężenia tlenu obserwowana wyższa fluorescencja sondy może wynikać ze zmniejszonego wygaszania fluorescencji przez tlen, a nie z efektywnej redukcji związku, co może prowadzić do błędnej analizy. Porównanie widm emisyjnych dla pochodnych aminowych sond w warunkach tlenowych i beztlenowych przedstawiono na **Rysunku 4.1.3**.

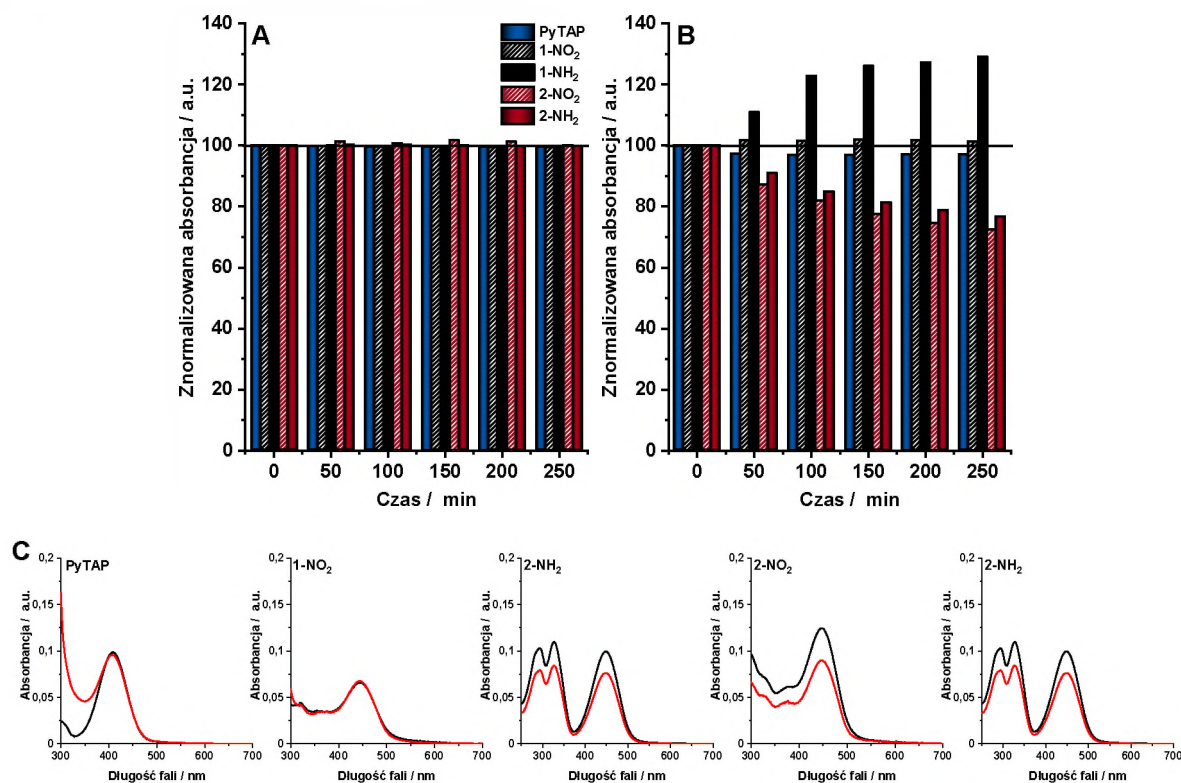
Nie zaobserwowano istotnych zmian intensywności fluorescencji dla **1-NH₂** i **2-NH₂** ani w DMSO, ani w roztworach wodnych (dane niepokazane), wynikających ze zmian stężenia tlenu w próbach, co świadczy o braku wpływu tlenu cząsteczkowego na emisję fluorescencji badanych związków. W związku z tym fluorescencja związków jest niezależna od stężenia tlenu, a oczekiwane zmiany fluorescencji w warunkach beztlenowych nie wynikają ze zmniejszonego stężenia tlenu, ale są efektem redukcji związków nitroaromatycznych w obecności NTR.



Rysunek 4.1.3 Intensywność fluorescencji ($\lambda_{ex} = 468 \text{ nm}$) dla **1-NH₂** ($1 \mu\text{M}$) (**A**) i **2-NH₂** ($1 \mu\text{M}$) (**B**) mierzona w DMSO w warunkach atmosferycznych (kolor czarny) lub beztlenowych (kolor czerwony).

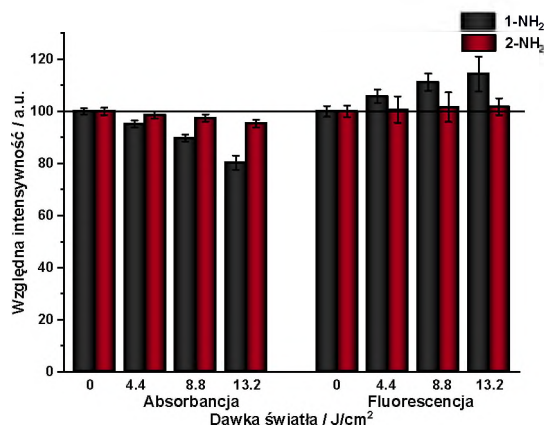
4.1.2 Ocena stabilności oraz fotostabilności w warunkach fizjologicznych

Jednym z podstawowych wymagań stawianym przy projektowaniu nowych sond fluorescencyjnych jest ich trwałość chemiczna oraz stabilność fotochemiczna. Pomimo faktu, iż fotostabilność jest krytycznym parametrem w procesie biologicznego obrazowania optycznego, duża część badanych oraz komercyjnie stosowanych sond charakteryzuje się niewystarczającą fotostabilnością, ulegając degradacji fotochemicznej (ang. *photobleaching*) [191,192]. Stabilność termiczną sond w DMSO oraz w buforze TRIS-HCl (50 mM, pH 7,4) zbadano poprzez rejestrację widm absorpcyjnych. Zaobserwowano, że wszystkie związki są bardzo stabilne w DMSO. Natomiast w roztworze wodnym można zauważyć nieznaczne obniżenie absorbancji sondy **2-NO₂** oraz jej pochodnej aminowej **2-NH₂**, co może być spowodowane niewielką agregacją (**Rysunek 4.1.4**).



Rysunek 4.1.4 Stabilność związków w DMSO (A) oraz w buforze TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM) (B) monitorowana poprzez rejestrację zmian maksimum pasma absorpcji w widzialnym obszarze widma. (C) Widma absorpcyjne związków w chwili dodania 2 µl 40 mM związku rozpuszczonego w DMSO do 2 ml buforu TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM) (kolor czarny) oraz po 250 min (kolor czerwony) w buforze.

W celu oceny fotostabilności badanych związków zarejestrowano zmiany absorbancji przy 447 nm oraz intensywności fluorescencji przy 564 nm (wzbudzenie 447 nm) po naświetlaniu światłem monochromatycznym o długości fali 465 nm. Pochodne aminowe okazały się bardzo stabilne po naświetleniu w buforze TRIS-HCl, nawet bardzo wysokimi dawkami światła. Nieznaczny rozkład wynoszący ok. 15% zaobserwowano dla **1-NH₂** przy dawce światła wynoszącej 13,2 J/cm² (**Rysunek 4.1.5**).



Rysunek 4.1.5 Fotostabilność 1-NH₂ (słupek czarny) oraz 2-NH₂ (słupek czerwony) (40 μM) w buforze TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM) monitorowana poprzez rejestrację zmian w absorbancji (447 nm) i intensywności fluorescencji ($\lambda_{ex} = 447 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 564 \text{ nm}$) po naświetlaniu przy 465 nm.

4.1.3 Ocena zdolności redukcji sond przez nitroreduktazy

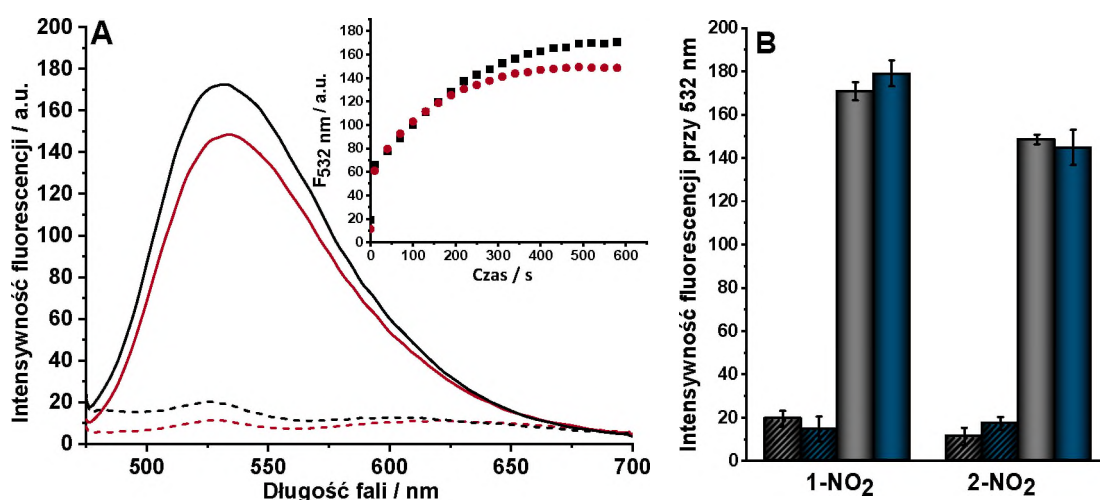
Nitroreduktazy to szeroka rodzina wewnątrzkomórkowych flawoenzymów, które zdolne są do redukcji związków nitroaromatycznych przy użyciu zredukowanego NAD(P)H jako donora elektronów [70]. Nitroreduktazy zyskały duże zainteresowanie ze względu na ich zastosowanie w aktywacji proleków bioredukcyjnych oraz do oceny obszarów o niskim poziomie tlenu w guzach [71]. Badane sondy nitro-triazapentalenowe mogą być potencjalnym substratem dla nitroreduktaz, w związku z czym oceniono zdolność badanych związków do redukcji przez dwa typy nitroreduktaz występujących w układach biologicznych.

4.1.3.1 Redukcja sond przez nitroreduktazę typu I

Nitroreduktazy typu I są niewrażliwe na tlen i katalizuje dwuelektronową redukcję grupy nitrowej zarówno w obecności tlenu cząsteczkowego, jak również przy jego braku. Enzymy z tej grupy wstępują w bakteriach i grzybach, przy czym najlepiej zbadana jest nitroreduktaza pochodząca z *Escherichia coli* kodowana przez gen NfsB. Jest ona układem modelowym w większości badań nad nitroaromatycznymi prolekami i sondami. W organizmach ssaków przedstawicielem typu I NTR jest dehydrogenaza chinonowa NAD(P)H 1 (NQO1).

Do oceny zdolności redukcji grupy nitroaromatycznej sond przez NTR typu I wykorzystano komercyjnie dostępną NTR z *Escherichia coli*. Obie sondy nie wykazywały prawie żadnej emisji fluorescencji po wzbudzeniu przy 447 nm w buforze TRIS-HCl (pH 7,4; 50 mM). Dodatek 10-krotnego nadmiaru NADH, który pełnił funkcję donora elektronów, nie był w stanie zredukować sond, co przejawia się brakiem wzrostu emisji

fluorescencji (**Rysunek 4.1.15**) Natomiast wspólna inkubacja sond z NADH oraz NTR spowodowała zależne od czasu wzmocnienie fluorescencji (**Rysunek 4.1.6A**). W ciągu pierwszych 10-15 min zaobserwowano stosunkowo szybki i stopniowy wzrost intensywności emisji, która utrzymywała się następnie na stałym poziomie. Redukcja obu sond doprowadziła do powstania produktów o ponad 15-krotnie większej intensywności fluorescencji przy 532 nm. Zgodnie z oczekiwaniami, dla typu I nitroreduktaz, który katalizuje redukcję grupy nitrowej przez dodanie pary elektronów niezależnie od obecności tlenu cząsteczkowego [73,74], pierwsze etapy redukcji w warunkach beztlenowych były podobne do obserwowanych dla reakcji prowadzonej w warunkach równowagi z powietrzem (**Rysunek 4.1.6B**).

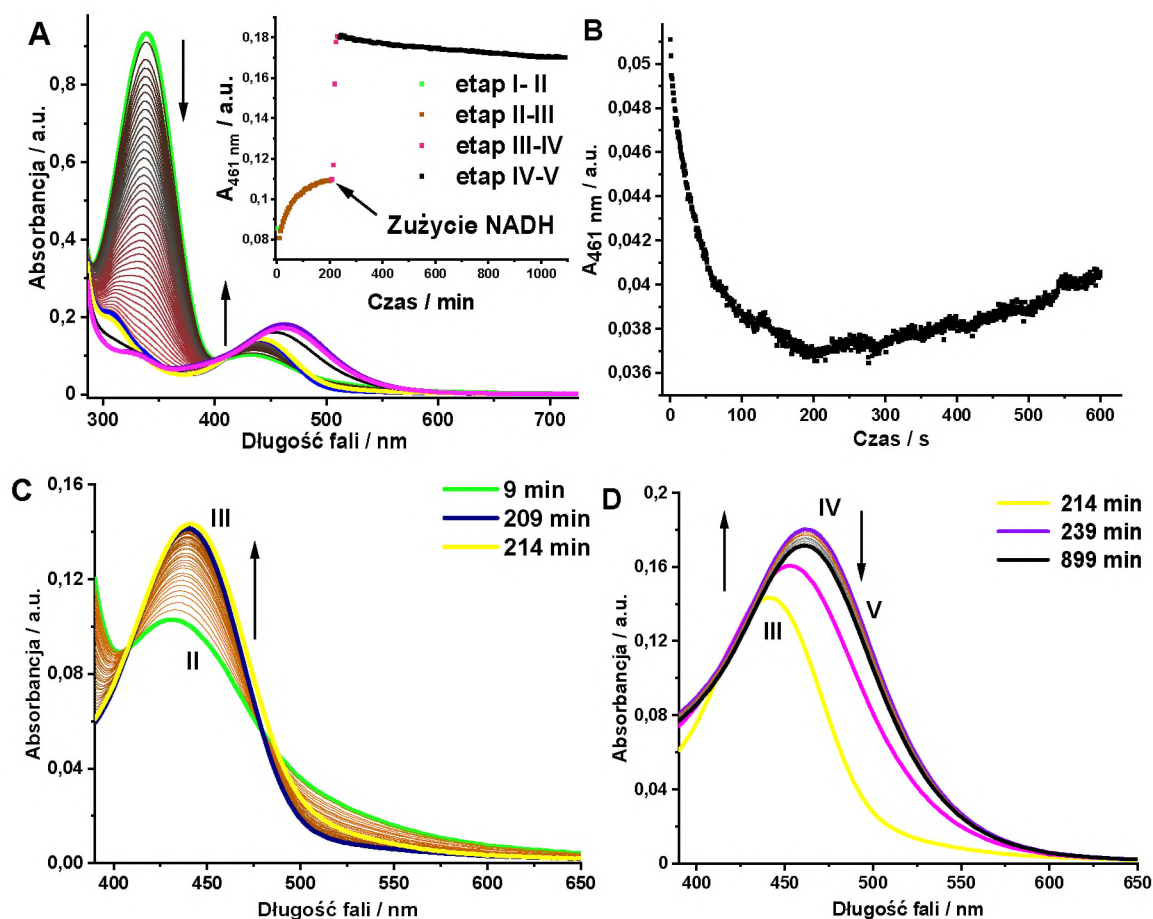


Rysunek 4.1.6 (A) Widma emisyjne 1-NO₂ (kolor czarny) i 2-NO₂ (kolor czerwony) (16 μM) przed (linia kreskowana) oraz po (linia ciągła) reakcji z nitroreduktazą (2,4 μg/mL) w obecności NADH (160 μM) w warunkach równowagi z powietrzem. **Wstawka:** Zależne od czasu zmiany intensywności maksimum fluorescencji przy 532 nm. (B) Porównanie intensywności fluorescencji sondy 1-NO₂ oraz 2-NO₂ przed reakcją (słupki kreskowane) oraz po 10 min reakcji (słupki pełne) w warunkach równowagi z powietrzem (kolor szary) oraz w warunkach beztlenowych (kolor niebieski). Warunki eksperymentalne: λ_{ex} = 447 nm; λ_{em} = 532 nm; TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), T = 37°C.

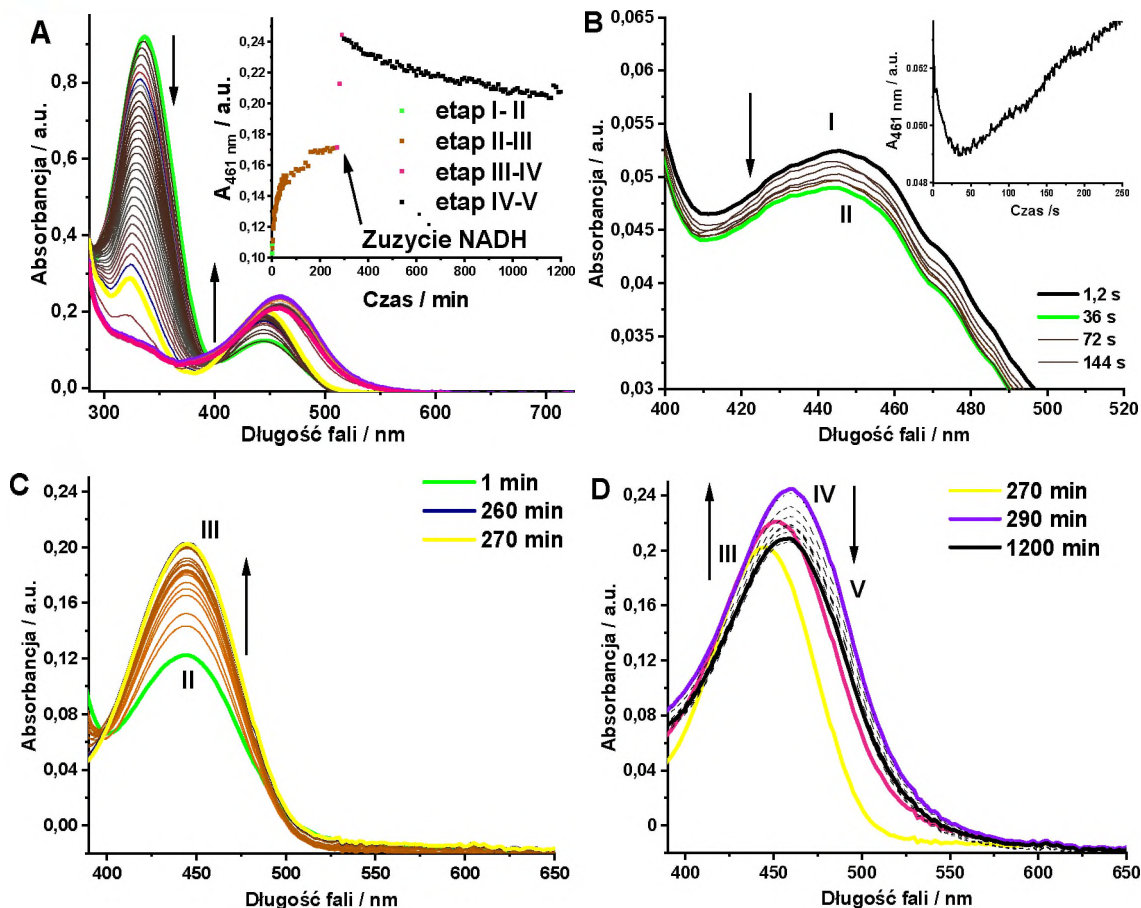
Analiza mechanizmu redukcji

W celu dokładniejszej analizy mechanizmu redukcji, reakcję monitorowano również spektrofotometrycznie. Widma absorpcyjne zależne od czasu wykazały, że redukcja sond przebiega w kilku etapach (**Rysunek 4.1.7** oraz **Rysunek 4.1.8**). Zmiany absorbancji przy 461 nm wskazują wyraźnie na wieloetapową reakcję analogiczną dla obu sond. W pierwszym etapie reakcji zaobserwowano natychmiastowy spadek intensywności badanego pasma absorpcji po dodaniu NTR w obecności nadmiaru NADH, co uniemożliwiło zbadanie tego etapu z wykorzystaniem klasycznego spektrofotometru.

Aby śledzić I etap reakcji wykorzystano spektrometr z zatrzymanym przepływem (stopped-flow). Ten etap reakcji dla związku **1-NO₂** trwał około 200 s, natomiast dla sondy **2-NO₂** był zdecydowanie krótszy i wynosił 50 s (**Rysunek 4.1.7B** oraz **Rysunek 4.1.8B**). W kolejnym kroku zaobserwowano wzrost absorbancji, aż do całkowitego zużycia NADH, którego ilość kontrolowano, analizując pasmo przy 340 nm. Etap ten trwał odpowiednio 215 oraz 270 min dla **1-NO₂** oraz **2-NO₂** (**Rysunek 4.1.7C** oraz **Rysunek 4.1.8C**).



Rysunek 4.1.7 Zależne od czasu zmiany w widmie absorpcyjnym lub zmiany absorbancji przy wybranej długości fali dla **1-NO₂** (16 μM) w obecności NADH (160 μM) oraz NTR (2,4 μg/mL) zarejestrowane w 37°C, bufor TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM). **A, C, D** - reakcja redukcji rejestrowana na klasycznym spektrofotometrze; **B** - kinetyka reakcji redukcji rejestrowana na spektrometrze typu stopped-flow; **Wstawka** w **A** - zmiany zależne od czasu przy 461 nm, **A, C, D** - odpowiadające im zmiany w widmie absorpcyjnym.

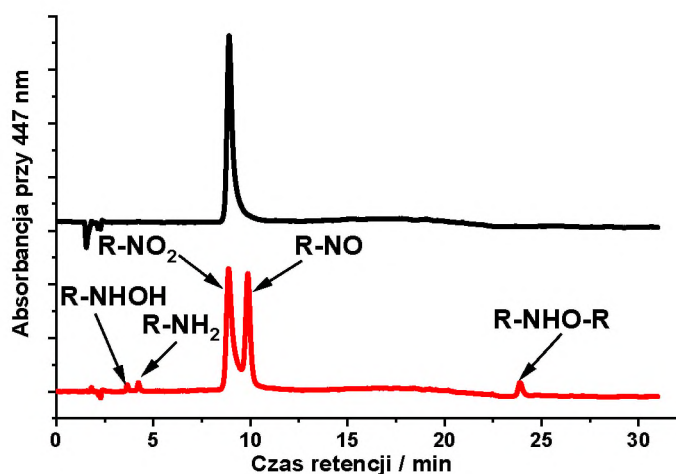


Rysunek 4.1.8 Zależne od czasu zmiany w widnie absorpcyjnym lub zmiany absorbancji przy wybranej długości fali dla 2-NO₂ (16 μM) w obecności 160 μM NADH i NTR (2,4 μg/mL) zarejestrowane w 37°C, bufor TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM). **A, C, D** - reakcja redukcji rejestrowana na klasycznym spektrofotometrze; **B** - reakcji redukcji rejestrowana na spektrometrze typu stopped-flow; **Wstawka** w **A** oraz w **B** – zmiany zależne od czasu przy 461 nm; **A, B, C, D** – odpowiadające im zmiany w widnie absorpcyjnym.

Po całkowitym wyczerpaniu NADH zaobserwowano gwałtowne przesunięcie batochromowe pasma w obszarze widzialnym, a następnie ustabilizowanie absorbancji przez długi czas po zakończeniu reakcji. Po 12 h od rozpoczęcia reakcji pasmo absorpcyjne ulega jedynie minimalnemu obniżeniu, co świadczy o stabilności otrzymanych produktów reakcji.

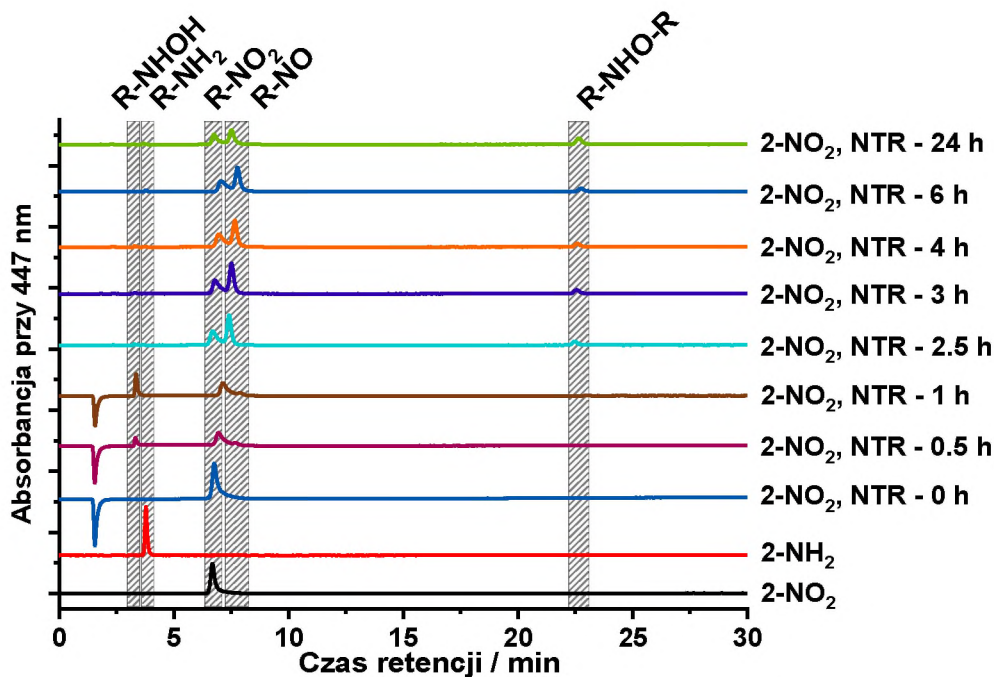
Aby zidentyfikować powstające produkty redukcji sond, mieszaninę poreakcyjną rozdzielono za pomocą metody HPLC z detektorem UV-Vis, a poszczególne produkty dodatkowo zidentyfikowano przy użyciu chromatografii cieczowej z detektorem mas (LCMS). Analiza HRMS próbek wykazała, że w warunkach równowagi z powietrzem reakcja redukcji prowadzi ostatecznie do powstania pochodnych nitrozowych wraz z dimerami azoksy, które były produktami dominującymi. Powstawanie takich dimerów ze związków nitrozowych znane jest dla innych nitroarenów [193,194].

Badane próbki zawierały również niewielkie ilości odpowiedników aminowych (**1-NH₂** i **2-NH₂**) oraz śladowe ilości pochodnych hydroksyloaminowych (**Rysunek 4.1.9**).



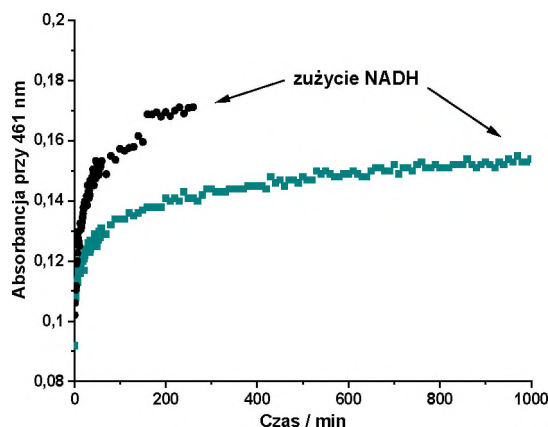
Rysunek 4.1.9 Porównanie chromatogramów otrzymanych dla redukcji sondy **2-NO₂** ($16 \mu\text{M}$) inkubowanej tylko z **NADH** ($160 \mu\text{M}$) (kolor czarny) lub w obecności **NTR** ($2,4 \mu\text{g/mL}$) przez 5 h (kolor czerwony). Warunki reakcji: **TRIS-HCl** ($\text{pH } 7,4$, 50 mM), $T = 37^\circ\text{C}$, Chromatogramy rejestrowano dla absorbancji przy 447 nm .

Analizując dystrybucję poszczególnych produktów redukcji w czasie trwania reakcji przy użyciu HPLC (**Rysunek 4.1.10**), można zauważyć, że w początkowym etapie reakcji zaobserwowano pik przy czasie elucji 3,3 min pochodzący od pochodnej hydroksyloaminowej, oraz pik przy czasie elucji 7,4 min pochodzący od pochodnej nitrozowej. Powstające produkty hydroksyloaminowe, okazały się nietrwałe w warunkach doświadczalnych i ulegały ponownemu utlenieniu do pochodnych nitrozowych z udziałem tlenu cząsteczkowego. Redukcja związków nitrozowych do ich odpowiedników hydroksyloaminowych była kontynuowana, aż do całkowitego wyczerpania **NADH**, czyli ok 2,5 godziny. Po tym czasie zaobserwowano całkowity zanik piku od pochodnej hydroksyloaminowej oraz jednoczesny wzrost intensywności piku od związku nitrozowego. Równocześnie zarejestrowano nowy pik przy czasie elucji 22,6 min pochodzący od azoksy dimerów tworzonych się ze związku nitrozowego. Redukcja sond **1-NO₂** oraz **2-NO₂** zachodziła analogicznie, w związku z tym przedstawiono wykresy jedynie dla związku **2-NO₂**.



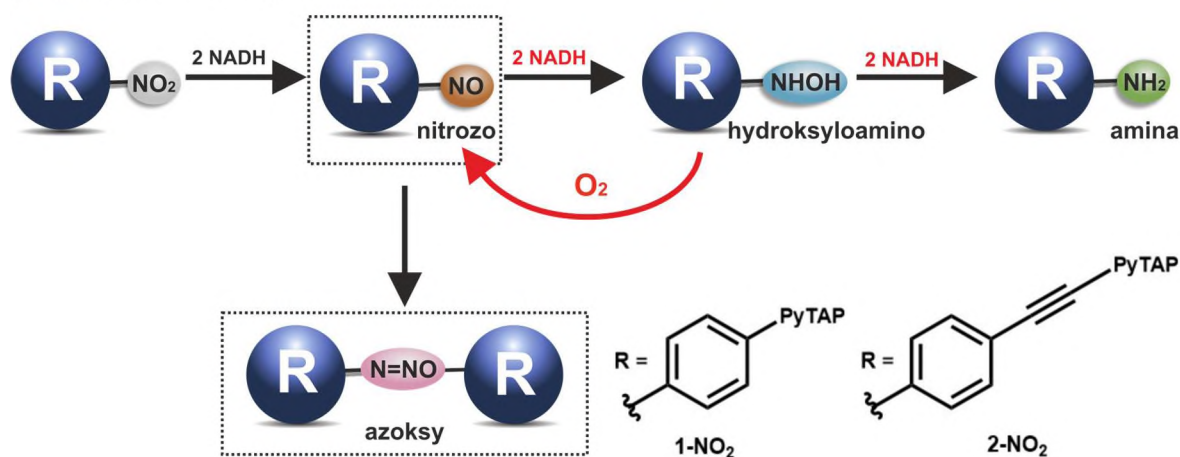
Rysunek 4.1.10 Dystrybucji produktów redukcji sondy 2-NO₂ (16 μM) w czasie, w obecności tylko NADH (160 μM) (kolor czarny) lub dodatkowo w obecności NTR (2,4 μg/ml). Warunki reakcji: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), T = 37°C, Chromatogramy rejestrowano dla absorbancji przy 447 nm.

Reakcja w warunkach beztlenowych przebiegała w analogiczny sposób jak w warunkach równowagi z powietrzem z tą różnicą, że ubytek NADH był znacznie wolniejszy (**Rysunek 4.1.11**), co wynika z zablokowania reakcji ponownego utlenienia hydroksyloaminowej pochodnej sondy w warunkach ograniczonego stężenia tlenu. Należy zauważyć, iż mimo odtlenienia próbek przez argonowanie, co umożliwia znaczne obniżenie tlenu, długotrwałe prowadzenie reakcji w kuwetach, zakręcanych korkiem z silikonową membraną, nie zabezpiecza wystarczająco roztworu przed dyfundowaniem tlenu ze środowiska zewnętrznego. W tych warunkach zachodzi reoksydacja, ale znacznie wolniej.



Rysunek 4.1.11 Zależne od czasu zmiany absorbancji przy 461 nm dla 2-NO₂ (16 μM) w obecności NADH (160 μM) oraz NTR (2,4 μg/mL) zarejestrowane w warunkach równowagi z powietrzem (kolor czarny) lub beztlenowych (kolor niebieski). Warunki eksperymentalne: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), T= 37°C.

Na podstawie powyższych eksperymentów zaproponowano schemat reakcji zachodzących podczas redukcji sond w obecności nitroreduktazy typu I, który przedstawiono na **Rysunku 4.1.12**.

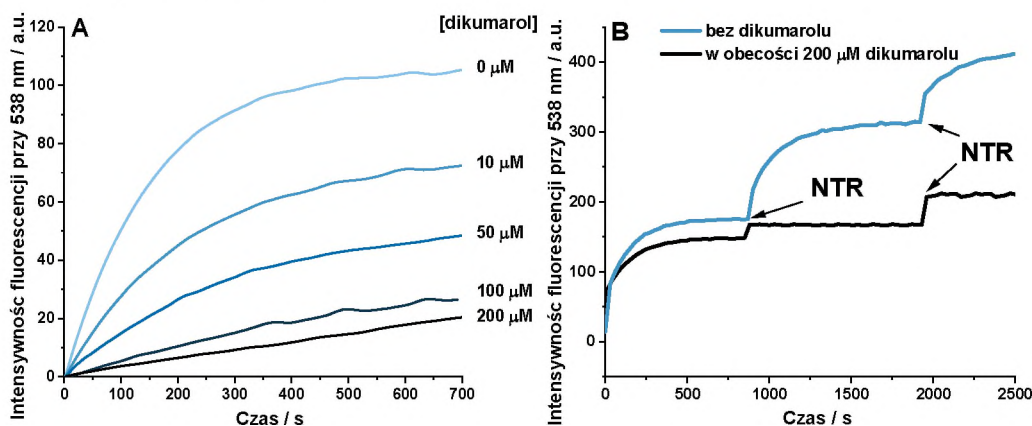


Rysunek 4.1.12 Mechanizm redukcji sond 1-NO₂ i 2-NO₂ w obecności nitroreduktazy typu I w warunkach równowagi z powietrzem. Główne produkty zaznaczono ramką.

Wpływ inhibitora na reakcję redukcji

Aby potwierdzić bezpośrednią zależność efektywności redukcji sond od aktywności enzymatycznej nitroreduktazy, oceniono spektrofotometrycznie wydajność redukcji związków w obecności inhibitora nitroreduktazy, dikumarolu. Dikumarol to pochodna kumaryny, który jest inhibitorem kompetycyjnym w stosunku do NADH i w sposób nieodwracalny blokuje centrum aktywne, uniemożliwiając utlenienie kofaktora flawinowego (FMN) na pierwszym etapie reakcji redukcji, której mechanizm określany jest mianem *Ping-Pong* [195]. Podczas prowadzenia reakcji redukcji sond w obecności różnych

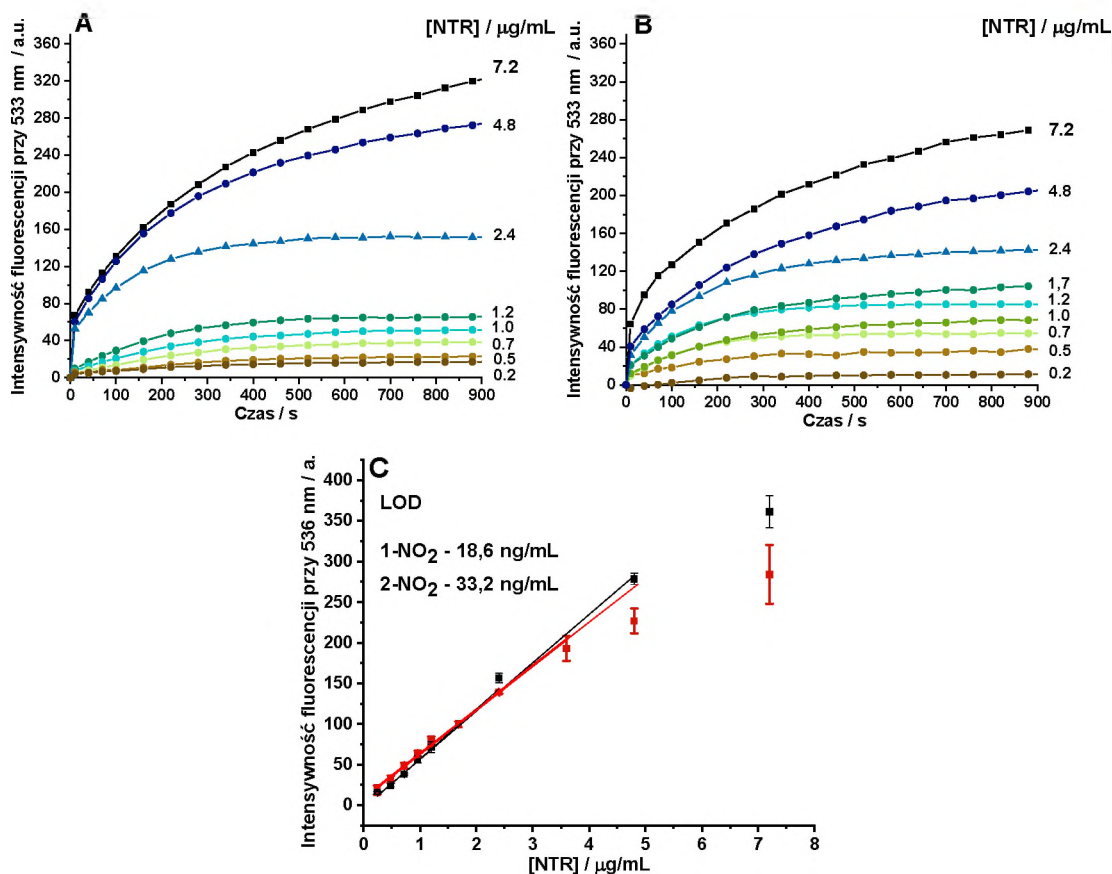
stężeń dikumarolu (0-200 μM) zaobserwowano stopniowy, zależny od dawki inhibitora spadek intensywności fluorescencji (**Rysunek 4.1.13A**). Co więcej, dodatek inhibitora po zakończeniu redukcji uniemożliwiał wykrycie dodatkowych porcji NTR w układzie (**Rysunek 4.1.13B**). Otrzymane wyniki jednoznacznie dowodzą, że reakcja aktywowania fluorescencji **1-NO₂** i **2-NO₂** w obecności NTR była bezpośrednio związana z jej aktywnością enzymatyczną.



Rysunek 4.1.13 (A) Zależne od czasu zmiany intensywności emisji fluorescencji ($\lambda_{ex} = 447 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 538 \text{ nm}$) **2-NO₂** (16 μM) dla różnych stężeń dikumarolu (0-200 μM) w obecności NTR (2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oraz NADH (160 μM). (B) Zależne od czasu zmiany intensywności emisji fluorescencji ($\lambda_{ex} = 447 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 538 \text{ nm}$) **2-NO₂** (16 μM) w obecności NADH (160 μM) oraz NTR (2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Po zakończeniu redukcji dodawano 2-krotnie kolejną porcję NTR (2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bez inhibitora (niebieski) oraz w obecności dikumarolu (200 μM). Warunki eksperymentalne: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), $T = 37^\circ\text{C}$.

Zależność intensywności fluorescencji od stężenia NTR

Sprawdzono możliwość wykorzystania badanych związków do ilościowego oznaczenia poziomu aktywnej formy nitroreduktazy w układach modelowych oraz biologicznych. Przeprowadzono reakcję redukcji sondy **1-NO₂** oraz **2-NO₂** przy 10-krotnym nadmiarze NADH oraz różnym stężeniu NTR (0,2-7,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Jak pokazano na **Rysunku 4.1.14**, fluorescencja badanych związków ulegała stopniowego wzmocnieniu wraz ze wzrostem stężenia NTR. Dla obu badanych sond uzyskano dobrą korelację liniową w zakresie stężeń (0,2 - 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Rysunek 4.1.14C**) i na jej podstawie obliczono granicę wykrywalności (LOD) NTR w badanych warunkach eksperymentalnych zgodnie z równaniem $3\sigma/S$ (σ - odchylenie standardowe pomiarów bez dodatku enzymu, S - nachylenie krzywej kalibracyjnej). Granica wykrywalności była na bardzo niskim poziomie dla obu sond i wynosiła ona 18,6 i 33,2 ng/mL NTR odpowiednio dla **1-NO₂** i **2-NO₂**.

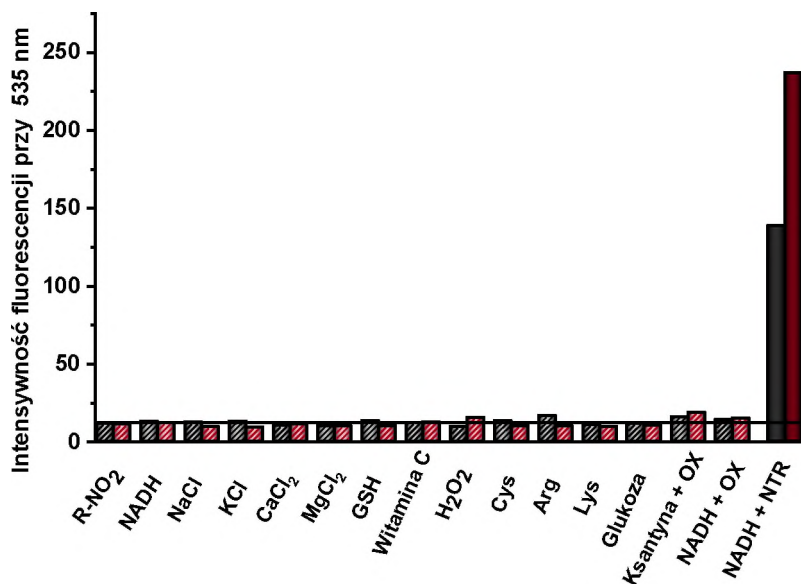


Rysunek 4.1.14 Zależne od czasu zmiany intensywności fluorescencji ($\lambda_{ex} = 447 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 533 \text{ nm}$) dla 1-NO₂ (16 μM) (A) oraz 2-NO₂ (16 μM) (B) dla różnych stężeń NTR (0,2 - 7,2 μg/mL) w obecności NADH (160 μM); (C) Korelacja pomiędzy intensywnością w maksimum fluorescencji, a stężeniem NTR po 15 min reakcji. Warunki eksperymentalne: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), $T = 37^\circ\text{C}$.

Selektywność badanych sond

W środowisku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym wstępuje wiele czynników, które mogą nieselektywnie redukować ugrupowanie nitroaromatyczne w sondach fluorescencyjnych i tym samym zakłócać pomiar aktywności nitroreduktazy. W związku z tym istotne wydaje się zbadanie wpływu środowiska biologicznego na poziom fluorescencji sond. Biorąc pod uwagę mnogość substancji występujących w środowisku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym, zbadano interferencję z różnymi klasami analitów, wśród których znalazły się reduktory biologiczne (NADH, GSH, witamina C, Cys) lub utleniacz (H₂O₂), sole nieorganiczne (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂), aminokwasy (Arg, Lys), glukoza czy też inne enzymy mające potencjał do redukcji grupy nitrowej (oksydoreduktaza ksantynowa – XOR) [196].

Jak pokazano na **Rysunku 4.1.15**, nie zaobserwowano znaczącej zmiany fluorescencji sond **1-NO₂** oraz **2-NO₂** w obecności zakłócających substancji, a redukcja związków do wysoce fluorescencyjnej formy zachodzi jedynie podczas wspólnej inkubacji z NTR oraz NADH. Uzyskane wyniki potwierdzają, że badane związki mogą być uznane za czułe i selektywne sondy do oznaczania NTR w układach biologicznych.

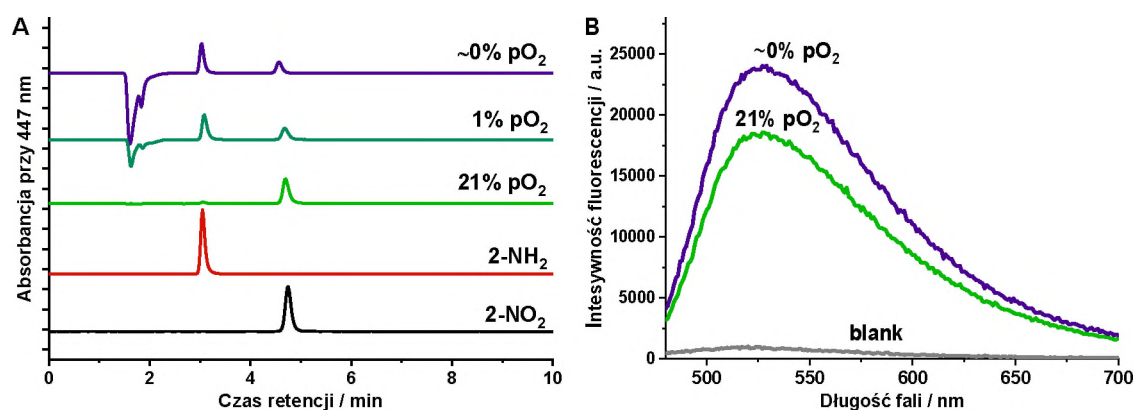


Rysunek 4.1.15 Intensywność fluorescencji przy 538 nm ($\lambda_{ex} = 447$ nm) **1-NO₂** (kolor czarny) oraz **2-NO₂** (kolor czerwony) ($5\mu\text{M}$) w buforze TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM) bez dodatków (**R-NO₂**) oraz w obecności różnych reduktorów: NADH ($150\mu\text{M}$), GSH (1 mM), witaminy C (1 mM), Cys (1 mM); utleniacza: H₂O₂ (1 mM); soli: NaCl (1 mM), KCl (1 mM), CaCl₂ (1 mM), MgCl₂ (1 mM), aminokwasów: Arg (1 mM), Lys (1 mM); glukozy (1 mM); ksantyny ($150\mu\text{M}$) z oksydoreduktazą ksantynową (XOR, 0,01U/ml); NADH ($150\mu\text{M}$) z oksydoreduktazą ksantynową (0,01U/ml) – kreskowane słupki oraz NADH ($150\mu\text{M}$) z nitroreduktazą (NTR, 2,4 $\mu\text{g/ml}$) – pełne słupki. Wszystkie dane zebrano 30 min po zmieszaniu odczynników i inkubacji w 37°C.

4.1.3.2 Redukcja sond przez nitroreduktazę typu II

U ssaków głównym typem nitroreduktaz są nitroreduktazy typu II, które są wrażliwe na tlen i efektywnie katalizują jednoelektronową redukcję związków nitroaromatycznych jedynie w środowisku silnego niedotlenienia [70,73]. Enzymami, które możemy zaliczyć do tej grupy nitroreduktaz to głównie reduktaza cytochromu P450 (POR) oraz reduktaza cytochromu b5 (CYB5B) [96,197,198]. Fakt, że ten typ enzymów występuje głównie u ssaków oraz selektywnie działa w warunkach hipoksji powoduje, że mają one szczególne znaczenie w projektowaniu proleków i sond optycznych wrażliwych na hipoksję. Ze względu na brak komercyjnie dostępnych, wyizolowanych i aktywnych form enzymów, do badań modelowych nad nitroreduktazami typu II wykorzystano mikrosomy wątrobowe, które zawierają mieszaninę różnych enzymów, a w szczególności reduktazę cytochromu

P450 [199,200]. Ze względu na analogiczny mechanizm redukcji sondy **1-NO₂** oraz **2-NO₂** badania przeprowadzono dla sondy **2-NO₂**, która wykazywała wyższą stabilność. Redukcję sondy **2-NO₂** prowadzono w obecności NADH (1 mM) oraz mikrosomów w warunkach o różnym stężeniu tlenu. Postęp reakcji monitorowano przy użyciu czytnika płytek oraz HPLC z wykorzystaniem metody analogicznej jak przy badaniu odpowiedzi sond w obecności NTR typu I. W pełni zredukowany produkt **2-NH₂** otrzymano jedynie w warunkach, gdy reakcja prowadzona była w bardzo niskich stężeniach tlenu (<1 ppm pO₂ lub 1% pO₂) natomiast, nie zaobserwowano zredukowanego produktu w warunkach równowagi z powietrzem (**Rysunek 4.1.16A**). Równocześnie emisja fluorescencji zarejestrowana za pomocą czytnika płytek była wyraźnie wyższa, gdy redukcję przeprowadzono w warunkach obniżonego stężenia tlenu (**Rysunek 4.1.16B**).



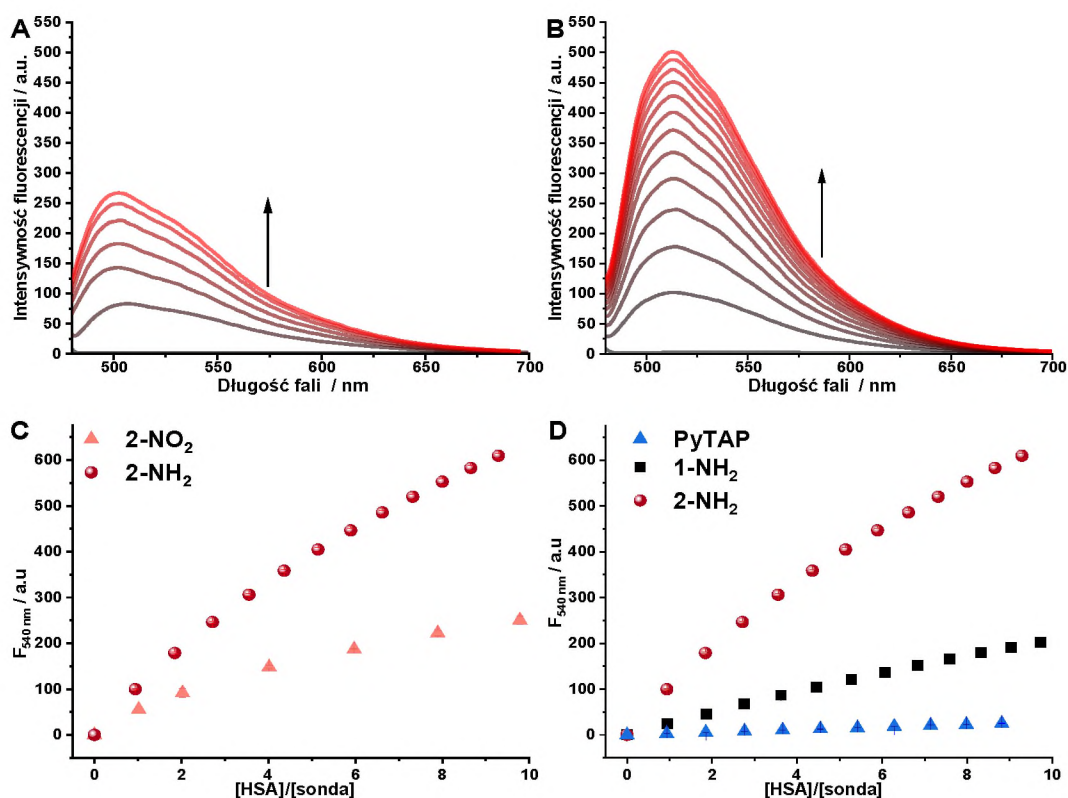
Rysunek 4.1.16 A) Porównanie chromatogramów redukcji sondy **2-NO₂** (16 μ M) inkubowanej z NADH (1 mM) i mikrosomami wątrobowymi (1 mg/mL) przez 6 h w warunkach równowagi z powietrzem (21% pO₂), hipoksji (1% pO₂) lub w środowisku beztlenowym (<1 ppm pO₂, oznaczany jako ~0% pO₂). Chromatogramy rejestrowano stosując absorbcję przy 447 nm. B) Widma emisyjne ($\lambda_{ex} = 447$ nm) samych mikrosomów w obecności NADH (1 mM) (blank) oraz po 6 godzinach redukcji **2-NO₂** (16 μ M) z NADH (1 mM) prowadzonej w warunkach normoksji lub beztlenowych. Warunki eksperymentalne: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), T= 37°C.

Powyższe wyniki sugerują, że powstałe produkty nitrozowe i hydroksyloaminowe mogą oddziaływać z białkami obecnymi w mikrosomach, a oddziaływanie to może powodować wzmocnieniem intensywności fluorescencji. Natomiast jedynie w warunkach beztlenowych redukcja przebiega wystarczająco efektywnie, aby otrzymać w pełni zredukowany produkt, który można oddzielić od frakcji białkowej za pomocą HPLC. Ten eksperyment potwierdza założenie badań dotyczące przydatności zaprojektowanych sond w ocenie poziomu NTR szczególnie typu II, które często ulegają nadekspresji w komórkach nowotworowych, a ich aktywność jest silnie skorelowana z obecnością tlenu w badanym środowisku biologicznym.

Dodatkowo warto podkreślić, że wysoce fluorescencyjne produkty redukcji generowane po wcześniejszej akumulacji sond w komórkach niedotlenionych mogą być dalej badane w warunkach równowagi z powietrzem, ponieważ redukcja tych sond jest nieodwracalna, a tlen cząsteczkowy nie wygasza ich fluorescencji, co umożliwia uniknięcie otrzymania wyniku fałszywie negatywnego.

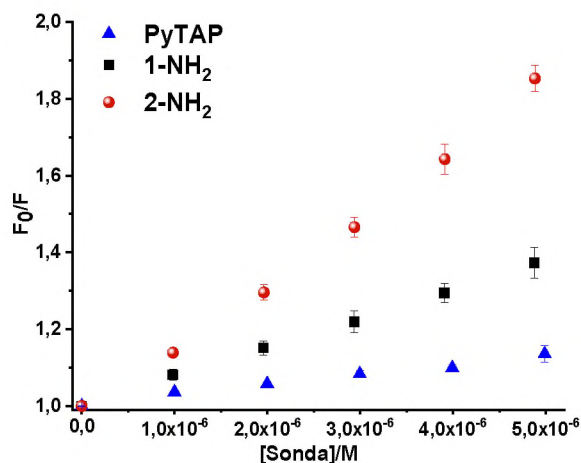
4.1.4 Powinowactwo wobec ludzkiej albuminy surowiczej (HSA)

Jak zaobserwowano we wstępnych badaniach spektroskopowych oraz podczas redukcji związków przez NTR typu II, w obecności białka następuje poprawa właściwości fluorescencyjnych badanych sond. W celu uzyskania dokładniejszych informacji o wpływie białek na fluorescencję związków wybrano albuminę, która zawiera wiele hydrofobowych kieszeni wiążących i naturalnie służy jako transporter różnych ligandów [201]. W związku z tym, związki lipofilowe mogą wchodzić w interakcje z albuminą natychmiast po podaniu do krwiobiegu, co może mieć zarówno korzystny, jak również niekorzystny skutek. Aby sprawdzić wpływ albuminy na zmianę fluorescencji związków miareczkowano sondy oraz ich pochodne aminowe roztworem HSA. Na **Rysunku 4.1.17** przedstawiono widma emisyjne dla sondy **2-NO₂**, jej pochodnej aminowej **2-NH₂** oraz liniowe zależności maksimum fluorescencji od stężenia HSA dla wszystkich badanych związków. Fluorescencja badanych sond i ich zredukowanych odpowiedników została znacznie wzmocniona w obecności albuminy surowicy ludzkiej (HSA) w sposób zależny od stężenia białka. Największy wzrost fluorescencji zaobserwowano dla **2-NH₂**, umiarkowane dla **1-NH₂**, natomiast HSA nie wpływała znacząco na właściwości emisyjne **PyTAP**. Porównując związek nitroaromatyczny i jego odpowiednią pochodną aminową można zauważyć, że zredukowana forma sondy znacznie mocniej oddziałuje z białkiem. W związku z otrzymanymi wynikami można wnioskować o silnych oddziaływaniach białko-ligand zależnych od struktury liganda w szkielecie **PyTAP**.



Rysunek 4.1.17 Widma emisyjne 2-NO₂ (A) i 2-NH₂ (B) w obecności różnej ilości HSA. (C-D) Intensywności fluorescencji przy maksimum emisji związków dla różnych stosunków [HSA]/[sonda]. Warunki eksperymentalne: [1-NH₂] = [2-NO₂] = [2-NH₂] = [PyTAP] = 5 μM; [HSA] = 0-52 uM; TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), T = 37°C.; λ_{ex} = 447 nm.

Aby potwierdzić oddziaływanie związków z białkiem wyznaczono stałe wiązania dla tworzących się adduktów, wykorzystując metodę wygaszanie fluorescencji wewnętrznej białka. Pomiar wygaszania naturalnej fluorescencji aromatycznych reszt aminokwasowych, w szczególności tryptofanowych, jest szeroko wykorzystywany w badaniach oddziaływania białko-ligand, w analizach zmian konformacyjnych białek oraz ich dynamiki [178]. Badania wiązania związków do białka przeprowadzono poprzez miareczkowanie białka badanymi sondami. Przed każdym pomiarem widm emisyjnych badane roztwory inkubowano przez 5 min w temperaturze 37°C w celu osiągnięcia równowagi. Na podstawie otrzymanych widm fluorescencyjnych uzyskano liniowe zależności F_0/F od stężenia wygaszacza (tj. badanego związku), dla których dopasowano równanie Sterna-Volmera i wyznaczono stałe wygaszania K_{sv} (Rysunek 4.1.18, Tabela 4.1.2), które w przypadku wygaszania statycznego odzwierciedlają powinowactwo związku do białka i często są traktowane jako pozorne stałe tworzenia adduktu białko-ligand.



Rysunek 4.1.18 Zależność Sterna–Volmera przedstawiająca wpływ wzrastającego stężenia sondy na intensywność fluorescencji HSA. Warunki eksperymentalne: $[HSA] = 1 \mu M$; $[1-NH_2] = [2-NH_2] = [PyTAP] = 0 - 6 \mu M$; TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), $T = 37^\circ C$; $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$.

Tabela 4.1.2 Stałe asocjacji dla tworzenia adduktów kompleksu HSA-sonda.

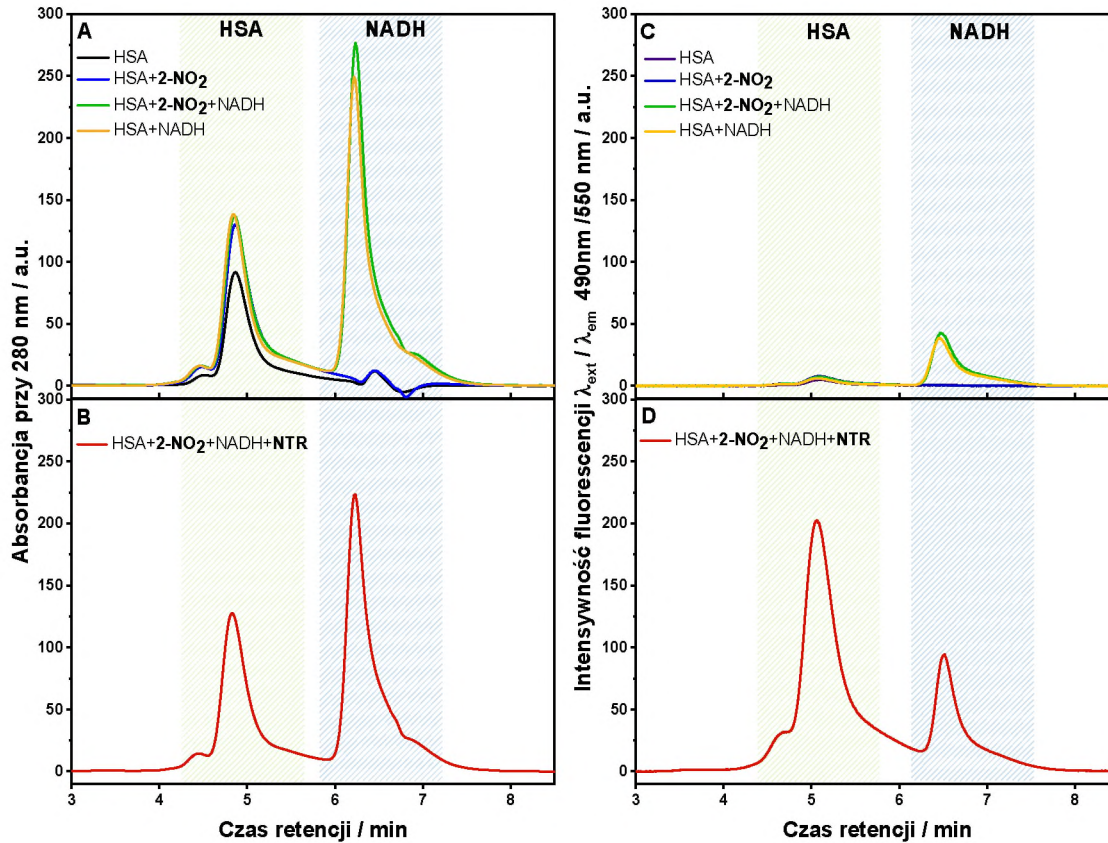
Związek	Stała asocjacji $K_{SV} [10^5 \cdot M^{-1}]$
1-NH ₂	0,758±0,006
2-NH ₂	1,874±0,022
PyTAP	0,292±0,007

Otrzymane wartości K_{SV} wiązania sond przez HSA są rzędu $10^4 - 10^5 M^{-1}$, co wskazuje na mocne oddziaływanie z białkiem. Biomolekularne stałe wygaszania k_q wynoszą znacznie więcej niż $10^{10} M^{-1}s^{-1}$, co świadczy o statycznym mechanizmie wygaszania. Oddziaływanie związku **2-NH₂** z białkiem było wyraźnie mocniejsze niż **1-NH₂**, może to być związane z występowaniem alkinowego łącznika pomiędzy strukturą pirazyntriazapentalenową a grupą aminofenyłową, dzięki któremu możliwa była głębsza penetracja związku i oddziaływanie z większą ilością reszt aminokwasowych w albuminie. Niezmodyfikowany szkielet sond **PyTAP** oddziaływał z białkiem wyraźnie najslabiej, co również można wytłumaczyć zwartą strukturą skondensowanych pierścieni, które nie mogą wnikać w głąb białka i oddziałują jedynie z aminokwasami na powierzchni HSA. Wartości stałej asocjacji dla tworzenia adduktów badanych związków z HSA dobrze korelują ze wzmocnieniem fluorescencji sond w obecności albuminy. Najprawdopodobniej wiązanie badanych związków z HSA powoduje ich ochronę przed zewnętrznymi cząsteczkami wody, zapobiegając tym samym ich wygaszeniu [202]. Również stała dielektryczna w środowisku

białka jest znacznie niższa niż w wodzie [203], co wiąże się ze wzrostem wydajności kwantowej fluorescencji. Konwersja związków, które nie są fluorescencyjne w roztworze wodnym w wysoce emisyjne w obecności HSA, była już wcześniej opisywana dla innych fluoroforów [204]. Można więc postulować, że zachodzi w tym przypadku analogiczny efekt jak znany w literaturze efekt wzmocnienia fluorescencji indukowany białkiem (ang. *protein-induced fluorescence enhancement* PIFE), który używany jest w głównej mierze do opisanego wzrostu intensywności fluorescencji, gdy białko wiąże się z kwasem nukleinowym w sąsiedztwie sondy fluorescencyjnej [205–207].

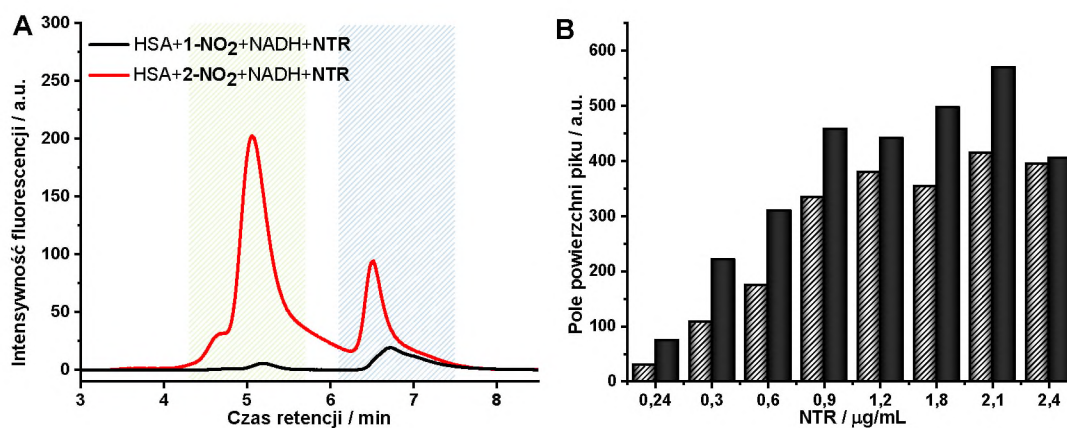
Oprócz korzystnego wpływu HSA na właściwości emisyjne sond może mieć ona również niekorzystny wpływ na biodostępność sond oraz zaburzać jej odpowiedź na NTR. W związku z tym istotne wydaje się być zbadanie zdolności redukcji sond przez NTR w obecności HSA. Reakcję redukcji prowadzono w obecności białka w stosunku molowym sonda/HSA 1:1 w warunkach równowagi z powietrzem, a postęp monitorowano przy użyciu HPLC z zastosowaniem sączenia molekularnego (SEC, ang. *size exclusion chromatography*). Pik pochodzący od HSA monitorowano przy czasie retencji równym 4,82 lub 5,06 min wykorzystując odpowiednio detektor DAD (280 nm) lub fluorescencyjny ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$). Dłuższy czas retencji przypisano związkowi niskocząsteczkowemu, w szczególności NADH (**Rysunek 4.1.19**).

Jak wyraźnie pokazano na **Rysunku 4.1.19** oraz **Rysunku 4.1.20A**, NTR może redukować obie sondy w obecności HSA, jednak tylko w przypadku **2-NO₂** zaobserwowano wyraźne wzmocnienie fluorescencji. Piki rejestrowane poprzez pomiar absorbancji nie wykazały istotnych różnic podczas redukcji, natomiast śledząc fluorescencję już po godzinnej inkubacji sondy **2-NO₂** z NADH, NTR oraz HSA zidentyfikowano intensywny pik pochodzący od adduktu HSA-zredukowana sonda (**Rysunek 4.1.19 D**). Redukcja grupy nitrowej była zdecydowanie wolniejsza niż przy braku białka, co może wynikać z utrudnionej dostępności reszty nitrowej. W warunkach doświadczalnych obserwowano stopniowy wzrost obserwowanej emisji nawet do 24 h podczas inkubacji z NTR w obecności HSA, natomiast przy braku białka reakcja zakończyła się po ok. 0,5 h. Sygnał fluorescencji zależał znacząco zarówno od stężenia NTR, jak i czasu inkubacji (**Rysunek 4.1.20**).



Rysunek 4.1.19 Porównanie chromatogramów przedstawiających rozdział HSA (16 μ M) inkubowanej w obecności 2- NO_2 (16 μ M), NADH (160 μ M), (A, C) lub ich mieszaninie w obecności NTR (2,4 μ g/ml) (B,D) przez 1 godzinę. Chromatogramy zarejestrowano stosując detektor DAD przy 280 nm (A, B) oraz detektor fluorescencyjny o $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 550$ nm (C, D) Warunki eksperymentalne: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), $T = 37^\circ\text{C}$.

Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że oddziaływanie sond z białkiem ma korzystny wpływ na właściwości fotofizyczne, co jest kluczowe w kontekście badań biologicznych, ponieważ środowisko komórkowe jest pełne różnorodnych białek, które mogą wspomagać fluorescencje zredukowanych sond. Dodatkowo nie zaobserwowano niekorzystnego wpływu albuminy na dostępność sond dla NTR ani utrudnionej aktywacji sond do wysoce fluorescencyjnej formy. Do tej pory w literaturze ten aspekt badań nad sondami fluorescencyjnymi czułymi na niedotlenienie nie był jeszcze badany, a wydaje się niezwykle istotny.

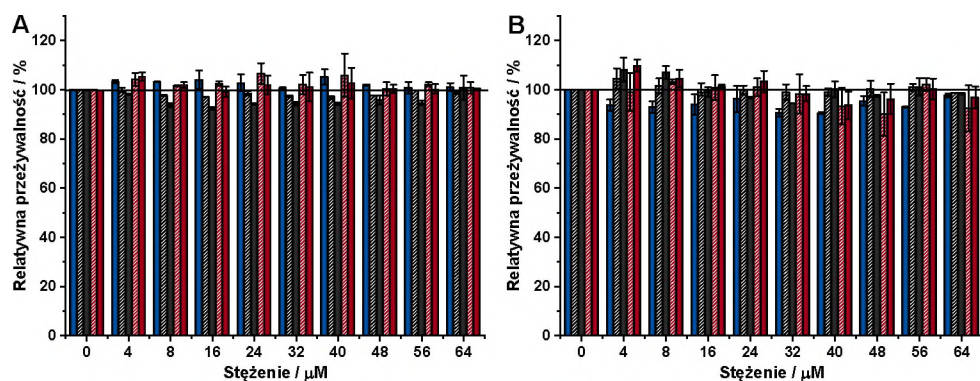


Rysunek 4.1.20 A) Porównanie chromatogramów przedstawiających redukcję 1-NO₂ lub 2-NO₂ (16 μM) w obecności NADH (160 μM), NTR (2,4 μg/ml) oraz HSA (16 μM) po 1 godzinie. B) Piki powierzchni odpowiadające pikom otrzymanym dla mieszaniny 2-NO₂ (16 μM), NADH (160 μM), HSA(16 μM) oraz różnych stężeń NTR po 4 h (słupki kreskowane) lub 24 h (słupki pełne) prowadzenia redukcji. Chromatogramy zarejestrowano stosując detektor fluorescencyjny o $\lambda_{ex} = 490$ nm i $\lambda_{em} = 550$ nm; warunki eksperymentalne: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), $T = 37^{\circ}\text{C}$.

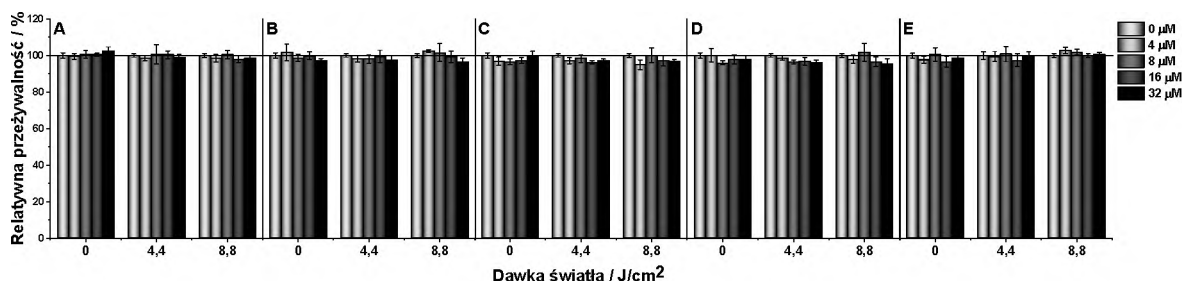
4.1.5 Cytotoksyczność i fotostabilność sond *in vitro*

Do oceny właściwości fluorescencyjnych obu sond *in vitro* wybrano wysoce przerzutową linię komórkową ludzkiego czerniaka A2058. Występowanie niedotlenionej tkanki w czerniaku jest zjawiskiem powszechnym i jest odpowiedzialne za lekooporność. Ponadto istnieje silna korelacja między hipoksją a złym rokowaniem pacjentów oraz powstawaniem przerzutów nowotworowych [208]. Badania biologiczne *in vitro* prowadzono w warunkach normoksji (21% pO₂), w warunkach hipoksji, które wytworzono przy użyciu komory do hipoksji (1% pO₂) oraz w obecności chemicznego induktora hipoksji, deferoksaminy (DFO), którą zastosowano do wywołania hipoksji w warunkach normoksji. Deferoksamina jest chelatorem żelaza, którego brak w komórce może indukować akumulację białka będącego regulatorem odpowiedzi komórkowej na hipoksję - HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*) [28, 29]. Zastosowanie sond wrażliwych na hipoksję *in vitro* wymaga nietoksycznych dawek związków. Testy cytotoksyczności sond po 24 h akumulacji zbadano przy użyciu znacznika żywotności komórek, resazuryny. Niefluoryzująca resazuryna po akumulacji w żywych metabolicznie aktywnych komórkach zostaje zredukowana do fluorescencyjnej rezorufiny [209]. Dodatkowo przeprowadzono pomiar fotocytotoksyczności, w którym po 24 h akumulacji sond, komórki naświetlano monochromatycznym światłem o długości 465 nm, a następnie przeprowadzono testy żywotności.

Uzyskane wyniki przedstawione na **Rysunku 4.1.21** oraz **Rysunku 4.1.22**, wskazują, że wszystkie badane związki nie były ani cytotoksyczne, ani fotocytotoksyczne, a żywotność komórek nie była zaburzona nawet przy bardzo wysokich stężeniach sond wynoszących 64 μM . W warunkach hipoksji również nie zaobserwowano żadnego efektu toksycznego sond.



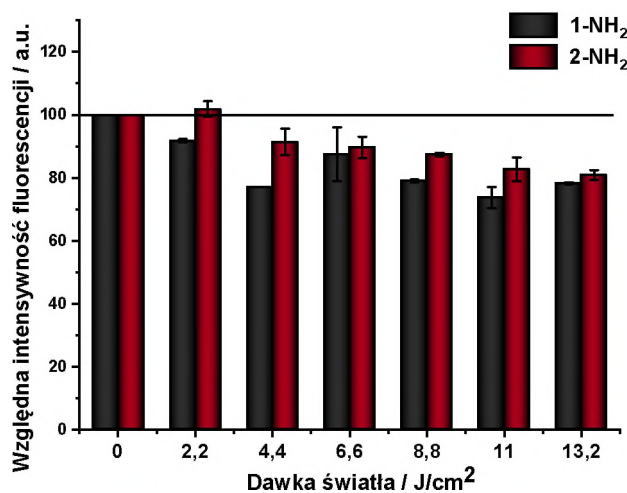
Rysunek 4.1.21 Przeżywalność komórek linii komórkowej A2058 inkubowanych przez 24 godziny z sondą 1-NO₂ (słupki czarne kreskowane), 1-NH₂ (słupki czarne pełne), 2-NO₂ (słupki czerwone kreskowane) 2-NH₂ (słupki czerwone pełne) i PyTAP (słupki niebieskie) w warunkach normoksji (A) i warunki hipoksji (B). Żywotność komórek oceniano testem resazuryiny.



Rysunek 4.1.22 Fotocytotoksyczność sond 1-NO₂ (A), 1-NH₂ (B), 2-NO₂ (C) 2-NH₂ (D) i PyTAP (E) wobec A2058 mierzona po 24 h od naświetlania w warunkach normoksji. Żywotność komórek oceniano za pomocą testu resazuryiny. Komórki naświetlane światłem o długości fali 465 nm; moc lampy 7,35 mW/cm^2 .

Fotostabilność pochodnych aminowych obu sond 1-NH₂ i 2-NH₂ oceniano również w warunkach *in vitro*. Komórki po 24-godzinnej inkubacji ze związkami naświetlano światłem o długości fali 465 nm i mocy lampy 7,35 $\text{mW} \times \text{cm}^{-2}$ przez różne czasy, a następnie monitorowano intensywność fluorescencji, stosując czytnik mikroplętek. Obie pochodne aminowe były fotostabilne po akumulacji w komórkach, a degradacja wynosiła mniej niż 20% po długotrwałym naświetlaniu wysokimi dawkami światła (**Rysunek 4.1.23**).

Brak fotowysyblenia potencjalnych produktów redukcji sond przez NTR w mikrośrodowisku komórkowym umożliwia długotrwałą obserwację mikroskopową sond przy dużym natężeniu lampy.

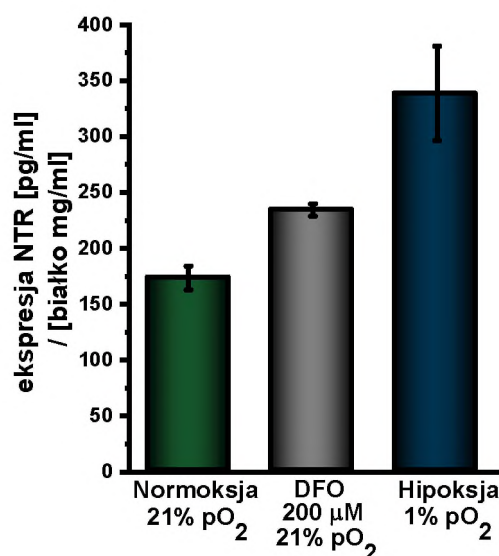


Rysunek 4.1.23 Fotostabilność *in vitro* 1-NH₂ (czarny) i 2-NH₂ (czerwony) (40 μM) w komórkach A2058 monitorowana poprzez rejestrację zmian intensywności fluorescencji ($\lambda_{ex} = 447 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$) po naświetlaniu przy 465 nm. Moc lampy 7,35 mW/cm².

4.1.6 Wykrywanie nitroreduktaz *in vitro*

Pomimo dużego zainteresowania badaczy obrazowaniem niedotlenienia poprzez sondy fluorescencyjne czułe na oksydoreduktazy, zaskakująco mało informacji jest na temat oznaczenia ilościowego tych enzymów w komórkach i tkankach w warunkach normoksji oraz hipoksji. Znikoma ilość badań skupia się na badaniu poziomu ekspresji i aktywności oksydoreduktaz, a następnie koreluje otrzymane wyniki z aktywacją sond fluorescencyjnych [77,79,210]. Wiele prac zakłada zwiększoną ekspresję oksydoreduktaz w warunkach niedotlenienia bez weryfikacji tej hipotezy, co nie jest prawidłowym stwierdzeniem dla wszystkich typów linii komórkowych [77].

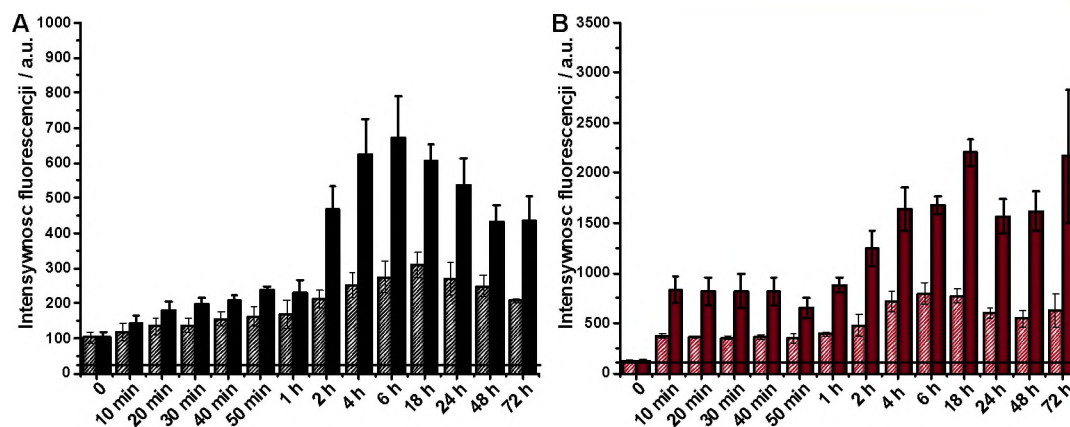
W świetle powyższych informacji oraz faktu, że według naszej najlepszej wiedzy, nigdy nie oceniano ekspresji nitroreduktazy w komórkach A2058, pierwszym krokiem w badaniach było określenie ilości NTR w lizatach komórkowych w zależności od poziomu tlenu w komórkach. Poziom białka określono przy użyciu komercyjnie dostępnego testu ELISA czułego na ludzką nitroreduktazę. Wszystkie komórki poddano lizie, po 24 godzinach wzrostu w warunkach normoksji (21% pO₂), pod nieobecność, jak i w obecności 200 μM DFO (deferoksaminy), jak również w warunkach hipoksji (1% pO₂).



Rysunek 4.1.24 Ekspresja NTR w A2058 mierzona testem ELISA po 24 - godzinnej ekspozycji komórek na warunki fizjologiczne (normoksja, 21% pO_2), warunki obniżonego stężenia tlenu (hipoksja, 1% pO_2) lub po 24- godzinnej inkubacji z 200 μM desferoksaminą (DFO) w normoksji.

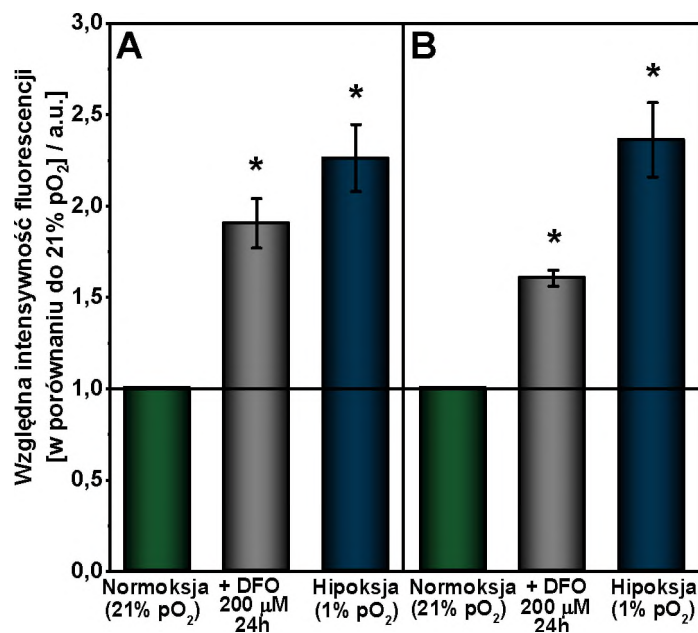
Jak pokazano na **Rysunku 4.1.24**, komórki A2058 wytwarzały nitroreduktazę w warunkach normoksji, a jej ilość wzrosła prawie dwukrotnie, gdy hodowlę prowadzono w warunkach hipoksji. Dodatkowo ilość NTR była również podwyższona, gdy hipoksję indukowano chemicznie poprzez DFO, ale wzrost ten był znacząco mniejszy niż w hipoksji wytworzonej w komorze do hodowli. Dane te jednoznacznie potwierdzają, że niedotlenienie może prowadzić do wzmocnienia ekspresji NTR w komórkach A2058. Niestety, wadą zastosowanego zestawu ELISA jest potrzeba przeprowadzenia lizy komórek, natomiast sondy **1-NO₂** i **2-NO₂** zostały zaprojektowane do identyfikacji zmian związanych z hipoksją w nienaruszonych komórkach za pomocą czytnika płytek lub cytometru przepływowego.

W celu optymalizacji czasu inkubacji sond w komórkach i ich stężenia zbadano akumulację związków w badanej linii komórkowej w zależności od czasu i stężenia. Obie sondy gromadziły się w komórkach A2058 szybko i wydajnie, a ich poziomy pozostawały niezmiennie przez pierwszą godzinę (**Rysunek 4.1.25**). Wyraźny wzrost intensywności fluorescencji komórek wykryto po 2 h inkubacji, można to wytłumaczyć nie tylko akumulacją sond, ale także z ich konwersją katalizowaną przez NTR do formy bardziej fluorescencyjnej. Dlatego do dalszych eksperymentów jako optymalny czas inkubacji wybrano 2 godziny, a stężenie 2 μM . Inkubacja komórek z **2-NO₂** skutkowała wykryciem znacznie wyższego sygnału fluorescencji niż dla **1-NO₂**, co może być wynikiem wcześniej opisywanego efektu wzmocnienia fluorescencji indukowanej przez białko obserwowanego głównie dla **2-NO₂** w obecności albuminy.



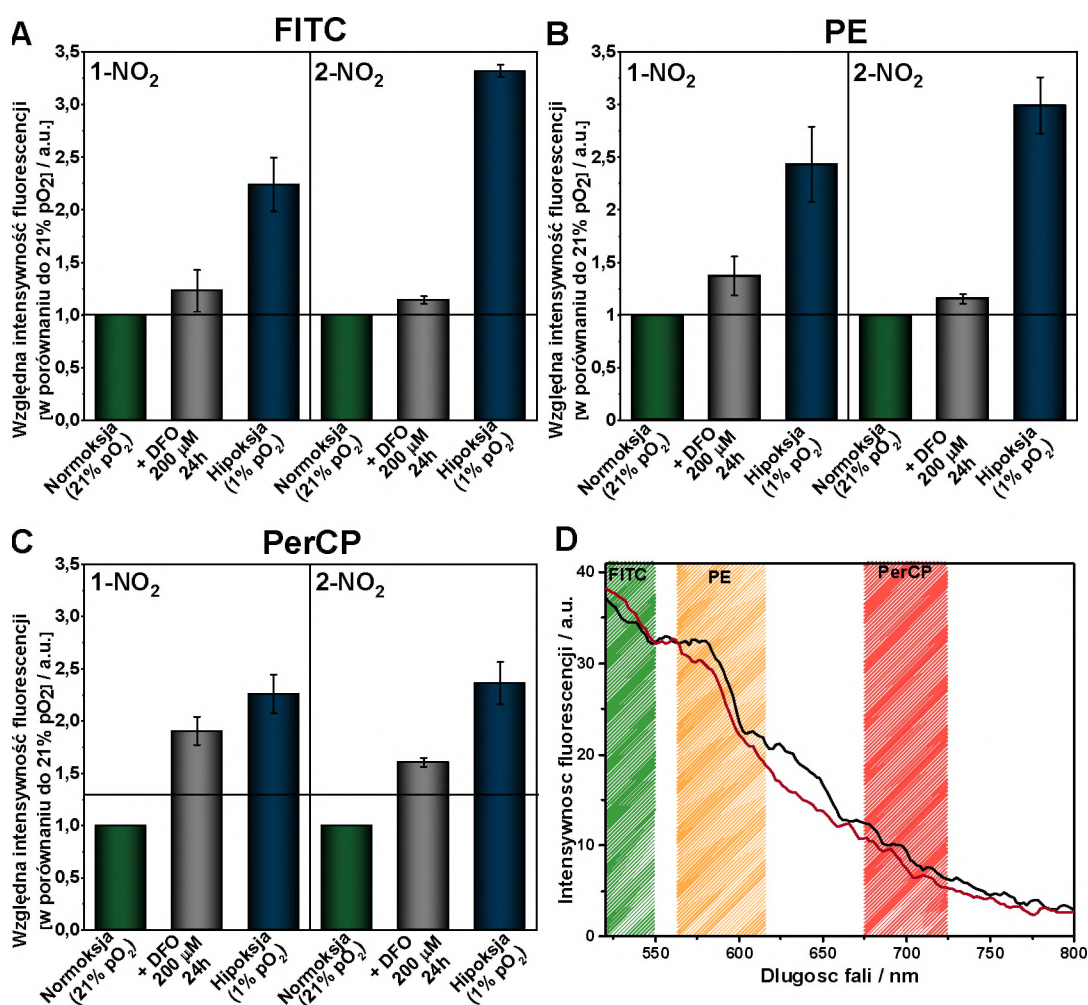
Rysunek 4.1.25 Intensywność fluorescencji komórek A2058 inkubowanych z 1-NO₂ (A) i 2-NO₂ (B) o stężeniu 2 μM (słupki kreskowane) i 8 μM (słupki pełne) przez różny czas w warunkach normoksji. 0 określono jako kontrolę. (Pomiar przy użyciu cytometrii przepływowej, λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 527±16 nm).

W celu sprawdzenia użyteczności obu sond 1-NO₂ oraz 2-NO₂ do różnicowania komórek w hipoksji od komórek w normoksji związki inkubowano z komórkami przez 2 godziny. Następnie komórki przemyto buforem PBS, oddzielono przy użyciu trypsyny, ponownie zawieszono w PBS i analizowano przy użyciu cytometru przepływowego. Jak pokazano na **Rysunku 4.1.26**, zaobserwowano wyraźną różnicę między komórkami hodowanymi w normoksji, a komórkami hodowanymi w warunkach niedotlenienia.



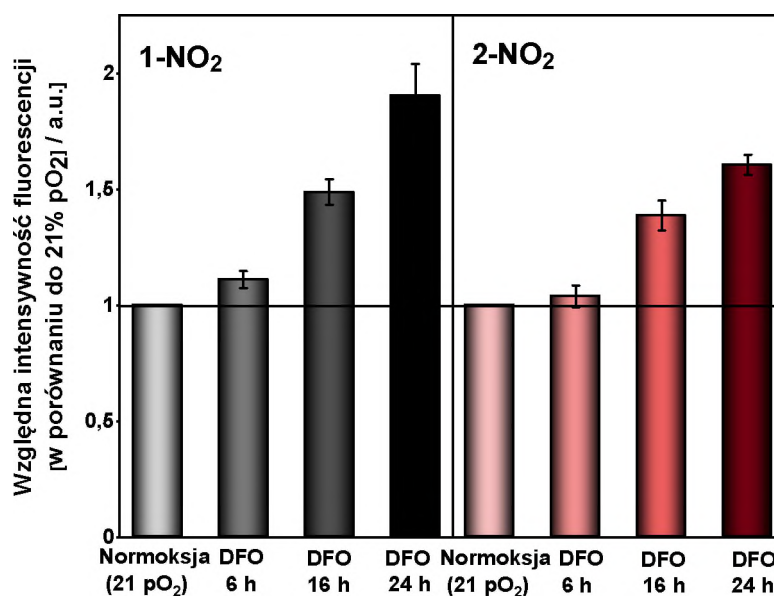
Rysunek 4.1.26 Względna intensywność fluorescencji komórek A2058 inkubowanych 2 godziny z 1-NO₂ (A) oraz 2-NO₂ (B) (2 μM) w warunkach obniżonego stężenia tlenu (1%) lub z komórkami wstępnie inkubowanymi z 200 μM deferoksaminą (DFO) przez 24 godziny w normoksji (21%) w porównaniu do komórek utrzymywanych w normoksji (21%). Pomiar wykonany przy użyciu cytometrii przepływowej (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 700±27 nm). *p < 0,05.

Intensywność fluorescencji wyraźnie wzrastała wraz ze spadkiem stężenia tlenu, a uzyskane wyniki wskazały, że za obserwowane sygnały odpowiedzialna jest redukcja obu sond. Należy zauważyć, że przy wzbudzeniu przy 488 nm można wykryć emisję z komórek na różnych kanałach: FITC (488/527±16 nm), PE (488/586±21 nm) lub PerCP (488/700±27 nm) ze względu na wystarczającą emisję nawet przy dłuższych długościach fal (**Rysunek 4.1.27**). Obserwacja fluorescencji przy dłuższych długościach fali pozwala zminimalizować efekt autofluorescencji pochodzącej z komórek.



Rysunek 4.1.27 Względna intensywność fluorescencji komórek A2058 inkubowanych 2 godziny z 1-NO₂ oraz 2-NO₂ (2 μM) w warunkach obniżonego stężenia tlenu (1% O₂) lub z komórkami wstępnie inkubowanymi z 200 μM deferoksaminą (DFO) przez 24 godziny w normoksji (21% O₂) w porównaniu do komórek utrzymywanych w normoksji (21% O₂). Pomiar wykonano za pomocą cytometrii przepływowej w różnych konfiguracjach optycznych (λ_{ex}/λ_{em}): **A** – FITC (488/527±16 nm), **B** – PE (488/586±21 nm), **C** – PerCP (488/700±27 nm). **D** – Widma emisyjne komórek A2058 (λ_{ex} = 488 nm) inkubowanych 2 godziny z 1-NO₂ (kolor czarny) lub 2-NO₂ (kolor czerwony) w warunkach normoksji (pO₂ 21%),

Co więcej, zastosowanie DFO jako chemicznego induktora hipoksji również doprowadziło do wyraźnego wzmocnienia intensywności fluorescencji. Pomimo, iż ten efekt był niższy niż przy klasycznie wytworzonym niedotlenieniu w komorze do hodowli, nadal umożliwiało to wyraźne odróżnienie od komórek hodowanych w normoksji. Efekt wzmocnienia fluorescencji był zależny od czasu inkubacji komórek z DFO (**Rysunek 4.1.28**). Jak wykazano 6-godzinna inkubacja z DFO, nie była wystarczająca do wywołania hipoksji w komórkach, natomiast już po 16 h otrzymano wyraźne niedotlenienie.

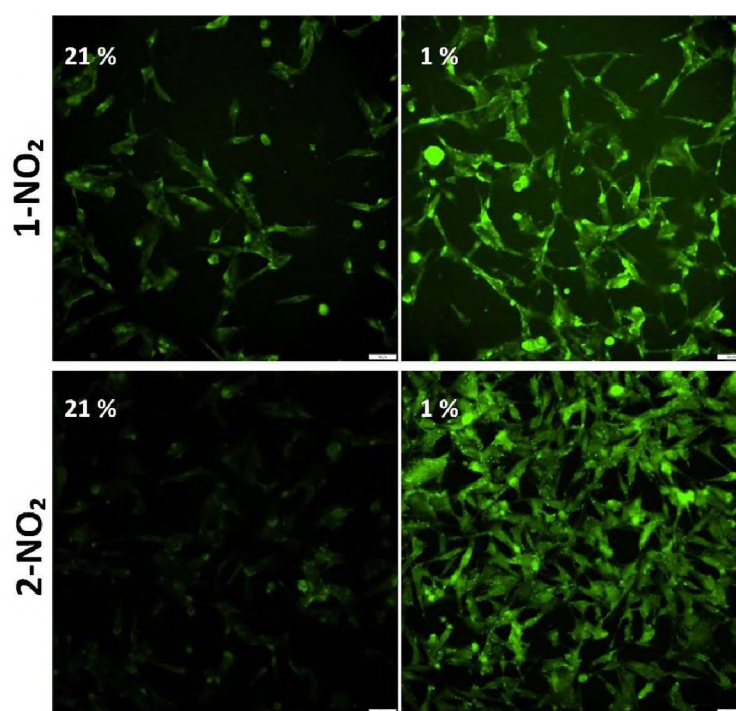


Rysunek 4.1.28 Względna intensywność fluorescencji 1-NO₂ (A) oraz 2-NO₂ (B) (2 μM) inkubowanych przez 2 godziny z komórkami A2058 wcześniej inkubowanymi z 200 μM deferoksaminą (DFO) przez 6, 16 lub 24 godziny w normoksji (pO₂ 21%) w porównaniu z komórkami utrzymywanymi w normoksji wyznaczona za pomocą cytometrii przepływowej ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 700 \pm 27 \text{ nm}$).

Redukcja sond zachodziła we wszystkich badanych warunkach, jednak najbardziej wyraźna była w warunkach hipoksji ze względu na nadekspresję oksydoreduktaz w odpowiedzi na hipoksję. Jak pokazaliśmy na **Rysunku 4.1.24**, NTR ulegała nadekspresji w takich samych warunkach w komórkach A2058, a więc można wnioskować, że to ona była odpowiedzialna za efektywną redukcję badanych sond. Zaprojektowane czujniki pozwalają na szybką ocenę różnicy w zawartości NTR dla różnych próbek komórek bez konieczności specjalistycznego przygotowania próbek.

Oprócz detekcji niedotlenienia, za pomocą czytnika płytek i cytometru przepływowego, sondy można obserwować również przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Komórki A2058 inkubowane z obydwoma sondami w warunkach normoksji wykazywały słabą fluorescencję, podczas gdy komórki traktowane taką samą ilością 1-NO₂ lub 2-NO₂

i hodowane w hipoksji przed barwieniem, wykazywały bardzo wyraźną emisję (**Rysunek 4.1.29**). Jest to bezpośredni dowód na to, że fluorescencja jest aktywowana w warunkach niedotlenienia. Dane te dobrze ilustrują dokładniejsze i bardziej czułe pomiary, które zostały wykonane za pomocą cytometru przepływowego lub czytnika płytek. Ponadto można postulować, że obserwowana różnica fluorescencji jest wystarczająco duża, aby wizualnie porównać dwie tkanki o różnej aktywności NTR przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Oczywiście potrzebne są dalsze badania *in vivo*, aby ocenić, czy wykrywanie endogennego NTR przez obie sondy można skorelować z występowaniem hipoksji oraz, czy jest możliwość zastosowania sond **1-NO₂** oraz **2-NO₂** do monitorowania stanu hipoksji komórek nowotworowych.

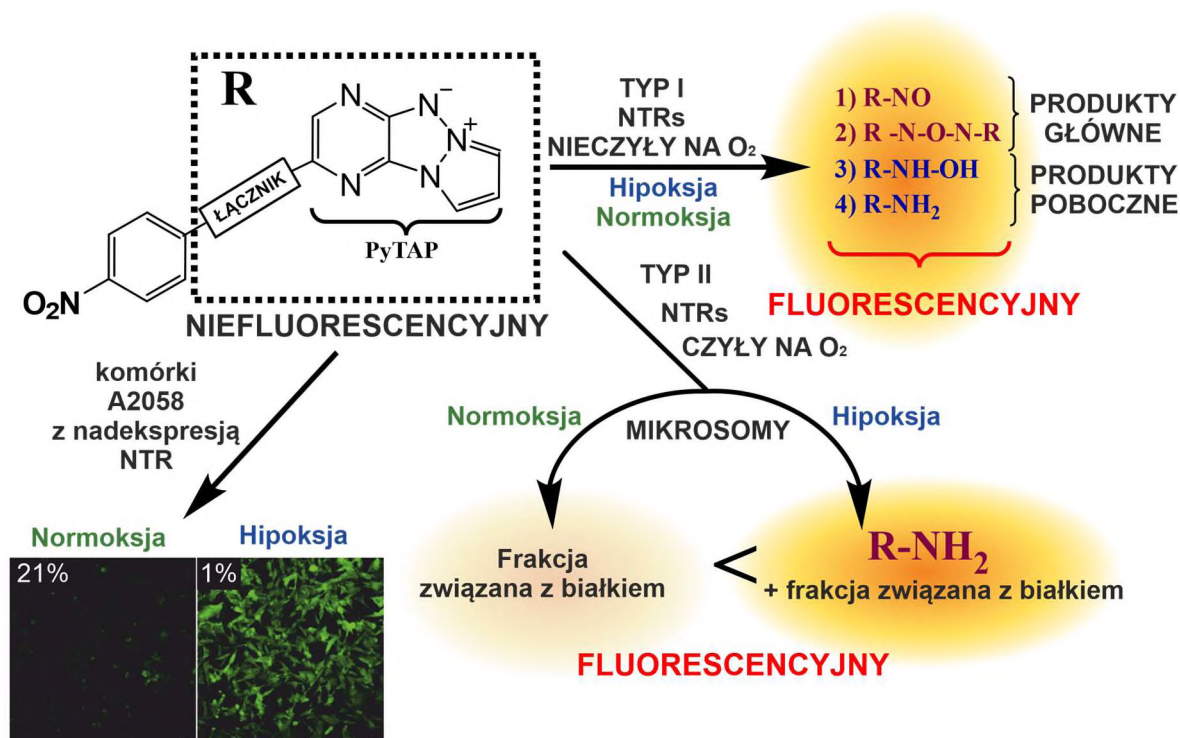


Rysunek 4.1.29 Zdjęcia fluorescencyjne komórek A2058 hodowanych w warunkach normoksji (21% pO₂) oraz hipoksji (1% pO₂) 24 godziny przed traktowaniem **1-NO₂** lub **2-NO₂** (8 μM) przez 2 godziny.

4.1.7 Podsumowanie

W tej części pracy wykazano, że badane związki oparte na połączeniu bioredukcyjnej nitroaromatycznej grupy z resztą triazapentalenową wykazują bardzo dobre właściwości fotochemiczne pod kątem wykorzystania ich do nieinwazyjnego obrazowania komórek w stanie hipoksji, w którym występuje nadekspresja nitroreduktaz (**Rysunek 4.1.30**). Obie badane sondy wykazywały słabą fluorescencję, natomiast w obecności NTR zarówno typu I oraz II były efektywnie redukowane do wysoce fluorescencyjnych produktów. Wykazano, że reakcja była czuła, efektywna i selektywna względem NTR, a tworzenie produktów jest wprost proporcjonalne do ilości enzymu w układzie, przy granicy wykrywalności wynoszącej zaledwie 20 - 30 ng/mL. W przypadku wrażliwych na tlen NTR obecnych w mikrosomach, warunki hipoksji pozwoliły na całkowitą redukcję pochodnej nitrowej do jej odpowiednika aminowego, czego nie zaobserwowano w normoksji. Dodatkową zaletą tych zredukowanych produktów jest niezależność fluorescencji od zawartości tlenu w środowisku. Warto zauważyć że, obecność ludzkiej albuminy surowiczej nie hamowała ich redukcji przez NTR, co jest bardzo pożądanym efektem ze względu na mnogość struktur białkowych występujących w układach biologicznych. Dodatkowo obecność białka znacząco poprawiła właściwości fotochemiczne sond w środowisku wodnym, co dodatkowo umożliwia zastosowanie mniejszych stężeń sond. Jednym z możliwych mechanizmów oddziaływania białka z sondami to opisywany w literaturze efekt wzmocnienia fluorescencji indukowany białkiem, który szczególnie mocno widoczny jest dla sondy **2-NO₂**. Ponadto badania *in vitro* na ludzkiej linii komórkowej czerniaka A2058 wykazały, że sondy łatwo i szybko akumulują się w komórkach nowotworowych, nie wykazując toksyczności wobec komórek gospodarza w zakresie stężeń niezbędnym do ich zastosowania. Uzyskane dane wyraźnie wskazują, że endogenna NTR jest związana z warunkami hipoksji, a badane sondy były w stanie ocenić stan niedotlenienia w komórkach nowotworowych. Dodatkowo zaletą tych sond jest fakt, że ilościowe pomiary hipoksji w komórkach można osiągnąć za pomocą czytnika płytek lub cytometrii przepływowej, ale również można ją ocenić wizualnie poprzez obrazowanie komórek za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, co czyni je niezwykle uniwersalnym narzędziem. To ostatnie podejście może być pomocne w porównaniu tkanek pobranych podczas biopsji guza. Oczywiście należy mieć na uwadze, że potrzebne są dalsze badania *in vivo* na poparcie tego twierdzenia.

Podsumowując połącznie dobrych właściwości fotochemicznych, wysokiej fotostabilności, braku fotocytotoksyczności oraz wydajnej akumulacji wraz z silną korelacją pomiędzy nasileniem fluorescencji i hipoksją w komórkach wskazują na wysoki potencjał sond **1-NO₂** i **2-NO₂** do oceny środowiska hipoksji w badaniach biomedycznych.



Rysunek 4.1.30 Schematyczne przedstawienie głównych wyników uzyskanych dla badanych sond.

Przedstawione w tym rozdziale badania weszły w skład publikacji:

E. Jancy-Cempa, O. Mazuryk, D. Sirbu, N. Chopin, M. Żarnik, M. Zastawna, C. Colas, M.A. Hiebel, F. Suzenet, M. Brindell "Nitro-pyrazinotriazapentalene scaffolds–nitroreductase quantification and *in vitro* fluorescence imaging of hypoxia" *Sensors & Actuators: B. Chemical*, **2021**, 346, 925–4005, doi.org/10.1016/j.snb.2021.13054

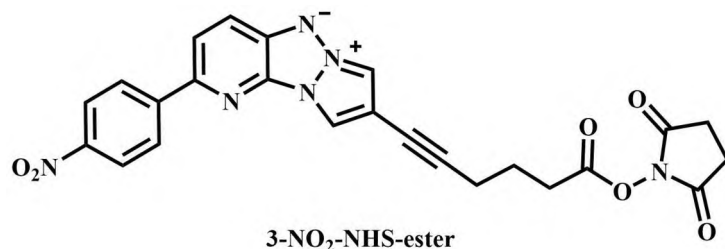
4.2 Biokoniugacja sondy o rusztowaniu nitropirazynotriazapentalenowym z holo-transferyną w celu selektywnego obrazowania niedotlenionych komórek nowotworowych

Ze względu na obecność oksydoreduktaz w każdej komórce niezależnie, czy zdrowej czy nowotworowej, do zwiększenia selektywności związków aktywowanych w komórkach nowotworowych należy zastosować odpowiedni system dostarczania leków ukierunkowany w właśnie na te komórki. Co więcej, dostarczenie związków fluorescencyjnych do obrazowania hipoksji jest dodatkowo utrudnione ze względu na brak odpowiedniego unaczynienia w obrębie guza.

Jedną z metod selektywnego dostarczania leków lub sond optycznych do komórek nowotworowych jest wykorzystanie transferyny, jako naturalnego nośnika. Komórki nowotworowe ze względu na nieprawidłową proliferację i intensywną syntezę DNA wykazują zwiększone zapotrzebowanie na żelazo w porównaniu do komórek zdrowych [119]. Aby sprostać tym wymaganiom, komórki nowotworowe wykazują nadekspresję białek zaangażowanych w metabolizm żelaza, zwłaszcza receptora transferyny (TfR), którego rolą jest dostarczanie żelaza do wnętrza komórki poprzez wiązanie się z glikoproteiną osocza, holo-transferyną (holo-Tf) [120]. TfR ulega ekspresji w komórkach nowotworowych na poziomie wielokrotnie wyższym niż w komórkach prawidłowych, a jego ekspresja jest skorelowana ze stadium rozwoju nowotworu i jego progresją. Dodatkowo aktywność TfR jest regulowana między innymi przez hipoksję, która indukuje transkrypcję genu TFR1 [211]. Z tych powodów TfR jest atrakcyjnym celem w diagnostyce i leczeniu nowotworów.. Jego naturalny ligand, holo-Tf, jest wybierana jako ligand do koniugacji leków lub związków diagnostycznych, co poprawia ich internalizację i selektywność w dostarczaniu do tkanki nowotworowej przy jednoczesnej minimalizacji efektów ubocznych [123].

Biorąc pod uwagę opisane powyżej wymagania dotyczące obrazowania komórek nowotworowych oraz bazując na wcześniejszych wynikach, w tym rozdziale przedmiotem rozważań jest biokoniugat holo-Tf z sondą, będącą analogiem do wcześniej badanych związków opartych na pirazyno-1,3a,6a-triazapentalenie, reagujących na stężenie nitroreduktazy. Celem takiego połączenia było zwiększenie jej selektywnego dostarczania do komórek nowotworowych poprzez wykorzystanie TfR oraz wzmocnienie sygnału fluorescencyjnego w komórkach hipoksycznych ze względu na zwiększoną ekspresję NTR. Holo-transferyna została wybrana ze względu na jej wysokie powinowactwo do TfR.

W celu biokoniugacji białko – barwnik przygotowano odpowiednią, wysoce reaktywną pochodną estrową N-hydroksysukcynimidu sondy (**3-NO₂-NHS-ester**), która zdolna jest do tworzenia wiązań kowalencyjnych z grupami aminowymi białka. Strukturę użytej sondy do biokoniugacji przedstawiono na **Rysunku 4.2.1**.

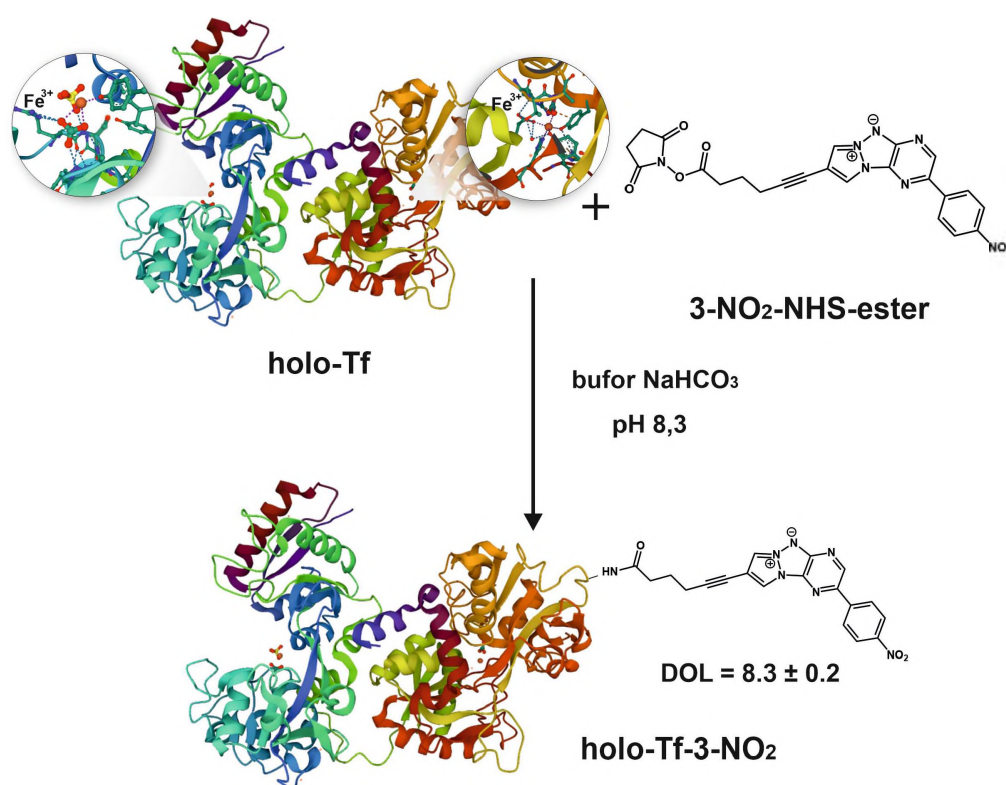


Rysunek 4.2.1 Wzór strukturalny badanego związku użytego do biokoniugacji z holo-Tf^h (**3-NO₂-NHS-ester**).

W tej części pracy zoptymalizowano tworzenie biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂**, dokonano jego charakterystyki oraz oceniono jego zdolność do oznaczania poziomu niedotlenienia w warunkach *in vitro* na ludzkiej linii komórkowej wysoce inwazyjnego czerniaka A2058 oraz zbadano działanie na niego oksydoreduktaz typu I oraz typu II w roztworze. Dla zsyntezowanego biokoniugatu zbadano cytotoksyczność oraz zdolność do akumulacji w komórkach nowotworowych. Badania *in vitro* koncentrują się na ocenie właściwości obrazowania biokoniugatu wraz z wykazaniem jego wychwytu poprzez endocytozę indukowaną receptorem transferynowym. Badania nad biokoniugatem miały na celu określenie jego potencjału do detekcji komórek nowotworowych wykazujących zwiększoną ekspresję TfR1 w stosunku do komórek nie wykazujących takich właściwości, z jednoczesnym wykrywaniem różnic w poziomie oksydoreduktaz komórek hodowanych w warunkach normoksji i hipoksji.

4.2.1 Biokoniugacja holo-transferyny z sondą 3-NO₂-NHS-estrem i jego charakterystyka

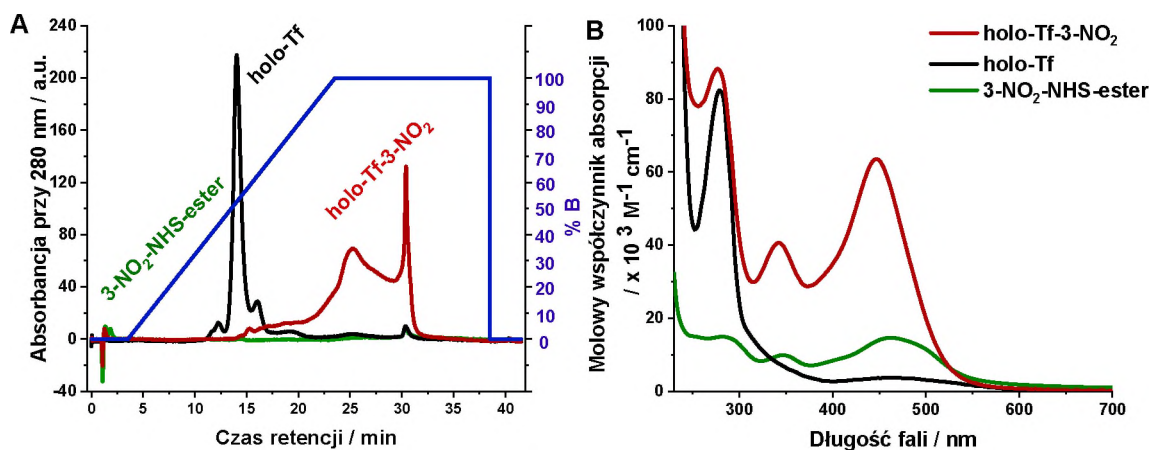
Biokoniugat **holo-Tf-3-NO₂** został przygotowany na drodze syntezy schematycznie przedstawionej na **Rysunku 4.2.2**. Zastosowana w 10-krotnym nadmiarze sonda **3-NO₂-NHS-ester** uległa sprzężeniu z holo-transferyną poprzez reakcję grupy estrowej NHS z grupą aminową reszt lizynowych obecnych w holo-Tf. Po przeprowadzeniu biokoniugacji dodano hydroksyloaminę w celu zakończenia reakcji. Hydroksyloamina łatwo łączy się z grupą estrową NHS nieprzereagowanej sondy, uniemożliwiając dalszą reakcję. Biokoniugat oczyszczono z wolnej, niezwiązanej sondy stosując metodę ultrafiltracji (filtry cut-off 30 kDa), a efektywność biokoniugacji oceniono, stosując chromatografię FPLC (*fast protein liquid chromatography*) z kolumną anionowymienną.



Rysunek 4.2.2 Przebieg reakcji biokoniugacji sondy 3-NO₂-NHS-estru z holo-transferyną (holo-Tf)

Analiza FPLC utworzonego biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** wykazała prawie całkowity brak niemodyfikowanej holo-transferyny, dla której czas retencji wynosi 15,0 min oraz brak wolnego barwnika z czasem retencji 1,9 min. Chromatogram dla biokoniugatu po oczyszczeniu wykazuje jedynie szeroki pik przypisany biokoniugatowi, dla których czas retencji mieści się w zakresie od 22 do 32 min (**Rysunek 4.2.3A**).

Tf posiada 58 reszt lizynowych [212], należy więc się spodziewać, że więcej niż jedna z grup aminowych jest sprzężona z sondą, a otrzymany produkt jest mieszaniną transferyny zmodyfikowanej w różnym stopniu, co tłumaczy obserwowany szeroki pik dla biokoniugatów **holo-Tf-3-NO₂**. Poszczególne biokoniugaty są eluowane w różnym pH ze względu na różne ładunki zależne od stopnia modyfikacji białka sondą. W celu scharakteryzowania średniej ilości cząsteczek sondy sprzężonych z białkiem wyznaczono stopień wiązania barwnika do białka (DOL), który wynosił $8,3 \pm 0,2$. Widma absorpcyjne UV-Vis (**Rysunek 4.2.3B**) również potwierdziły, że w biokoniugacie **holo-Tf-3-NO₂** do holo-Tf przyłączonych jest kilka cząsteczek sondy. Zaobserwowano niewielkie przesunięcie pasma absorpcji z 464 do 447 nm w porównaniu z niezwiązanym **3-NO₂-NHS-esterem**.

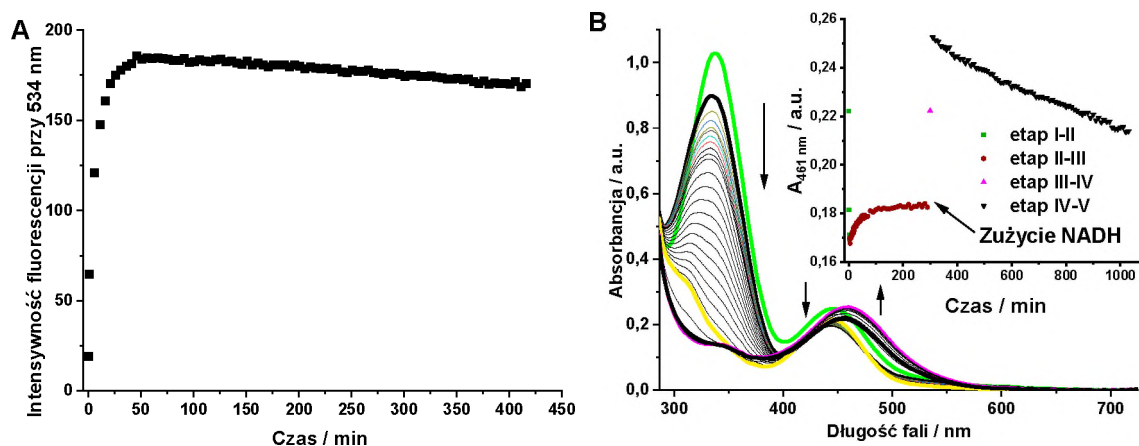


Rysunek 4.2.3 A) Porównanie chromatogramów dla biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** (75 μ M, kolor czerwony), niemodyfikowanej **holo-Tf** (75 μ M, kolor czarny) oraz **3-NO₂-NHS-estru** (75 μ M, kolor zielony). Chromatogramy rejestrowano dla absorpcji przy 280 nm przy użyciu FPLC na kolumnie anionowymiennej Mono Q. **B)** Widma absorpcyjne UV-Vis dla biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** (kolor czerwony), **holo-Tf**, (kolor czarny) oraz **3-NO₂-NHS-estru** (kolor zielony) zarejestrowane w wodzie.

4.2.2 Ocena zdolności redukcji biokoniugatu przez nitroreduktazę typu I oraz II

W poprzednim rozdziale wykazano, że sondy triazapentalenowe z grupą nitroaromatyczną są selektywnie redukowane przez nitroreduktazy typu I oraz II do wysoce fluorescencyjnych produktów, umożliwiając tym sposobem ich detekcję w układach biologicznych. W celu zbadania zdolności redukcji biokoniugatu przez te enzymy przeprowadzono reakcję z wykorzystaniem nitroreduktazy typu I otrzymanej z *Escherichia coli*. Dodatkowo przebadano również redukcję wolnej, niezwiązanej sondy.

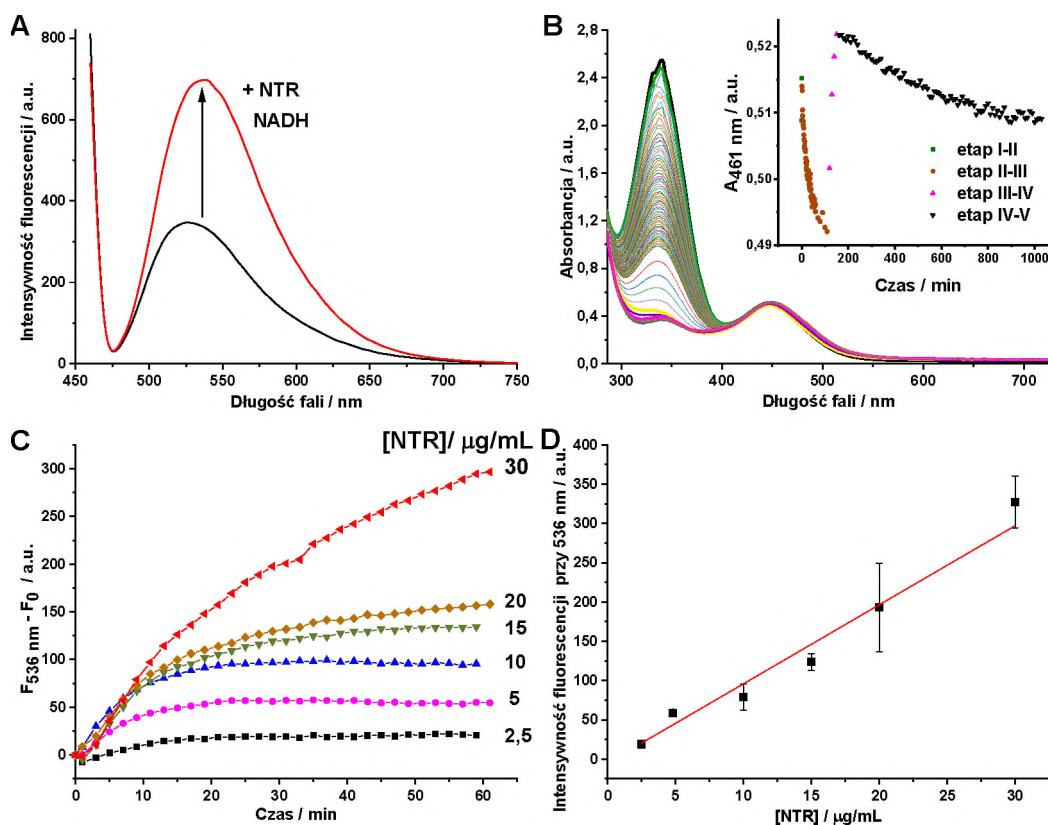
Tak samo, jak w przypadku poprzednich sond, **3-NO₂-NHS-ester**, jak również jego forma zhydrolizowana nie wykazywały praktycznie żadnej fluorescencji po wzbudzeniu w maksimum pasma absorpcji, natomiast po wspólnej inkubacji z NADH (160 μM) oraz NTR (4,8 μg/mL) zaobserwowano stopniowy, zależny od czasu wzrost fluorescencji przy 534 nm (**Rysunek 4.2.4A**). Reakcję redukcji monitorowano również spektrofotometrycznie, a otrzymane wyniki wskazują, że redukcja przebiegała kilkietapowo, w sposób analogiczny jak w przypadku wcześniej opisywanych sond (**Rysunek 4.2.4B**)



Rysunek 4.2.4 A) Zależne od czasu zmiany intensywności maksimum fluorescencji przy 534 nm dla **3-NO₂-NHS-estru** (16 μM) w obecności 160 μM NADH i NTR (4,8 μg/mL) zarejestrowane w 37°C, bufor TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM) w warunkach tlenowych **B)** Zależne od czasu zmiany w widmie absorpcyjnym dla **3-NO₂-NHS-estru** w obecności NADH (160 μM) oraz NTR (4,8 μg/mL) zarejestrowane w 37°C, bufor TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM). **Wstawka:** zmiany absorbancji zależne od czasu przy 461 nm.

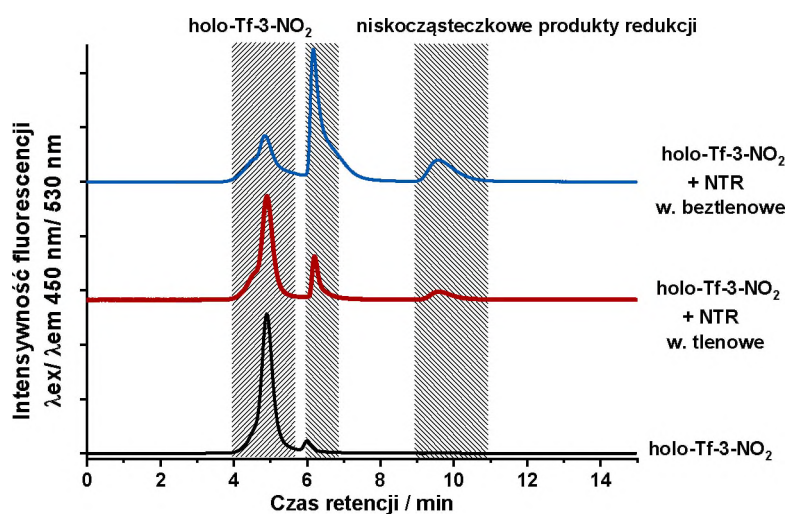
Jak wykazują powyższe dane oraz wyniki zaprezentowane w poprzednim rozdziale pochodne nitro-pirazynotriazapentalenu charakteryzują się bardzo niską fluorescencją ze względu na efektywne wygaszanie fluoroforu przez grupę nitroaromatyczną, natomiast po redukcji przez NTR przekształcają się w związki silnie emisyjne. W przeciwieństwie do wolnych sond otrzymany biokoniugat **holo-Tf-3-NO₂** wykazywał umiarkowaną fluorescencję przy 530 nm po wzbudzeniu przy 450 nm (**Rysunek 4.2.5A**). Koniugacja rusztowania nitro-pirazynotriazapentalenowego z holo-Tf zapobiega wygaszaniu fluorescencji przez cząsteczki wody dzięki penetracji fluoroforu wewnątrz hydrofobowego środowiska białka. Ponadto, białko częściowo chroni fluorofor przed wygaszaniem przez grupę nitroaromatyczną. Co ważne, intensywność fluorescencji biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** wyraźnie wzrasta po dodaniu NTR w obecności NADH, a maksimum przesunięte jest w kierunku 537 nm. Równocześnie ze wzrostem fluorescencji, w widmie absorpcyjnym obserwuje się zanik pasma przy 340 nm charakterystycznego dla NADH (**Rysunek 4.2.5B**), a zaobserwowane zmiany pasma absorpcji w zakresie widzialnym są

podobne jak dla wolnych sond. Wskazuje to jednoznacznie, że następuje redukcja grupy nitroaromatycznej w sprzężonych z holo-Tf cząsteczkach nitro-pirazynotriazapentalenu. W związku z tym można stwierdzić, że sonda sprzężona z holo-Tf zachowuje swoje powinowactwo do enzymu. Dokładniejsza analiza tego procesu wykazała, że fluorescencja **holo-Tf-3-NO₂** ulegała stopniowemu wzmocnieniu wraz ze wzrostem stężenia NTR. Dla badanego biokoniugatu uzyskano dobrą korelację liniową w zakresie stężeń 0-30 µg/mL NTR i na jej podstawie obliczono granicę wykrywalności (LOD) NTR w badanych warunkach eksperymentalnych, która wynosiła $1,28 \pm 0,01$ µg/mL (**Rysunek 4.2.5C** oraz **Rysunek 4.2.5D**). Granica wykrywalności dla biokoniugatu jest wyraźnie wyższa niż dla wcześniej analizowanych sond, prawdopodobnie ze względu na utrudniony dostęp do centrum aktywnego NTR związanych wewnątrz holo-transferyny cząsteczek sondy.



Rysunek 4.2.5 A) Widma emisyjne ($\lambda_{ex} = 450$ nm) **holo-Tf-3-NO₂** ($3,3$ µM) przed (czarna linia) oraz po (czerwona linia) reakcji z nitroreduktazą (30 µg/mL) w obecności NADH (400 µM) w warunkach równowagi z powietrzem; **B)** Zależne od czasu zmiany w widmie absorpcyjnym dla **holo-Tf-3-NO₂** ($3,3$ µM) w obecności NADH (400 µM) oraz NTR (30 µg/mL) zarejestrowane w 37°C , bufor TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM). **Wstawka:** zmiany absorbancji zależne od czasu przy 461 nm; **C)** Zależne od czasu zmiany intensywności fluorescencji ($\lambda_{ex} = 450$ nm, $\lambda_{em} = 536$ nm) **holo-Tf-3-NO₂** ($3,3$ µM) dla różnych stężeń NTR ($2,5 - 30$ µg/mL) w obecności NADH (400 µM); **D)** Korelacja pomiędzy intensywnością fluorescencji a stężeniem NTR po 60 min reakcji z **holo-Tf-3-NO₂**.

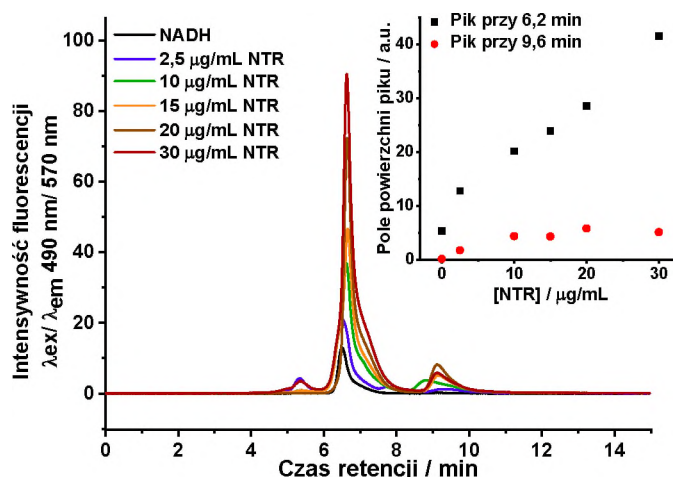
Aby dokładniej przeanalizować powstające produkty redukcji biokoniugatu, reakcję monitorowano przy użyciu HPLC z zastosowaniem kolumny do sączenia molekularnego. Pik pochodzący od biokoniugatu holo-Tf z sondą obserwowano przy czasie retencji równym 4,9 min, wykorzystując detektor fluorescencyjny ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$). Dłuższy czas retencji wynoszący powyżej 6 min można przypisać związkom niskocząsteczkowym, w szczególności NADH, który eluował przy czasie retencji równym 6,1 min. Na chromatogramach zarejestrowanych dla próbek po 24 h redukcji **holo-Tf-3-NO₂** przez NTR w warunkach tlenowych oraz beztlenowych zaobserwowano pojawienie się dwóch nowych pików o czasie retencji 6,2 min oraz 9,6 min, które świadczą o powstaniu niskocząsteczkowych produktów redukcji biokoniugatu (**Rysunek 4.2.6**). W warunkach beztlenowych zaobserwowano nieco wyższe pola powierzchni pików pochodzących od niskocząsteczkowych związków, natomiast całkowita fluorescencja była na podobnym poziomie jak w warunkach normoksji, co jest zgodne z wcześniejszymi analizami dotyczącymi redukcji przy użyciu niezależnej od tlenu NTR typu I.



Rysunek 4.2.6 Porównanie chromatogramów otrzymanych dla redukcji **holo-Tf-3-NO₂** ($3,3 \mu\text{M}$) inkubowanej tylko z NADH ($400 \mu\text{M}$) (kolor czarny) lub w obecności NTR ($4,8 \mu\text{g/mL}$) przez 24 h w warunkach tlenowych (kolor czerwony) oraz w warunkach beztlenowych (kolor niebieski). Warunki reakcji: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), $T = 37^\circ\text{C}$, Chromatogramy zarejestrowano stosując detektor fluorescencyjny o $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$.

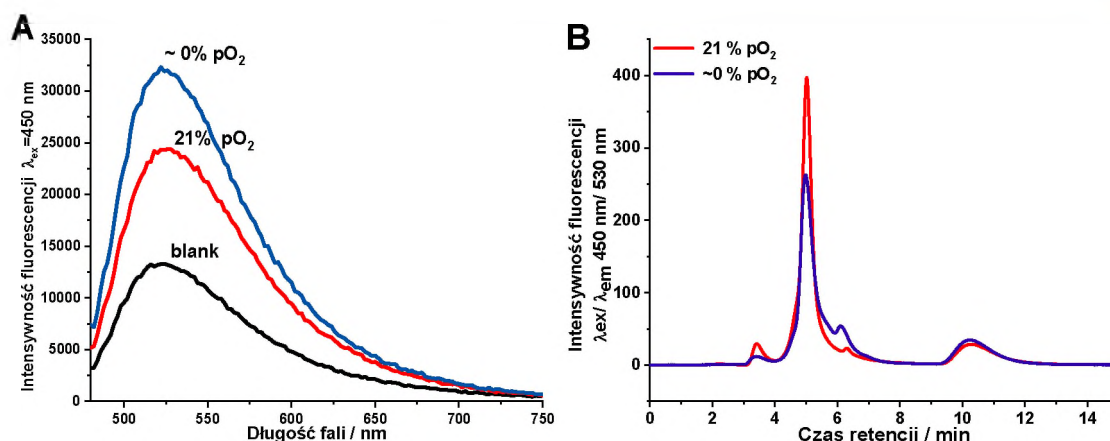
Aby sprawdzić zależność powstałych niskocząsteczkowych produktów redukcji biokoniugatu od poziomu NTR, redukcję **holo-Tf-3-NO₂** prowadzono w obecności różnych stężeń NTR ($0\text{--}30 \mu\text{g/mL}$). Reakcję prowadzono 24 h, a następnie białko usuwano przez ultrafiltrację (cut-off, 30 kDa , Amicon), a supernatant poddano analizie przy użyciu HPLC na kolumnie SEC.

W celu usunięcia interferencji pochodzących od NADH zmodyfikowano ustawienia detektora fluorescencji, stosując długość wzbudzenia oraz emisji odpowiednio 490 i 570 nm. Jak pokazano na **Rysunku 4.2.7**, pole powierzchni pików eluowanych w 6 minucie wykazywało zależność liniową od stężenia NTR, co sugeruje, że ta grupa produktów bezpośrednio zależy od stężenia enzymu. Taki sam efekt zaobserwowano, gdy mierzono całkowitą fluorescencję w próbce (**Rysunek 4.2.5D**). Pík eluowany w 9 minucie jest dość mały i osiąga swoje nasycenie przy stężeniu NTR ok. 10 $\mu\text{g/mL}$.



Rysunek 4.2.7 Porównanie chromatogramów przedstawiających skład niskocząsteczkowych produktów mieszaniny po redukcji **holo-Tf-3-NO₂** (3,3 μM) inkubowanej tylko z NADH (400 μM) (kolor czarny) lub w obecności różnych stężeń NTR (2,5 - 30 $\mu\text{g/mL}$) po 24 godzinach. Część białkową usunięto poprzez ultrafiltrację na filtrach cut-off. **Wstawka:** Pole powierzchni pików eluowanych przy czasie retencji 6,2 min (czarny) oraz 9,6 min (czerwony) po 24 godzinach redukcji dla różnych stężeń NTR. Warunki reakcji: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), $T = 37^\circ\text{C}$, Chromatogramy zarejestrowano stosując detektor fluorescencyjny $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 570$ nm.

Aby zbadać odpowiedzi **holo-Tf-3-NO₂** na zależną od tlenu NTR typu II wykorzystano mikrosomy wątrobowe. Redukcję biokoniugatu w obecności mikrosomów prowadzono przez 4 lub 24 godziny w temperaturze 37°C w warunkach równowagi z powietrzem oraz przy bardzo niskim stężeniu tlenu (<1 ppm pO₂). Biokoniugat **holo-Tf-3-NO₂** był efektywnie redukowany przez oksydoreduktazy obecne w mikrosomach, o czym świadczy znaczący wzrost emisji fluorescencji. Zgodnie z oczekiwaniami obserwowany wzrost był wyższy w warunkach beztlenowych (**Rysunek 4.2.8A**). Również analiza HPLC potwierdziła redukcję **holo-Tf-3-NO₂** prowadzącą do powstania związków o tych samych czasach retencji jak w przypadku NTR typu I. W przypadku zastosowania NTR typu II ilość produktów niskocząsteczkowych stanowiła niewielką frakcję.

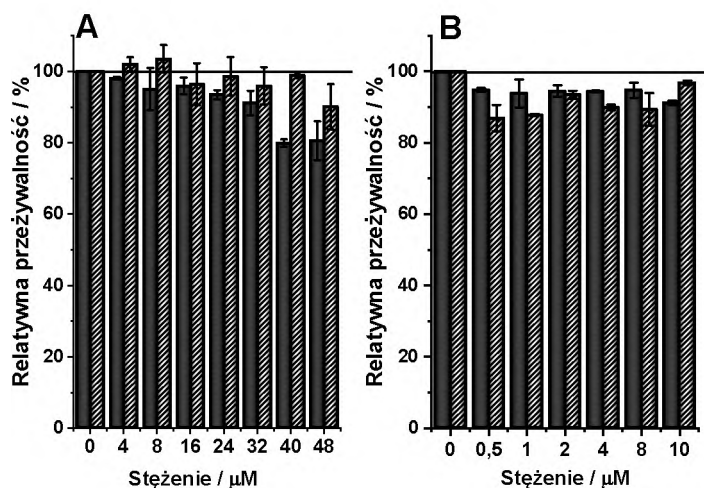


Rysunek 4.2.8 A) Widma emisyjne ($\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$) **holo-Tf-3-NO₂** inkubowanej jedynie z NADH (1 mM) lub w obecności mikrosomów (1 mg/mL) po 4 h reakcji w warunkach normoksji (21% pO₂) lub beztlenowych (~0% pO₂). Warunki eksperymentalne: 50 mM bufor TRIS-HCl pH 7,4, 37°C. **B)** Porównanie chromatogramów otrzymanych dla redukcji **holo-Tf-3-NO₂** (3,3 μM) inkubowanej z NADH (400 μM) w obecności mikrosomów (1 mg/mL) przez 24 h w warunkach normoksji (kolor czerwony) oraz w warunkach beztlenowych (kolor niebieski). Warunki reakcji: TRIS-HCl (pH 7,4, 50 mM), $T = 37^\circ\text{C}$, Chromatogramy zarejestrowano stosując detektor fluorescencyjny $\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$.

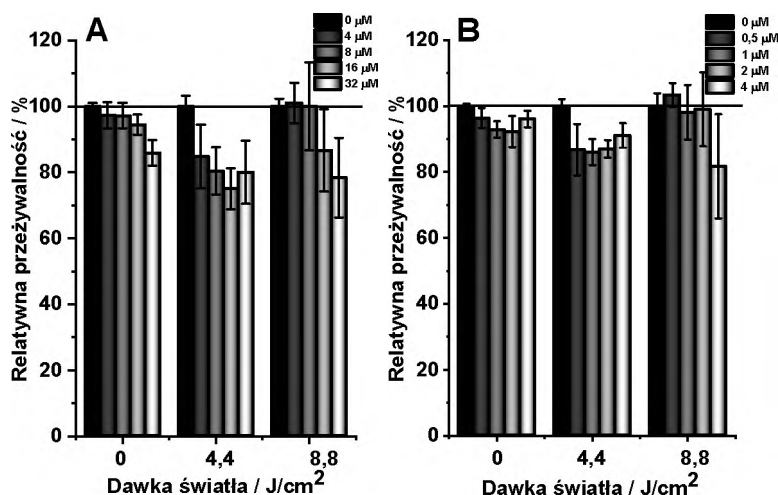
Powyższe wyniki sugerują, że po redukcji barwnika sprzężonego z transferyną ulega on częściowej dysocjacji od białka, a w obecności mikrosomów produkty redukcji przyłączają się do białek obecnych w homogenacie mikrosomów. Jest bardzo prawdopodobne, że podobne zachowanie ma miejsce w mikrośrodkowisku komórkowym umożliwiając efektywne wychwytywanie barwnika wewnątrz komórek.

4.2.3 Cytotoksyczność oraz akumulacja biokoniugatu *in vitro*

Do oceny właściwości obrazowania biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** w warunkach *in vitro* wybrano wysoce inwazyjną ludzką linię czerniaka A2058, dla której wykazano nadekspresję nitroreduktazy, (opisaną w **Rozdziale 4.1.7**) która jest nasiloną w warunkach hipoksji. Zastosowanie sond w warunkach *in vitro* wymaga nietoksycznych dawek związków. Biokoniugat **holo-Tf-3-NO₂** oraz wolna sonda **3-NO₂-NHS-ester** nie wykazywały aktywności cytotoksycznej ani fotocytotoksycznej w zakresie stężeń i dawek światła zastosowanych podczas obrazowania (**Rysunek 4.2.9** oraz **Rysunek 4.2.10**) Badania przeprowadzono na wolnej sondzie, aby potwierdzić jej brak toksycznego wpływu na komórki w przypadku, gdyby w środowisku komórkowym nastąpiło oderwanie się sondy od biokoniugatu. Jak pokazano na **Rysunku 4.2.9A** nawet bardzo wysokie stężenie wolnej sondy nie powoduje zaburzenia proliferacji komórek.



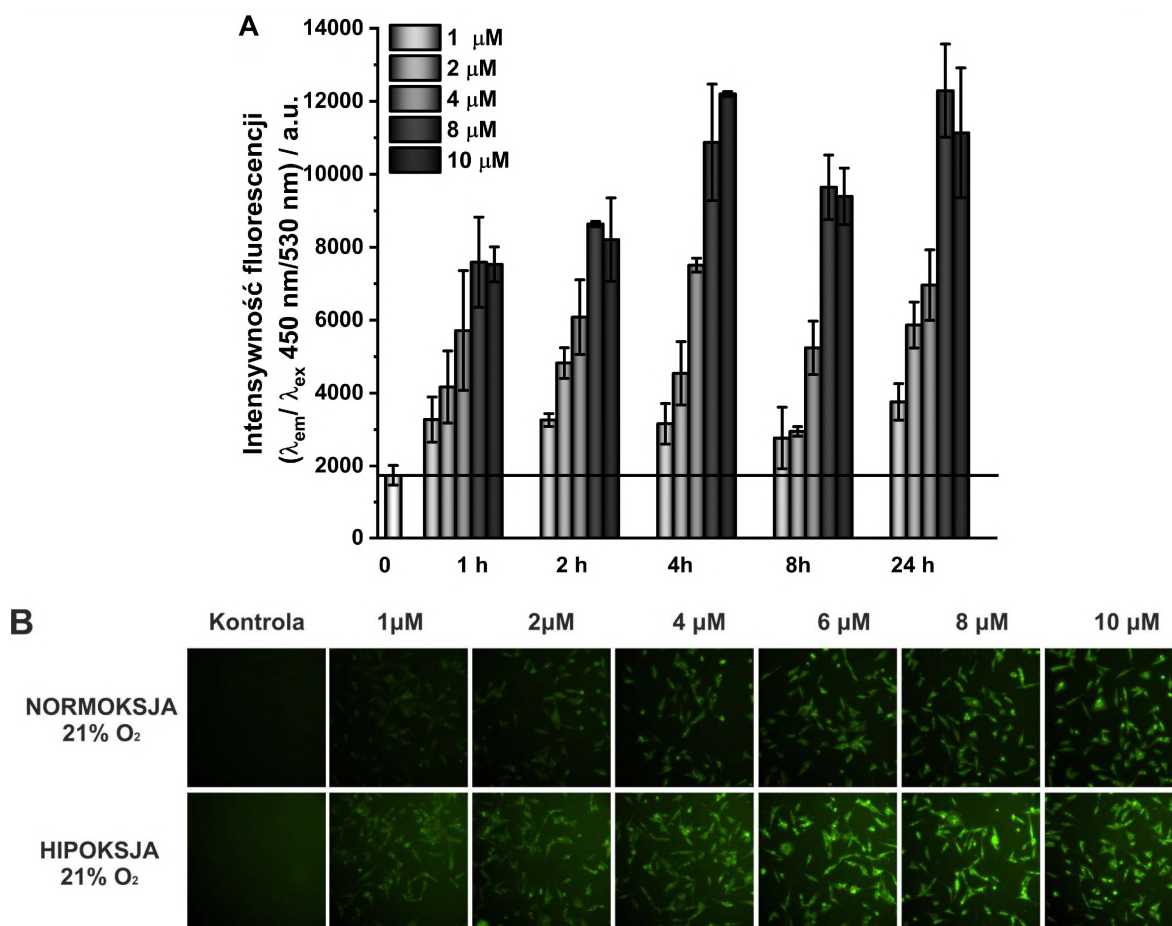
Rysunek 4.2.9 Przeżywalność komórek linii komórkowej A2058 inkubowanych przez 24 godziny z wolną sondą **3-NO₂-NHS-ester** (A) oraz biokoniugatem **holo-Tf-3-NO₂** (B) w warunkach normoksji (pełne słupki) oraz hipoksji (słupki kreskowane). Żywność komórek oceniano testem resazuryiny.



Rysunek 4.2.10 Fotocytotoksyczność wolnej sondy **3-NO₂-NHS-ester** (A) oraz **holo-Tf-3-NO₂** (B) wobec A2058 mierzona po 24 h inkubacji w pożywce bez FBS w warunkach normoksji w ciemności oraz po naświetleniu odpowiednią dawką światła. Żywność komórek oceniano za pomocą testu resazuryiny. Komórki naświetlane światłem o długości fali 465 nm; moc lampy 7,35 mW/cm².

Zależną od czasu i stężenia akumulację biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** w komórkach A2058 przedstawiono na **Rysunku 4.2.11**. Badany biokoniugat gromadzi się w komórkach bardzo szybko, osiągając maksimum fluorescencji po 2 - 4 godzinach (**Rysunek 4.2.11A**). Ponadto w ciągu jednej doby nie zaobserwowano spadku poziomu fluorescencji, co czyni sondę niezwykle stabilną w komórkach. Szybka degradacja sondy i utrata fluorescencji (fotowysielanie, ang. *photobleaching*) jest częstym problemem spotykanym dla wielu barwników fluorescencyjnych, w związku z czym taka wysoka stabilność fluorescencji czyni syntezowany biokoniugat bardzo obiecującym materiałem do długotrwałej obserwacji w mikrośrodku komórkowym.

Do dalszych doświadczeń wybrano 2 i 4 godziny inkubacji, jako optymalny czas akumulacji dla biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂**. Jak pokazano na **Rysunku 4.2.11B**, zdjęcia fluorescencyjne komórek A2058 pokazują wyraźny zależny od dawki wzrost fluorescencji komórek. Zdecydowanie bardziej intensywną fluorescencję zaobserwowano dla komórek hodowanych w warunkach hipoksji.

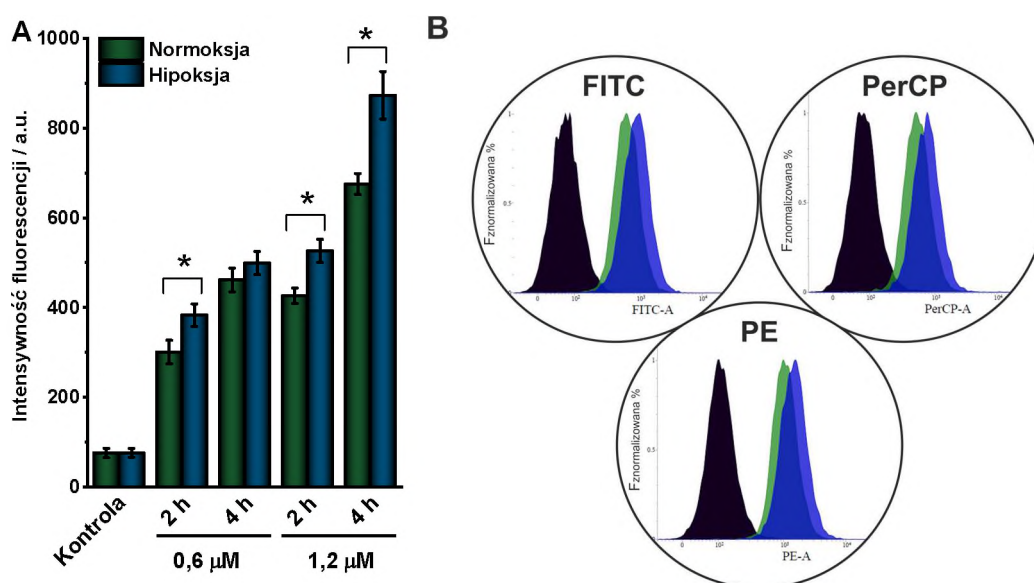


Rysunek 4.2.11 A) Intensywność fluorescencji komórek A2058 inkubowanych z **holo-Tf-3-NO₂** przez różny czas w zakresie stężeń 1-10 μM w warunkach normoksji. 0 określono jako kontrolę. (Pomiar przy użyciu czytnika płytek, λ_{ex} = 450 nm, λ_{em} = 530 nm); **B)** Zdjęcia fluorescencyjne komórek A2058 inkubowanych **holo-Tf-3-NO₂** przez 4 h w warunkach normoksji (21% pO₂) oraz hipoksji (1% pO₂).

4.2.4 Detekcja niedotlenionych komórek nowotworowych z wykorzystaniem biokoniugatu

Jak wykazano w poprzednim rozdziale, komórki A2058 w warunkach niedotlenienia wykazują zwiększoną ekspresję oksydoreduktaz, w związku z tym w komórkach hodowanych w hipoksji należy spodziewać się zwiększonej emisji biokoniugatu, zgodnie z otrzymanymi badaniami modelowymi przeprowadzonymi na mikrosomach (**Rysunek 4.2.8**).

W celu weryfikacji tej hipotezy, komórki A2058 hodowano w warunkach normoksji (21% pO₂) i hipoksji (1% pO₂) 24 godziny przed eksperymentem. Komórki hodowane w normoksji i hipoksji inkubowano przez 2 lub 4 godziny z biokoniugatem **holo-Tf-3-NO₂**, a następnie analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Uzyskane dane na **Rysunku 4.2.12** pokazują wyraźną różnicę między autofluorescencją komórek kontrolnych i wybarwionych biokoniugatem. Różnicę zarejestrowano w różnych kanałach FITC (488/527 ± 16 nm), PE (488/586 ± 21 nm) i PerCP (488/700 ± 27 nm), co czyni tę sondę dość uniwersalną pod względem wykorzystywanych urządzeń optycznych.

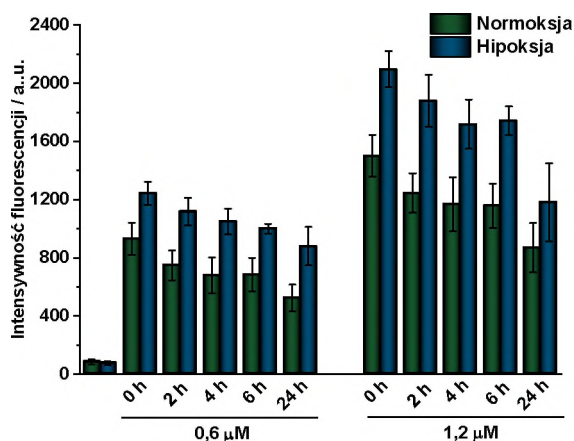


Rysunek 4.2.12 A) Intensywność fluorescencji komórek A2058 inkubowanych 2 lub 4 godziny z **holo-Tf-3-NO₂** (0,6 μM lub 1,2 μM) w warunkach hipoksji (1% pO₂ - słupki niebieskie) w porównaniu z komórkami utrzymywanymi w warunkach normoksji (21% pO₂ - słupki zielone). Pomiar wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 527 \pm 16 \text{ nm}$). **B)** Bezpośrednie dane z cytometrii przepływowej mierzone przy różnych konfiguracjach optycznych. * $p < 0,05$.

Warto zaznaczyć, że nawet bardzo niskie stężenie biokoniugatu (0,6 μM) oraz krótki czas inkubacji z komórkami wystarczają do uzyskania dobrego sygnału i łatwego różnicowania komórek traktowanych od nietraktowanych. Zarówno dla badanych stężeń, jak i czasów inkubacji obserwowano wyraźną różnicę we fluorescencji między komórkami hodowanymi w normoksji w porównaniu z komórkami hodowanymi w warunkach niedotlenienia. Wraz ze spadkiem stężenia tlenu wzrasta intensywność fluorescencji badanego biokoniugatu, co może wiązać się ze skuteczniejszą redukcją grupy nitrowej w sondzie z powodu podwyższonego poziomu oksydoreduktaz. Na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że zaprojektowany biokoniugat umożliwia szybkie i selektywne obrazowanie komórek nowotworowych zawierających podwyższone poziomy receptory transferowych z jednoczesnym wykrywaniem różnic w poziomach natlenienia komórek.

4.2.5 Uwalnianie biokoniugatu transferyny z komórek

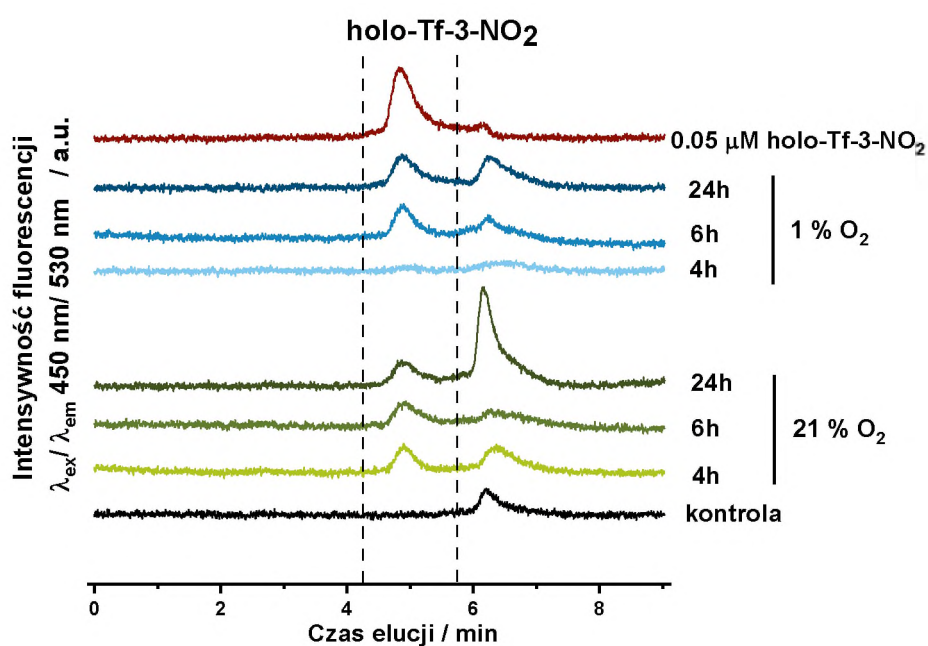
Holo-transferyna stosowana jako nośnik leków lub sond optycznych, jest wchłaniana do wnętrza komórki na drodze endocytozy po połączeniu się z receptorem transferyny. Następnie, po uwolnieniu żelaza we wczesnych endosomach, apo-transferyna (czyli transferyna niewysycona żelazem) transportowana jest z powrotem do środowiska pozakomórkowego, aby ostatecznie wrócić do krwioobiegu [117]. W związku z tym istnieje prawdopodobieństwo szybkiego wyrzutu biokoniugatu z komórek. Co więcej, ocena poziomu zatrzymania sondy w komórkach i jej oporności na degradację w środowisku komórkowym to dwa, kluczowe parametry, które należy uwzględnić w przypadku ich zastosowania *in vivo*. Aby sprawdzić skuteczność i trwałość w barwieniu komórek, biokoniugat inkubowano przez 4 h z komórkami, następnie wypłukiwano niezakumulowaną sondę i monitorowano intensywność fluorescencji komórek przez okres do 24 h.



Rysunek 4.2.13 Intensywność fluorescencji komórek A2058 inkubowanych przez 4 godziny z *holo-Tf-3-NO₂* (0,6 μM lub 1,2 μM) w warunkach normoksji (21% pO₂ - słupki zielone) lub hipoksji (1% pO₂ - słupki niebieskie) w różnych czasach po zakończeniu inkubacji. Komórki po inkubacji pozostawiono w buforze PBS. Pomiar wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 527 \pm 16 \text{ nm}$).

Jak pokazano na **Rysunku 4.2.13** w ciągu pierwszych 2 h poziom fluorescencji komórek spada o 20% w warunkach normoksji, natomiast jedynie o 10% w hipoksji. Emisja fluorescencji komórek po 24 h od wybarwienia utrzymywała się na dość wysokim poziomie, wykazując spadek o mniej niż 55%. Emisja komórek hodowanych w warunkach hipoksji była wyższa we wszystkich badanych przedziałach czasowych, a jej spadek był znacznie wolniejszy niż w warunkach normoksji. Recykling zinternalizowanej transferyny poprzez receptor transferynowy z powrotem na zewnątrzkomórkową powierzchnię w komórkach nowotworowych następuje szybko, w ciągu kilku minut [117]. Stabilność sygnału emisji fluorescencji sugeruje, że badany biokoniugat zostaje skutecznie wychwycony i zatrzymany w komórce.

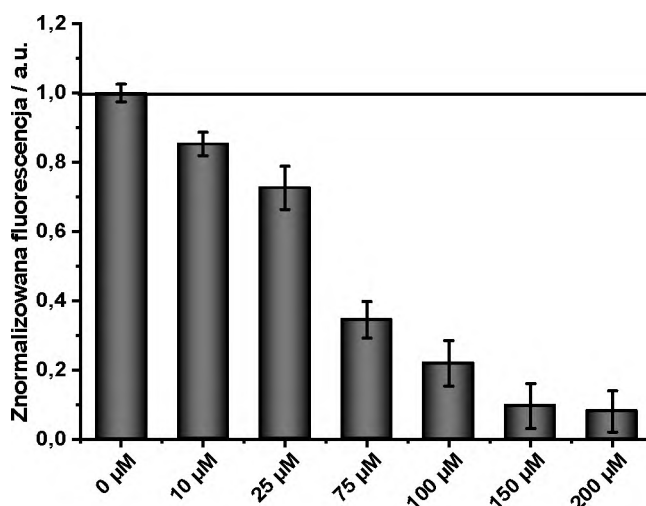
W celu potwierdzenia powyższej hipotezy przeprowadzono analizę zebranego supernatantu z nad komórek przy użyciu HPLC z zastosowaniem sączenia molekularnego. Biokoniugat holo-Tf był eluowany po 4,9 min, natomiast dłuższy czas retencji przypisano związkowi o małej masie cząsteczkowej, w szczególności wolnemu barwnikowi lub jego pochodnym, ale także innym cząsteczkom wykazującym emisję w okolicy 530 nm (np. FAD, NADH). Dokładniejsza analiza supernatantu zebranego z komórek ujawniła, że ilość biokoniugatu była znacznie mniejsza niż 1% zastosowanej dawki, natomiast stężenie wolnej transferyny nie przekraczało 10% (**Rysunek 4.2.14**). Emisja z niskocząsteczkowych pochodnych sondy znajdujących się w supernatancie również pozostawała na bardzo niskim poziomie, co sugeruje, że wyrzut wolnej sondy nie był wydajny. Obserwacje te skłaniają do stwierdzenia, że biokoniugat jest zatrzymany w komórkach i tylko częściowo wolna sonda jest z niego uwalniana do środowiska komórkowego. Ponadto, wolna sonda może być również odporna na wyrzut poza komórkę z powodu interakcji z białkami, co sugerowano w przypadku sond posiadających jednostkę nitroaromatyczną [72].



Rysunek 4.2.14 Porównanie chromatogramów uzyskanych dla supernatantów zebranych z nad komórek A2058 po określonym czasie (4, 6 lub 24 h) od 4-godzinnej inkubacji z **holo-Tf-3-NO₂** (1,2 μM) w warunkach normoksji (21% pO₂ – kolor zielony) lub hipoksji (1% pO₂ – kolor niebieski). Supernatant komórkowy zebrany z nietraktowanych komórek zastosowano jako kontrolę, a dla porównania pokazano rozdział dla 0,05 μM **holo-Tf-3P-NO₂**. Chromatogramy zarejestrowano stosując detektor fluorescencyjny przy $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$.

4.2.6 Dostarczanie biokoniugatu za pośrednictwem receptora transferyny

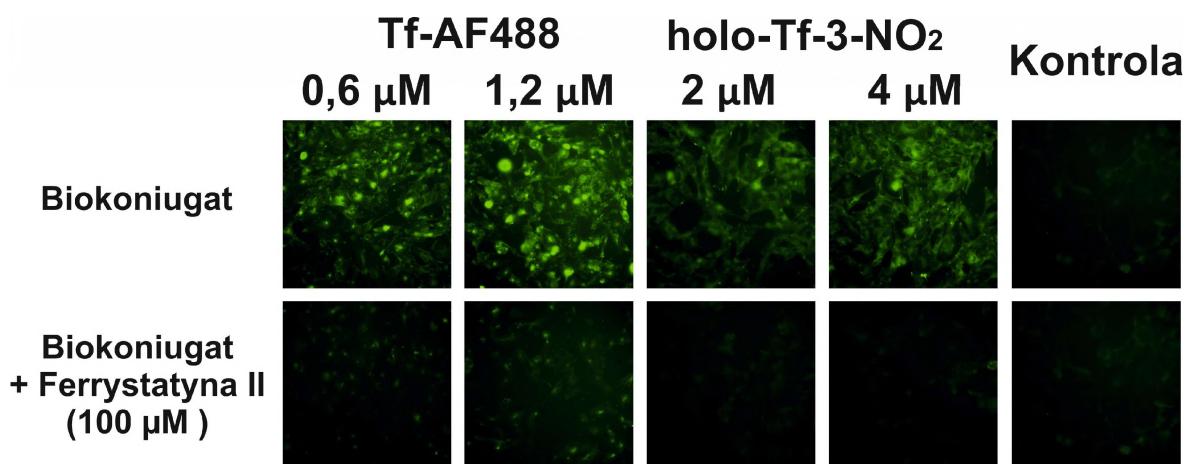
W celu potwierdzenia internalizacji biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** poprzez szlak receptora transferyny zastosowano niskocząsteczkowy inhibitor TfR - ferrystatynę II (NSC8679). Ferrystatyna II promuje degradację TfR1 niezależnie od klatryny i dynaminy i tym samym zapobiega wychytowi holo-Tf przez komórkę [213,214]. Wstępne badania nad mechanizmem wychytu biokoniugatu przez komórki przeprowadzono z użyciem dostępnego komercyjnie koniugatu Tf-AlexaFluor488 (**Tf-AF488**). W celu wyznaczenia dawki inhibitora hamującej 50% aktywności receptora transferyny (IC₅₀), komórki A2058 inkubowano 24 godziny w różnych stężeniach ferrystatyny II (0-200 μM), a następnie barwiono 15 minut z **Tf-AF488** (1,2 μM), po czym zmierzono intensywność przy użyciu czytnika mikropłytek. Jak pokazano na **Rysunku 4.1.15**, zaobserwowano zależne od dawki hamowanie wychytu **Tf-AF488**, a wyznaczona wartość parametru IC₅₀ wyniosła 54,2 ± 7,8 μM.



Rysunek 4.2.15 Znormalizowana fluorescencja komórek A2058 inkubowanych przez 24 godziny z różnymi stężeniami ferrystatyny II (0-200 μM), a następnie traktowanych przez 15 minut **Tf-AF488** (1,2 μM).

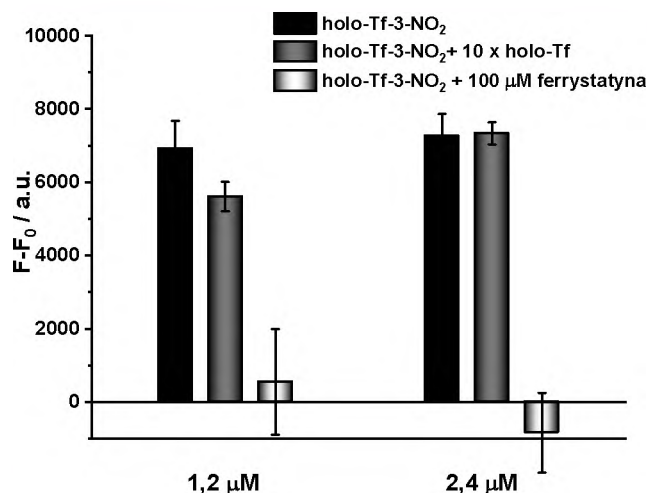
Do doświadczeń z syntetyzowanym biokoniugatem **holo-Tf-3-NO₂** zastosowano ferrystatynę II w stężeniu 100 μM. Jak wskazują dane zaprezentowane na **Rysunku 4.2.16**, zastosowany inhibitor, poprzez rozkład receptora TfR całkowicie zablokował wychyt biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** oraz **Tf-AF488** przez komórki. Znaczący spadek fluorescencji komórek inkubowanych z inhibitorem, a następnie z **holo-Tf-3-NO₂** lub **Tf-AF488** wskazuje, że wychyt biokoniugatu zachodzący na drodze endocytozy jest jedynym mechanizmem transportu komórkowego tych biokoniugatów. Różnica fluorescencji obserwowana na zdjęciach wydaje się być wystarczająco duża, aby wizualnie porównać

komórki o różnej aktywności TfR wykorzystując mikroskop fluorescencyjny. Oprócz potwierdzenia mechanizmu wchłaniania biokoniugatu przez receptor transferynowy uzyskane dane wskazują na wysoki potencjał zastosowania biokoniugatu do selektywnego oznaczania komórek nowotworowych charakteryzujących się zwiększoną ekspresją TfR1. W związku z tym **holo-Tf-3-NO₂** może pełnić funkcję podwójnego barwnika, oznaczając komórki nowotworowe z nadekspresją TfR z jednoczesnym określeniem poziomu niedotlenienia.



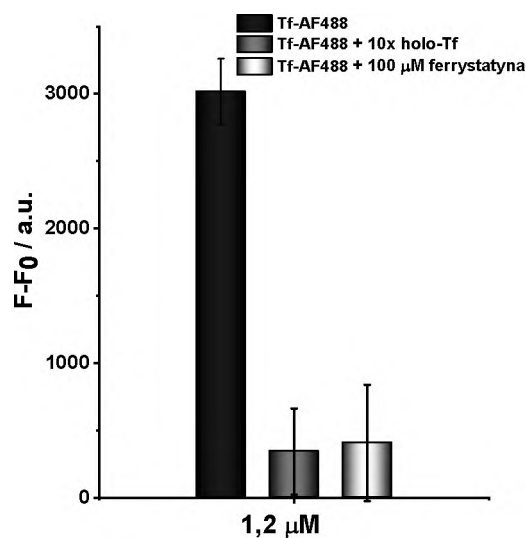
Rysunek 4.2.16 Zdjęcia fluorescencyjne komórek A2058 nietraktowanych (kontrola) lub po 4 h inkubacji z biokoniugatami **Tf-AF488** lub **holo-Tf-3-NO₂** samodzielnie lub razem z ferrystatyną II (100 μM) preinkubowaną 24 h przed zastosowaniem biokoniugatów Tf. Eksperymenty przeprowadzono w warunkach normoksji (pO₂ 21%).

Jedną z możliwych, konkurencyjnych reakcji względem wchłaniania biokoniugatu holo-Tf jest wchłanianie przez komórkę za pomocą TfR niemodyfikowanej holo-Tf. W związku z tym, w celu oceny powinowactwa biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** do TfR, zaprojektowano eksperyment konkurencyjny. Wychwył **holo-Tf-3-NO₂** przez komórki A2058 oceniano w obecności 10-krotnego nadmiaru niemodyfikowanej holo-Tf i porównywano z wychwytem biokoniugatu podanego samodzielnie. Jako kontrolę negatywną zastosowano komórki poddane wstępnie działaniu ferrystatyny II. Wykazano, że nadmiar niemodyfikowanej holo-Tf nie wpływa negatywnie na efektywność wychwyty biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** (Rysunek 4.2.17).



Rysunek 4.2.17 Zmiana fluorescencji komórek A2058 po 1 h inkubacji z samym biokoniugatem **holo-Tf-3-NO₂** (1,2 μM lub 2,4 μM), w obecności 10-krotnego nadmiaru holo-transferyny (holo-Tf) lub 100 μM ferrystatyny II preinkubowanej z komórkami 24 h przed dodaniem biokoniugatu. Komórki niepoddane działaniu biokoniugatu wykorzystano jako kontrolę. Doświadczenie przeprowadzono w warunkach normoksji (pO_2 21%) przy użyciu czytnika płytek ($\lambda_{ex} = 450$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm).

Sugeruje to, że powstały biokoniugat **holo-Tf-3-NO₂** może mieć jeszcze wyższe powinowactwo do TfR niż sama holo-Tf. Takiego efektu nie zaobserwowano dla komercyjnie dostępnego biokoniugatu **Tf-AF488**, dla którego wychwyty komórkowy był hamowany w obecności nadmiaru holo-Tf (**Rysunek 4.2.18**).

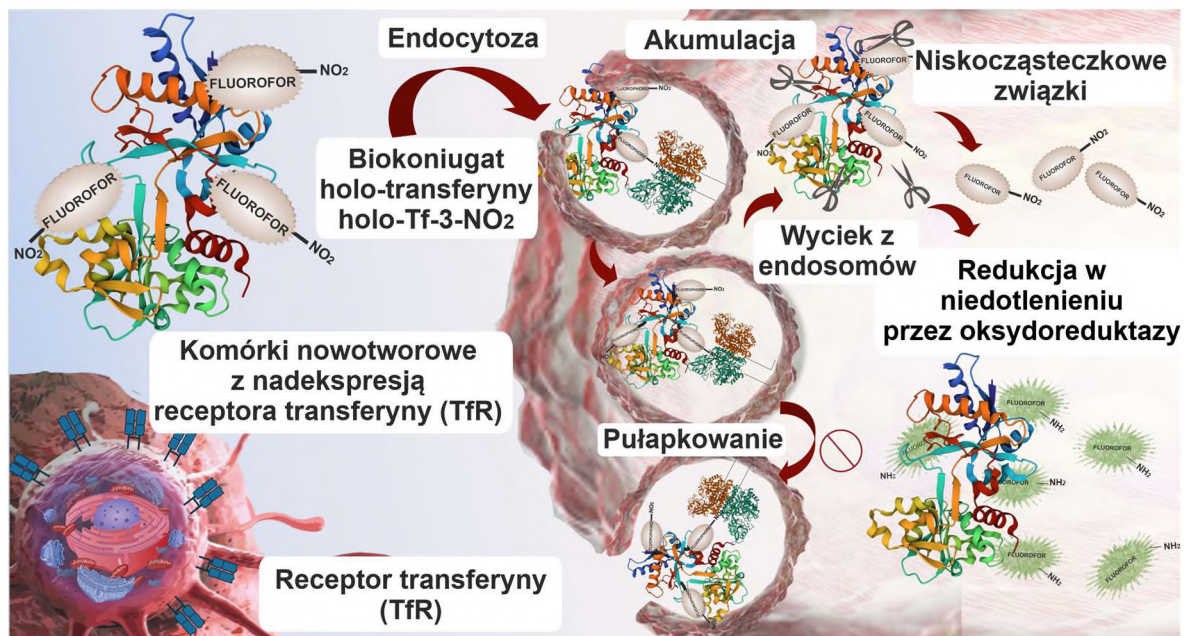


Rysunek 4.2.18 Zmiana fluorescencji komórek A2058 po 1 h inkubacji z samym biokoniugatem **TFAF488** (1,2 μM) w obecności 10-krotnego nadmiaru holo-transferyny (holo-Tf) lub 100 μM ferrystatyny II preinkubowanej z komórkami 24 h przed dodaniem biokoniugatu. Komórki niepoddane działaniu biokoniugatu wykorzystano jako kontrolę. Doświadczenie przeprowadzono w warunkach normoksji (pO_2 21%) przy użyciu czytnika płytek ($\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm).

4.2.7 Podsumowanie

Podsumowując, w tej części pracy zaproponowano nowy czujnik do obrazowania komórek nowotworowych, którego selektywność opiera się na jego wyłącznym wychwycie poprzez endocytozę receptora transferyny. Z powodzeniem otrzymano biokoniugat holo-Tf z sondą fluorescencyjną będącą pochodną nitro-pirazynotriazapentalenu (**holo-Tf-3-NO₂**), który może selektywnie akumulować się w komórkach nowotworowych wykazujących zwiększoną ekspresję receptora transferyny oraz dodatkowo wykazywać zwiększoną fluorescencję w tkankach niedotlenionych. Połączenie ośmiu cząsteczek fluoroforu do jednej cząsteczki białka pozwala na uzyskanie wyższego sygnału fluorescencyjnego, który jest dodatkowo wzmacniany w warunkach niedotlenienia, w wyniku zwiększonej redukcji grupy nitrowej, z powodu nadekspresji nitroreduktaz. Przedstawione w tym rozdziale wyniki pozwalają stwierdzić, że zmodyfikowane białko wykazuje bardzo dobre właściwości fotochemiczne oraz ulega redukcji pod wpływem nitroreduktaz typu I oraz II, prowadząc do otrzymania wysoce fluorescencyjnego produktu. Biokoniugat, w przeciwieństwie do wolnych sond praktycznie pozbawianych emisji, wykazywał umiarkowaną fluorescencję, co wynika z otoczenia białkowego fluoroforu, które stabilizowało strukturę znacznika i uniemożliwiało wygaszenie fluorescencji przez cząsteczki wody oraz grupę nitrofenylową. W związku z otrzymanymi, pozytywnymi wynikami potwierdzającymi potencjał biokoniugatu do obrazowania przeprowadzono badania biologiczne na linii komórkowej czerniaka A2058, dla której wykazano wcześniej nadekspresję oksydoreduktaz w warunkach niedotlenienia. Biokoniugat nie był toksyczny, ani fototoksyczny, oraz co ważne wykazywał doskonały wychwyt przez komórki nawet przy bardzo niskich stężeniach oraz krótkich czasach inkubacji. Biokoniugat charakteryzował się szybkim i wydajnym wychwytem oraz długotrwałą retencją wewnątrzkomórkową. Ponadto w ciągu jednego dnia obserwuje się tylko niewielki spadek sygnału fluorescencji, co sprawia, że czujnik jest wyjątkowo stabilny w komórce. Jak wynika z przedstawionych w tym rozdziale danych biokoniugat umożliwia rozróżnienie komórek nowotworowych wykazujących niedotlenienie od hodowanych w warunkach normoksji. Badania wykazały również, że akumulacja biokoniugatu w komórkach jest całkowicie zależna od aktywności receptora transferyny, w związku z tym jest on doskonałym kandydatem jako podwójny barwnik dla komórek nowotworowych charakteryzujących się zwiększonym poziomem TfR oraz jednocześnie umożliwia ocenę poziomu aktywności nitroreduktaz, a tym samym może być markerem komórek w stanie hipoksji. Biokoniugat ma również potencjał do zastosowania

jako czujnik do śródoperacyjnego obrazowania fluorescencyjnego specyficznego dla nowotworu *in vivo* lub do ilościowych analiz *ex vivo*. Schematyczny mechanizm działania biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂** przedstawiono na **Rysunku 4.2.19**.



Rysunek 4.2.19 Schematyczne przedstawienie głównych wyników otrzymanych dla biokoniugatu **holo-Tf-3-NO₂**.

Przedstawione w tym rozdziale badania weszły w skład publikacji przesłanej do *Sensors and Actuators B: Chemical*

E. Janczy-Cempa, A. Kwiatkowska, O. Mazuryk, N. Chopin, M-A. Hiebel, F. Suzenet, M. Brindell” Bioconjugation of holo-transferrin with hypoxia-enhanced fluorescent sensor for the selective imaging of cancer cells”,

4.3 Wpływ hipoksji na poziom ekspresji oksydoreduktaz – weryfikacja potencjału aplikacyjnego sond fluorescencyjnych *in vitro*

Jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w badaniach klinicznych proleków aktywowanych hipoksją oraz sond fluorescencyjnych czułych na hipoksję jest brak badań przesiewowych charakteryzujących nowotwory pod kątem występowania w nich tkanek niedotlenionych, oraz poziomu ekspresji specyficznych oksydoreduktaz zaangażowanych w aktywację testowanych sond. Niestety, zaskakująco mało uwagi zostaje poświęcone oznaczaniu ilościowemu tych enzymów w komórkach lub tkankach w porównaniu z zaawansowaniem badań związanych z wykorzystaniem HAPs, oraz ogromną liczbą przebadanych nowych sond fluorescencyjnych do obrazowania tkanek w stanie niedotlenienia. Dotychczasowa wiedza na temat ekspresji i aktywności oksydoreduktaz zdolnych do aktywacji związków w różnych liniach komórek nowotworowych w warunkach niedotlenienia jest wciąż niewystarczająca. Pomimo powszechnej opinii, iż hipoksja powoduje nadekspresję nitroreduktaz, jedynie nieliczne badania wykazują różnice w ekspresji lub aktywności wybranych oksydoreduktaz w zależności od stężenia tlenu [188].

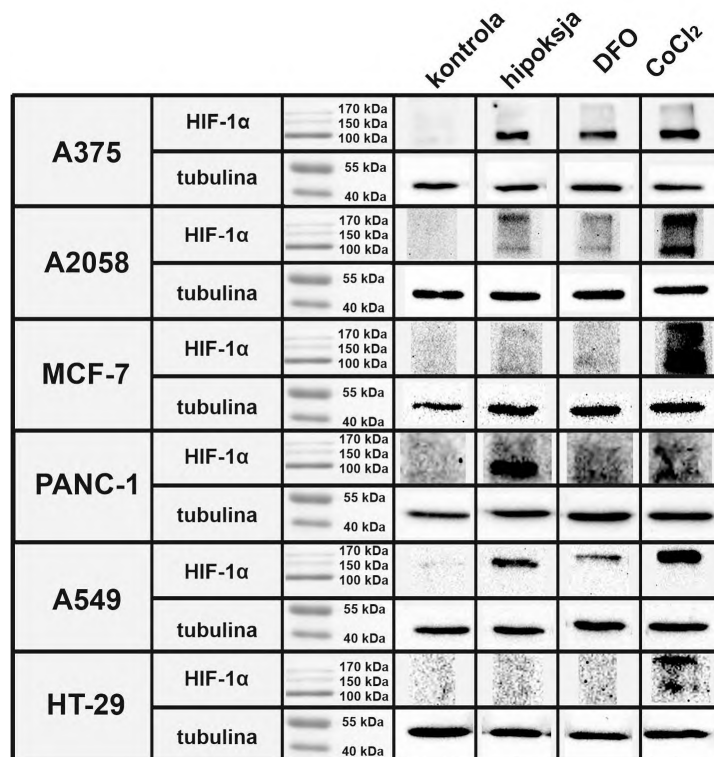
Dlatego, w tym rozdziale skupiono się na określeniu poziomu oksydoreduktaz zaangażowanych w aktywację związków w zależności od poziomu wywołanego niedotlenienia dla różnych linii komórkowych. Zbadano poziom enzymów katalizujących redukcję jednoelektronową (reduktazę cytochromu P450 (POR), reduktazę cytochromu b5 (CYB5R) oraz oksydoreduktazę ksantynową (XOR)), jak również dwuelektronową (dehydrogenazę NAD(P)H chinonową 1 (NQO1) oraz cytochrom C (Cyt C)) dla sześciu różnych nowotworowych linii komórkowych w warunkach normoksji, w warunkach hipoksji wywołanej obniżonym stężeniem tlenu (1% pO₂) oraz w obecności powszechnie stosowanych chemicznych induktorów hipoksji deferoksaminy (DFO) i CoCl₂. Poziom niedotlenienia określono analizując ekspresję HIF-1 α . Dodatkowo w wymienionych wcześniej warunkach zbadano poziom fluorescencji sondy 2-NO₂ oraz skorelowano uzyskane wyniki z poziomem ekspresji wybranych oksydoreduktaz.

4.3.1 Stabilizacja HIF-1 α przy zastosowaniu różnych modeli niedotlenienia.

Badania biologiczne *in vitro* zostały przeprowadzone w warunkach normoksji (21% pO₂), w warunkach hipoksji, które wytworzono przy użyciu komory do hipoksji (1% pO₂) oraz z wykorzystaniem chemicznych induktorów hipoksji, jako modeli niedotlenienia. Zastosowano deferoksaminy oraz chlorek kobaltu(II), które uważane są za najlepsze mimetyki niedotlenienia, a ich rola opiera się na stabilizacji podjednostki HIF-1 α w warunkach normoksji. DFO jest chelatorem jonów Fe²⁺, które są niezbędnym kofaktorem dla hydroksylaz proliowych (PHD), kluczowych enzymów, które wiążą stężenie O₂ z degradacją HIF-1 α . Brak dostępnych jonów Fe²⁺ powoduje zahamowanie aktywności PHD i inhibitora czynnika indukowanego hipoksją 1 (FIH), co w konsekwencji prowadzi do stabilizacji i akumulacji HIF-1 α , a w konsekwencji aktywacji zależnych od HIF-1 α genów [215,216]. Dla jonów kobaltu proponowane są różne mechanizmy stabilizacji HIF-1 α [217]. Obecnie przyjmuje się, że Co²⁺ zastępuje Fe²⁺ w hydroksylazach proliowych wywołując inhibicję tych enzymów. Dodatkowo jony kobaltu mogą utleniać askorbinian, który również jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania PHD i zapobiegania stabilizacji HIF-1 α . Proponowany jest również mechanizm, w którym jony Co²⁺ wiążą się do hydroksylowanej formy HIF-1 α , co uniemożliwia rozpoznawania białka przez ligazę ubikwitynową pVHL i jego dalszą degradację.

Aby lepiej zrozumieć wpływ niedotlenienia na zmianę ekspresji oksydoreduktaz, oceniono poziom HIF-1 α dla wszystkich linii komórkowych hodowanych 24 godziny w hipoksji, lub normoksji w obecności 200 μ M DFO lub 400 μ M CoCl₂. Poziom ekspresji białka zestawiono względem komórek hodowanych w normoksji. Jak pokazano na **Rysunku 4.3.1**, w warunkach normoksji nie zaobserwowano białka HIF-1 α , co jest zgodne z opisanymi wcześniej mechanizmami degradacji w obecności tlenu. Po 24 - godzinnej inkubacji komórek w warunkach hipoksji (1% O₂) dla większości linii komórkowych zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji białka HIF-1 α , co wiąże się z jego stabilizacją w komórkach i możliwością dalszej ekspresji genów aktywowanych hipoksją. Jedynie w komórkach linii MCF-7 oraz HT-29 niedotlenienie nie spowodowało zauważalnie zwiększonego poziomu białka. Zastosowanie chemicznych mimetyków niedotlenienia, DFO oraz CoCl₂, również doprowadziło do stabilizacji HIF-1 α . Na szczególną uwagę zasługuje CoCl₂, który indukował bardzo wysokie poziomy białka, zdecydowanie większe niż podczas hodowania komórek w komorze do hipoksji. Nawet dla linii komórkowych niewykazujących zwiększonej ekspresji HIF-1 α w hipoksji, po inkubacji z CoCl₂

zaobserwowano stabilizację oraz wysoką akumulację tego białka. CoCl_2 od dawna znany jest jako silny induktor HIF-1 α w układach komórkowych, jednak nie zawsze wywołuje on taką samą odpowiedź komórkową jak obniżenie ciśnienia tlenu [218]. W związku z tym, można stwierdzić, że mimetyki hipoksji aktywują szlaki zależne od HIF-1 poprzez nieco inne mechanizmy, niż wywołane obniżeniem poziomu tlenu w środowisku niedotlenienie.



Rysunek 4.3.1 Poziom ekspresji HIF-1 α w komórkach A375, A2058, MCF-7, PANC-1, A549 oraz HT-29 oznaczony metodą Western Blot po 24 h inkubacji w normoksji (kontrola), 24 h hipoksji lub po 24 h inkubacji z CoCl_2 (400 μM) lub DFO (200 μM). Ekspresja białek została zestawiona w stosunku do ilości α -tubuliny.

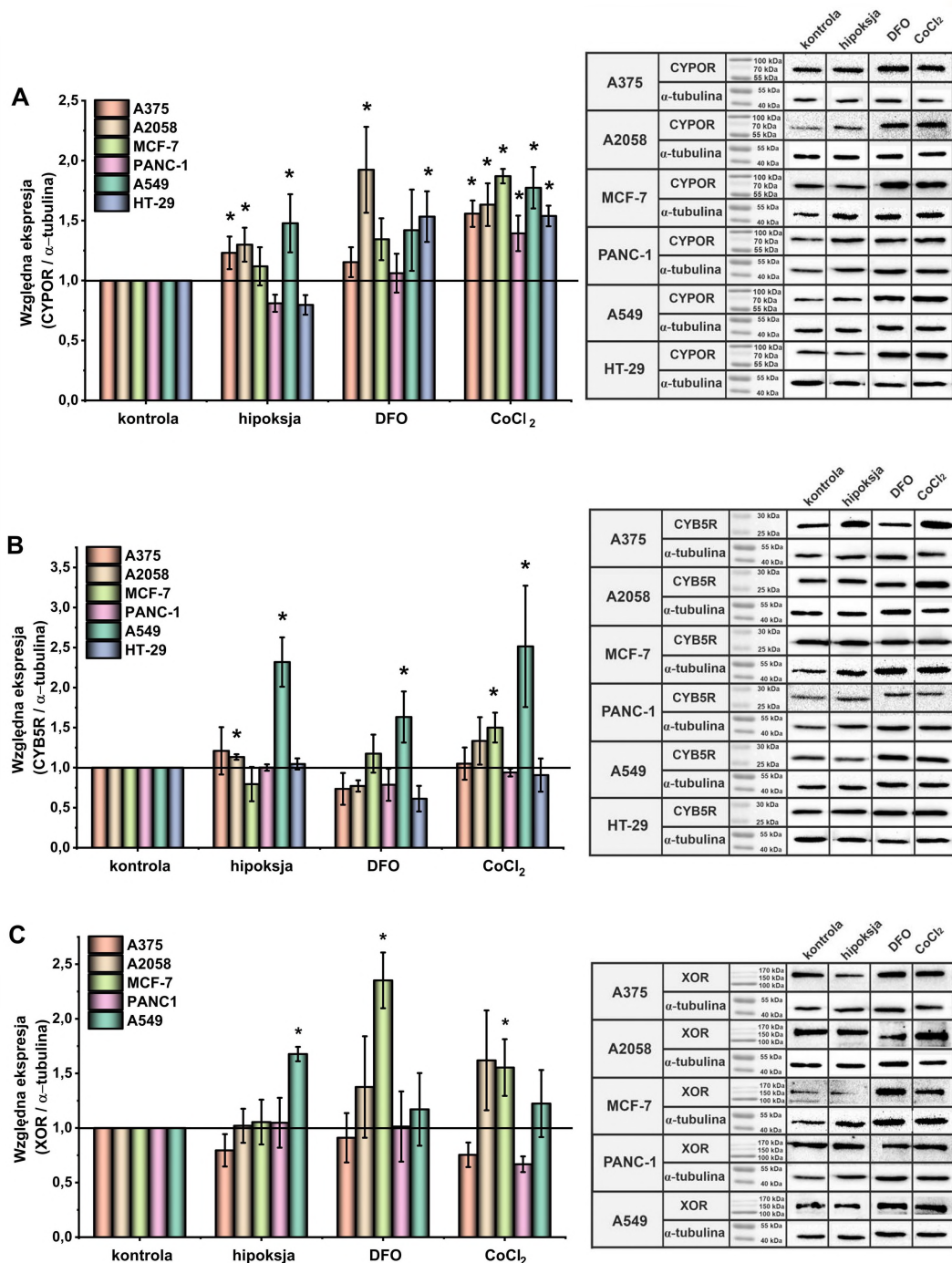
4.3.2 Wpływ niedotlenienia na poziom ekspresji oksydoreduktaz jednoelektronowych

Dla pełniejszego obrazu korelacji niedotlenienia z aktywacją konkretnych oksydoreduktaz przeprowadzono eksperyment mający na celu ocenę poziomu poszczególnych enzymów oksydoredukcyjnych, które mają możliwość redukcji ugrupowań nitrowych w zależności od warunków hodowli oraz linii komórkowej. Badania z ostatnich lat wykazały, że głównie oksydoreduktazy jednoelektronowe zaangażowane są w proces redukcji proleków aktywowanych hipoksją oraz sond czułych na niedotlenienie [43,57,219].

W związku z tym, zbadano poziom ekspresji enzymów z tej grupy, dla których postuluje się wpływ na proces redukcji, w tym reduktazę cytochromu p450 (POR), reduktazę cytochromu b5 (CYB5R) oraz oksydoreduktazę ksantynową (XOR). Do oceny wpływu niedotlenienia na ekspresję powyższych enzymów dla różnych nowotworowych linii komórkowych wykorzystano technikę Western Blot.

Reduktaza cytochromu p450 uznawana jest za główny enzym odpowiedzialny za redukcję proleków w warunkach niedotlenienia. Jak pokazano na **Rysunku 4.3.2 A**, w warunkach obniżonego poziomu tlenu do 1%, poziom ekspresji POR wzrósł dla komórek A375, A2058 oraz A549, co dobrze koreluje z przedstawioną wcześniej wysoką ekspresją HIF-1 α w tych samych warunkach dla powyższych linii komórkowych. Wywołanie niedotlenienia z wykorzystaniem DFO dodatkowo zwiększyło ekspresję POR dla linii MCF-7 oraz HT-29, natomiast zastosowanie chlorku kobaltu (II), jako mimetyka niedotlenienia spowodowało około dwukrotny wzrost poziomu białka dla wszystkich badanych linii komórkowych. Ocena poziomu reduktazy cytochromu b5 wykazała, że jedynie linia A549 charakteryzuje się znacznie zwiększoną ekspresją tego enzymu w warunkach niedotlenienia (**Rysunek 4.3.2B**), jak również pod wpływem chemicznych induktorów hipoksji. Inkubacja komórek z CoCl₂ spowodowała niewielką nadekspresję CYB5R dodatkowo w komórkach linii A2058 oraz MCF-7. Linia A549 również prezentowała zwiększony poziom oksydoreduktazy ksantynowej w warunkach hipoksji, natomiast zastosowanie DFO lub CoCl₂ nie powodowało zmiany ilości białka w tych komórkach (**Rysunek 4.3.2C**). Związki te natomiast zwiększyły ekspresję XOR w komórkach linii A2058 oraz MCF-7.

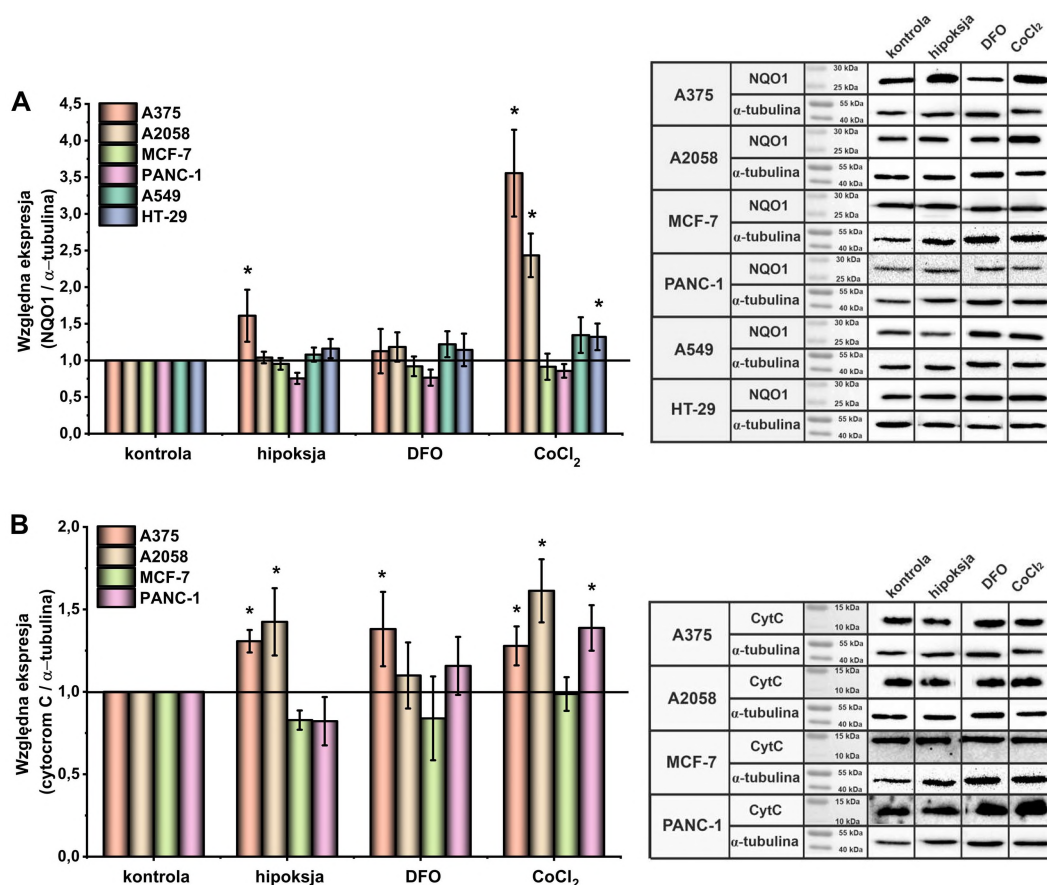
Jak pokazują powyższe dane, ekspresja poszczególnych oksydoreduktaz jednoelektronowych w warunkach niedotlenienia jest różna dla poszczególnych linii nowotworowych. Spośród przebadanych linii komórkowych warto wyróżnić komórki linii A375 oraz A2058, które charakteryzują się zwiększonym poziomem POR w warunkach obniżonego ciśnienia tlenu. Natomiast linia komórkowa A549 wykazuje w tych warunkach nie tylko nadekspresję POR, ale również wysokie poziomy CYB5R oraz XOR.



Rysunek 4.3.2 Poziom ekspresji oksydoreduktaz typu II : reduktazy cytochromu P450 (POR) (A), reduktazy cytochromu b5 (CYB5R) (B) oraz oksydoreduktazy ksantynowej (XOR) (C) w komórkach A375, A2058, MCF-7, PANC-1, A549 oraz HT-29 oznaczony metodą Western Blot po 24 h inkubacji w normoksji (kontrola), 24 h hipoksji lub po 24 h inkubacji z CoCl_2 (400 μM) lub DFO (200 μM). Ekspresja białek została obliczona w stosunku do ilości α -tubuliny. * $p < 0,05$

4.3.3 Wpływ niedotlenienia na poziom ekspresji oksydoreduktaz dwuelektronowych

Pomimo iż, oksydoreduktazy dwuelektronowe, takie jak NQO1 oraz cytochrom C nie odgrywają znaczącej roli w aktywacji HAPs ze względu na ich obecność w zdrowych, normalnych tkankach ludzkich, nadal mogą być one celem w bioobrazowaniu tkanki hipoksycznej. Redukcja sond opiera się na nietoksycznych metabolitach, a nitroreduktazy typu I mogą ulegać nadekspresji w niektórych nowotworach. Dlatego zbadano wpływ niedotlenienia na poziom ekspresji reduktaz dwuelektronowych: dehydrogenazy NAD(P)H chinonowej 1 oraz cytochromu C. 24-godzinna inkubacja komórek w 1% atmosferze tlenu indukowała zwiększoną ekspresję NQO1 jedynie w linii komórkowej A375, oraz ekspresję cytochromu C dla komórek linii A375 oraz A2058 (**Rysunek 4.3.3**).



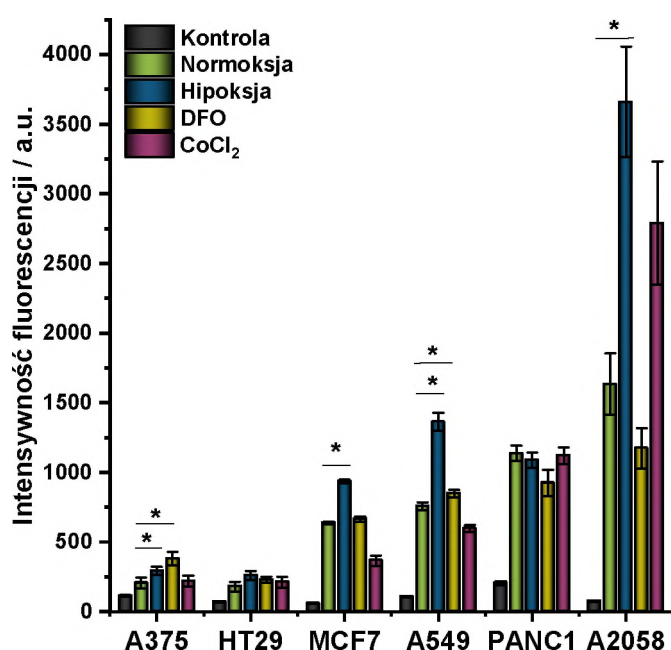
Rysunek 4.3.3 Poziom ekspresji oksydoreduktaz typu I: dehydrogenazy NAD(P)H chinonowej 1 (NQO1)(A) oraz cytochromu C (B) w komórkach A375, A2058, MCF-7, PANC-1, A549 oraz HT-29 oznaczony metodą Western Blot po 24 h inkubacji w normoksji (kontrola), 24 h hipoksji lub po 24 h inkubacji z CoCl₂ (400 μM) lub DFO (200 μM). Ekspresja białek został obliczona w stosunku do ilości α-tubuliny. * *p* < 0,05

Poziom NQO1 nie został zmieniony dla żadnej linii komórkowej, gdy zastosowano DFO do wywołania niedotlenienia. Natomiast inkubacja z CoCl_2 prowadziła do wzrostu poziomu białka, szczególnie w komórkach A375 oraz A2058, ale również w niewielkim stopniu w liniach A549 oraz HT-29. Poziom ekspresji cytochromu C wyznaczono tylko dla czterech linii komórkowych, ze względu na trudność detekcji tego białka w komórkach A549 oraz HT-29. Traktowanie komórek DFO powodowało zwiększenie ekspresji białka jedynie dla linii komórkowej A375, podczas gdy zastosowano CoCl_2 , wzrost ekspresji zaobserwowano dla komórek A375, A2058 oraz PANC-1. Otrzymane dane sugerują, że ekspresja reduktaz dwuelektronowych może mieć istotny wpływ na aktywację związków do bioobrazowania, szczególnie dla linii A375 oraz A2058.

4.3.4 Ekspresja oksydoreduktaz a redukcja sondy nitropirazynotriazapentalenowej

W celu porównania potencjału do redukcji związków nitropirazynotriazapentalenowych w warunkach niedotlenienia przez różne linie komórkowe przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem sondy **2-NO₂**, która we wcześniejszych badaniach umożliwiała ocenę poziomu niedotlenienia komórek nowotworowych linii A2058. Komórki hodowano w analogicznych warunkach jak podczas oznaczania poziomu ekspresji oksydoreduktaz, a następnie inkubowano przez 4 h z sondą **2-NO₂** o stężeniu 4 μM . Poziom redukcji sondy analizowano przy użyciu cytometrii przepływowej. W celu porównania linii komórkowych pomiędzy sobą parametry pomiarów ustalono na stałym poziomie. Jak pokazano na **Rysunku 4.3.4** poziom fluorescencji pochodzącej od sondy **2-NO₂** jest znacząco różny dla poszczególnych linii komórkowych, co może być spowodowane różną efektywnością akumulacji sondy w komórkach, jak również różną wydajnością redukcji w poszczególnych liniach. Dla wszystkich linii komórkowych, z wyjątkiem PANC-1 zaobserwowano wyraźną różnicę w intensywności fluorescencji komórek hodowanych w hipoksji w porównaniu z komórkami hodowanymi w normoksji, co umożliwia ich rozróżnienie. Brak różnicy fluorescencji komórek PANC-1 w warunkach niedotlenienia oraz po chemicznej indukcji niedotlenienia można wytłumaczyć faktem, że dla tej linii we wcześniejszych badaniach nie wykazano nadekspresji żadnej oksydoreduktazy w tych warunkach. Również linia HT-29 nie charakteryzowała się wzrostem oksydoreduktaz w warunkach niedotlenienia w związku z tym rozróżnienie komórek hodowanych w normoksji od hodowanych w hipoksji nie jest jednoznaczne. Na uwagę zasługuje linia komórkowa A549, dla której w warunkach niedotlenienia

wykazano nadekspresję oksydoreduktaz jednoelektronowych (POR, CYB5R oraz XOR) oraz dużą różnicę fluorescencji między komórkami w normoksji i hipoksji podczas inkubacji z sondą 2-NO₂. Linią komórkową o największym potencjale do selektywnej redukcji sond nitroaromatycznych w warunkach niedotlenienia okazała się linia czerniaka A2058. Komórki te wykazały nadekspresję oksydoreduktaz zarówno jednoelektronowych (POR oraz CYTB5R), jak również dwuelektronowych (cytochrom C), co korelowało z ponad 2-krotnie wyższą fluorescencją komórek hipoksycznych w porównaniu do komórek hodowanych w normoksji.



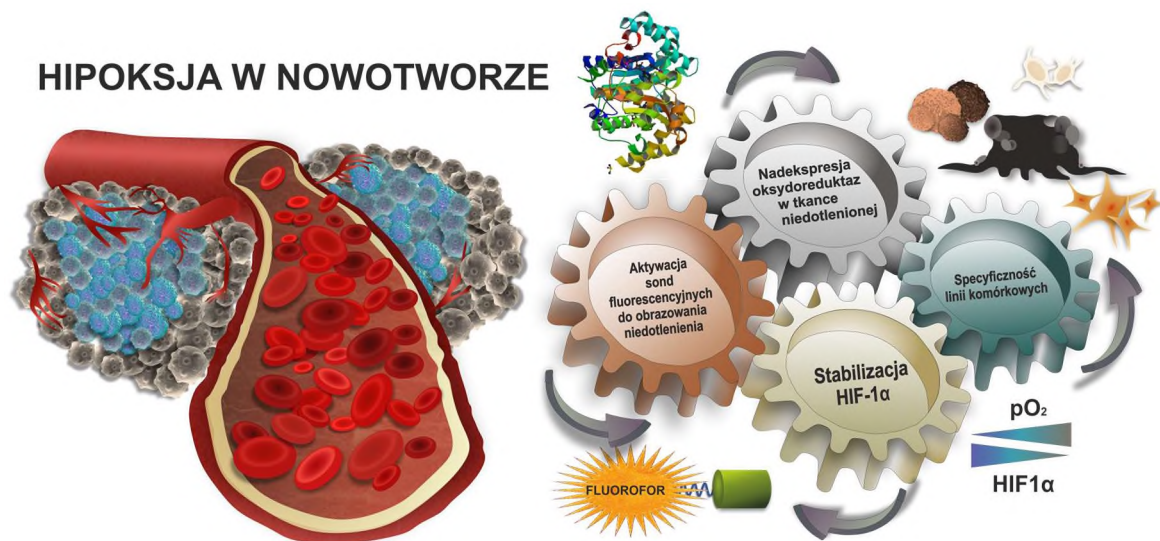
Rysunek 4.3.4 Intensywność fluorescencji komórek A375, A2058, MCF-7, PANC-1, A549 oraz HT-29 inkubowanych 4 h z 2-NO₂ (4 μM) po 24 h inkubacji w warunkach hipoksji (1%) lub z komórkami wstępnie inkubowanymi z 200 μM deferoksaminą (DFO) lub 400 μM CoCl₂ przez 24 h w normoksji (21%) w porównaniu do komórek utrzymywanych w normoksji (21%). Pomiar wykonany przy użyciu cytometrii przepływowej ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 527 \pm 16 \text{ nm}$), * $p < 0,05$.

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, iż sondy nitropirazynotriazapentalenowe aktywowane są głównie przez nitroreduktazy jednoelektronowe, a poziom ich redukcji silnie zależy od linii nowotworowej. Warto również zauważyć, że pomimo dużo wyższej ekspresji oksydoreduktaz indukowanych przez chemiczne mimetyki hipoksji nie zaobserwowano zwiększonej efektywności redukcji sondy w tych warunkach. Fakt ten dodatkowo potwierdza zaangażowanie jednoelektronowych nitroreduktaz w redukcję sondy, która jest procesem odwracalnym w warunkach normoksji, a jedynie w warunkach obniżonego stężenia tlenu mogą zajść dalsze etapy redukcji jak pokazano na **Rysunku 1.6.1**.

4.3.5 Podsumowanie

W tej części pracy skupiono się na głębszym poznaniu poziomu nadekspresji poszczególnych oksydoreduktaz w warunkach niedotlenienia oraz zrozumieniu ich wpływu na aktywację sond nitro-pirazynotriazapentalenowych. Przeanalizowano poziomy ekspresji najlepiej poznanych jedno- oraz dwuelektronowych oksydoreduktaz, które posiadają potencjał do aktywacji proleków oraz sond do bioobrazowania. Badania wykonano dla sześciu linii komórek nowotworowych. Porównano ze sobą trzy metody indukcji niedotlenienia w komórkach: fizyczne obniżenie ciśnienia tlenu do 1% oraz chemiczną indukcję hipoksji za pomocą DFO oraz CoCl_2 . Wytworzenie niedotlenienia indukowało stabilizację oraz wysoką akumulację białka HIF-1 α dla większości linii komórkowych, przy czym chemiczna indukcja hipoksji za pomocą CoCl_2 powodowała najwyższe poziomy tego białka. Zauważono, że ekspresja enzymów oksydoredukcyjnych w warunkach niedotlenienia jest silnie zależna od linii nowotworowej, dlatego konieczne jest sprawdzenie poziomu poszczególnych białek dla każdego typu nowotworu z osobna. W warunkach niedotlenienia wywołanego obniżeniem ciśnienia tlenu dla komórek linii A375 oraz A2058 zidentyfikowano enzymy mogące mieć wpływ na redukcję związków nitroaromatycznych. W tych warunkach ekspresji uległy oksydoreduktazy jednoelektronowe: (POR) oraz dwuelektronowe (NQO1 oraz cytochrom C). Nadekspresją oksydoreduktaz jednoelektronowych charakteryzowała się linia A549, dla której zidentyfikowano wysokie poziomy POR, CYB5R oraz XOR. Wykazano, że ekspresja oksydoreduktaz jest powiązana z poziomami HIF-1 α oraz wpływa na efektywność redukcji sondy **2-NO₂**. Zaobserwowane różnice, w poziomie intensywności fluorescencji komórek inkubowanych z sondą wskazują na zróżnicowaną odpowiedź w zależności od linii nowotworowej co w dużej mierze powiązane jest z poziomem oksydoreduktaz. Najwyższy potencjał do selektywnej redukcji sondy w warunkach hipoksji wykazywała linia A2058 oraz A549, co koreluje z wyznaczoną wysoką nadekspresją białek w tych komórkach, szczególnie oksydoreduktaz jednoelektronowych. Ponadto zauważono, że chemiczne induktory hipoksji, pomimo iż prowadzą do podobnej lub nawet silniejszej odpowiedzi komórkowej, aktywując białko HIF-1 oraz wpływają na nadekspresję niektórych z oksydoreduktaz, nie powodują tak wysokiej i efektywnej redukcji związków nitro-pirazynotriazapentalenowych. Niewątpliwie fizyczne obniżone stężenie tlenu w tkance jest kluczowym parametrem do aktywacji sondy fluorescencyjnej.

Współistnienie dwóch parametrów, takich jak obecność oksydoreduktaz i obniżone stężenie tlenu, jest warunkiem koniecznym skutecznej terapii HAPs. W związku z tym, aby spodziewać się wysokiej skuteczności takiej terapii, konieczna jest wstępna selekcja pacjentów pod kątem występowania tkanki hipoksycznej wykazującej ekspresję konkretnych oksydoreduktaz. Jak pokazaliśmy, rodzaj oksydoreduktaz zaangażowanych w redukcję proleków oraz sond może być różny. Dodatkowo problem komplikuje fakt, że te enzymy ulegają ekspresji jedynie w niektórych typach komórek nowotworowych, dlatego profilowanie enzymów dla danego typu związku oraz ocena ich ekspresji w danym typie nowotworów jest niezwykle istotny. Na podstawie naszych badań możemy zaproponować sondę 2-NO₂ do badań przesiewowych przed zastosowaniem HAPs pozwalających ocenić jednocześnie stopień niedotlenienia i obecność oksydoreduktaz. Według mojej najnowszej wiedzy przedstawione w tym podrozdziale badania po raz pierwszy korelują efektywność redukcji badanej sondy z ekspresją enzymów potencjalnie odpowiedzialnych za aktywację fluorescencji dla różnych linii nowotworowych. Zależność aktywacji sond od nadekspresji oksydoreduktaz, poziomu niedotlenienia i linii komórkowych schematycznie przedstawiono na Rysunku 4.3.5.



Rysunek 4.3.5 Schematyczne przedstawienie wpływu niedotlenienia na ekspresję nitroreduktaz oraz aktywację sond fluorescencyjnych

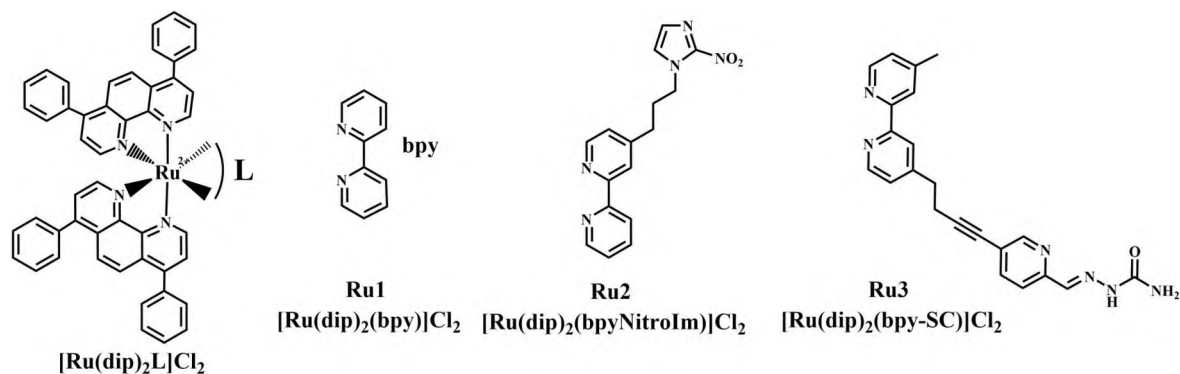
Przedstawione w tym rozdziale badania wejdą w skład publikacji, która jest w trakcie przygotowania, i w tej publikacji będę pierwszym współautorem.

4.4 Wpływ niedotlenienia na aktywność cytostatyczną i antymetastatyczną polipirydylowych kompleksów Ru(II)

Niedotlenienie tkanki nowotworowej i związana z nim nadekspresja HIF-1 α są odpowiedzialne za daleko idące modyfikacje metabolizmu komórkowego, które mają istotny wpływ na każdy z etapów kaskady przerzutowania i są uznawane za główny wskaźnik złego rokowania pacjentów [13,35,220]. Stwierdzono, że niedotlenienie jest siłą napędową w tworzeniu się nieprawidłowych naczyń krwionośnych. Ponadto niedobór tlenu jest związany ze zwiększeniem przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego komórek (EMT) oraz znacznym obniżeniem poziomu cząsteczek adhezyjnych komórek (E-kadheryny i integryny). Te zmiany z kolei powodują odrywanie się komórek od guza pierwotnego, zwiększoną migrację oraz inwazyjność komórek, a w konsekwencji indukcję spontanicznych przerzutów [12,221]. Występowanie tkanki hipoksyjnej może prowadzić do rozwoju bardziej agresywnego fenotypu guza, co wyjaśniałoby opóźnione nawroty, uśpione mikroprzerzuty czy opóźniony wzrost obserwowany w dużych guzach [12]. Należy zauważyć, że niedotlenienie nie jest cechą wyłącznie guzów makroskopowych, a również wiele mikroprzerzutów naczyniowych, o średnicy mniejszej niż 1 mm, wykazuje silne niedotlenienie [14,222]. Co więcej, oprócz złego rokowania leczenia nowotworów hipoksyjnych, niedotlenienie wiąże się z opornością na różne niechirurgiczne terapie przeciwnowotworowe [11]. Ze względu na wielokierunkowy wpływ hipoksji na kaskadę procesu przerzutowania oraz występowania tego zjawiska nawet w niewielkich guzach wtórnych, konieczny jest rozwój terapii przeciwrzutowej działającej wieloaspektowo na proces metastazy z uwzględnieniem poziomu tlenu w komórkach.

W ostatnich latach istnieje duże zainteresowanie polipirydyłowymi kompleksami Ru(II) jako związkami przeciwrzutowymi [168–170,184,223], w szczególności z wykorzystaniem terapii skojarzonej, działającej jednocześnie na kilka etapów przerzutowania. W ostatnich latach nasza grupa badawcza wykazała, że polipirydyłowe kompleksy Ru(II) znacząco wpływają na zmianę właściwości adhezyjnych komórek linii A549 oraz PANC-1, obniżając ich podatność na oderwanie od podłoża oraz jednocześnie redukując zdolność do ponownej adhezji. Uzyskane wyniki skorelowano z hamującym wpływem kompleksów na aktywność metaloproteinaz [223,224]. Otrzymane obiecujące wyniki wstępne były motywacją do podjęcia dalszych badań nad polipirydyłowymi kompleksami Ru(II). Do badań wybrano serię kompleksów typu [Ru(dip)₂L]Cl₂, które zawierały dwa ligandy 4,7-difenylo-1,10-fenantroliny (dip) oraz trzeci ligand 2,2-bipirydynę

(bpy) (**Ru1**) lub jej pochodną bpy-SC (bipirydyna zmodyfikowana pochodną semikarbazonu) (**Ru2**) lub bpy-NitroIm (bipirydyna zmodyfikowana pochodną nitroimidazolu) (**Ru3**). Struktury badanych kompleksów zostały przedstawione na **Rysunku 4.4.1**.



Rysunek 4.4.1 Wzory strukturalne badanych kompleksów Ru(II) typu $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{L})]_2^{2+}$ gdzie ($\text{L} = \text{bpy} - \mathbf{Ru1}$, $\text{bpy-NitroIm} - \mathbf{Ru2}$, $\text{bpy-SC} - \mathbf{Ru3}$).

Celem tej części pracy było zbadanie wpływu badanych kompleksów Ru(II) na różne etapy kaskady przerzutowania z uwzględnieniem warunków niedotlenienia. Aby określić potencjalne cele terapeutyczne w procesie metastazy przeprowadzone zostały badania wpływu badanych związków na właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych, ich migrację, inwazję, transmigrację oraz ponowną adhezję (re-adhezję). Badania *in vitro* przeprowadzono na dwóch liniach czerniaka: A2058 oraz A375. A2058 to wysoce inwazyjna linia komórek czerniaka charakteryzująca się wysoką ekspresją kolagenazy typu IV i niską endogenną ekspresją Wnt5a. Wysoki poziom ekspresji integryny αv , tkankowego inhibitora metaloproteinazy-2 i autokrynnego czynnika ruchliwości są odpowiedzialne za jej wysoki potencjał przerzutowy [225,226]. A375 to linia komórek ludzkiego czerniaka złośliwego o niskiej sile przerzutowania, charakteryzująca się obecnością receptorów adenozykowych, odpowiedzialnych za modulację procesów nowotworowych [227,228].

4.4.1 Cytotoksyczność oraz akumulacja

Wpływ badanych polipirydylowych kompleksów Ru(II) na żywotność komórek oceniono na dwóch liniach komórkowych czerniaka A375 i A2058 oraz nienowotworowych uniesmiertelnionych keratynocytach HaCat. Badane związki porównano z zatwierdzonym lekiem cytostatycznym, cisplatyną (**Tabela 4.4.1**). Wszystkie trzy kompleksy przejawiały dużo wyższe działanie cytotoksyczne niż dobrze znana cisplatyna. Badane kompleksy wykazywały umiarkowane działanie względem linii A375, natomiast zaobserwowano znacznie wyższą toksyczność względem wysoce metastatycznej linii komórkowej czerniaka A2058, co jest niezwykle istotne ze względu na częste występowanie oporności na chemioterapię przy bardziej inwazyjnych typach nowotworów [229]. Zastosowanie związków w komórkach hodowanych w warunkach hipoksji spowodowało nieznaczne zmniejszenie ich skuteczności cytotoksycznej. Jak wiadomo jednym z głównych mechanizmów działania kompleksów Ru(II) jest uszkodzenie struktur komórkowych poprzez wytworzenie reaktywnych form tlenu i w konsekwencji wywołanie stresu oksydacyjnego [230], w związku z czym w warunkach niedotlenienia ta ścieżka reakcji jest zahamowana, co może być powodem niższej cytotoksyczności. Również dla cisplatyny zaobserwowano ponad dwukrotne obniżenie hamowania żywotności w tych warunkach. Należy jednak zauważyć, że w warunkach silnego niedotlenienia IC_{50} dla badanych kompleksów Ru(II) nadal było poniżej $20 \mu\text{M}$, co w porównaniu z cisplatyną wciąż było kilkunastokrotnie lepszym wynikiem.

Tabela 4.4.1 Cytotoksyczność (IC_{50}) kompleksów Ru(II) i cisplatyny wyznaczona dla komórek A375, A2058 oraz HaCat w warunkach normoksji (21% O_2) i hipoksji (1% O_2).

	$IC_{50}/\mu\text{M}$					
	A375		A2058		HaCat	
	normoksja	hipoksja	normoksja	hipoksja	normoksja ^a	hipoksja
Ru1	$9,7 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,9$	$6,7 \pm 0,3$	22 ± 3	14 ± 3
Ru2	$11,2 \pm 0,9$	20 ± 1	$10,8 \pm 0,8$	18 ± 3	19 ± 4	16 ± 2
Ru3	$15,0 \pm 0,6$	12 ± 2	$4,7 \pm 0,5$	15 ± 2	$27,7 \pm 0,8$	$18,6 \pm 0,6$
cisplatyna	61 ± 5	145 ± 30	53 ± 9	182 ± 44	71 ± 14	41 ± 2

^a Pomiary wykonane przez dr Ilonę Gurgul

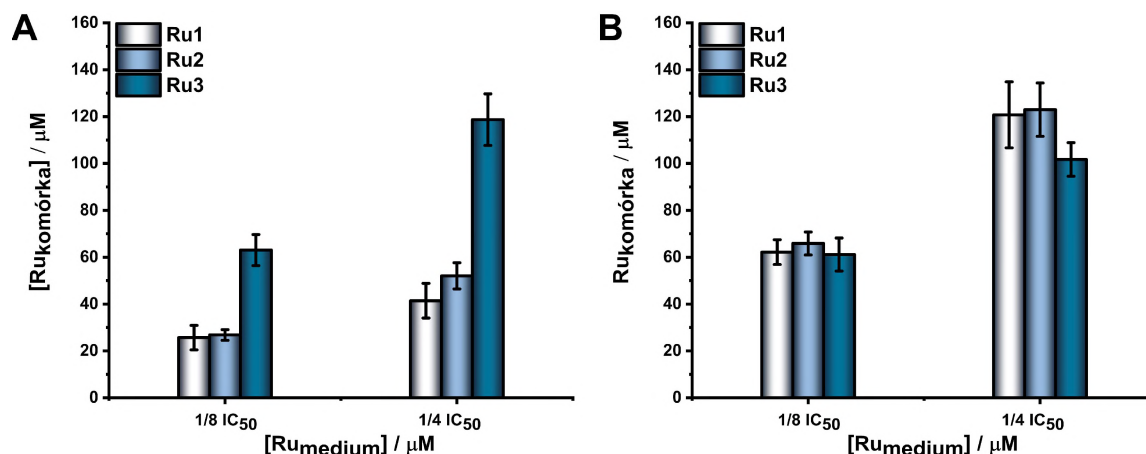
Warto zwrócić również uwagę, że dla wszystkich trzech kompleksów Ru(II) cytotoksyczność wobec ludzkich nienowotworowych komórek HaCat była znacząco niższa niż w przypadku komórek nowotworowych. Jednocześnie toksyczność cisplatyny pozostała na tym samym poziomie. Kompleksy Ru(II) były 2-4 razy mniej cytotoksyczne przeciwko HaCat niż przeciwko komórkom A2058, co świadczy o możliwej selektywności względem komórek nowotworowych.

Cytotoksyczność kompleksów Ru(II) była silnie skorelowana z ich zdolnością do akumulacji w komórkach, którą wyznaczono dla stężeń $1/8$ i $1/4$ IC_{50} , aby móc porównywać konieczną ilość związku potrzebną do wywołania tego samego efektu. Stężenia stosowane w poniższych badaniach dla poszczególnych związków zestawiono w **Tabeli 4.4.2**.

Tabela 4.4.2 Zestawienie stosowanych w dalszej części badań nietoksycznych stężeń kompleksów Ru(II) dla linii A375 oraz A2058 zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji.

	[μ M]			
	A375		A2058	
	$1/4$ IC_{50}	$1/2$ IC_{50}	$1/4$ IC_{50}	$1/2$ IC_{50}
Ru1	1	2	0,5	1
Ru2	1	2	1	2
Ru3	2	4	0,5	1

Badania akumulacji kompleksów Ru(II) w obu typach komórek nowotworowych w warunkach fizjologicznych wykonano przy użyciu ICP-MS i przedstawiono na **Rysunku 4.4.2** jako stężenie jonów Ru wewnątrz pojedynczej komórki w zależności od stosowanego stężenia podczas inkubacji.



Rysunek 4.4.2 Akumulacja jonów Ru w komórkach linii A375 (A) oraz A2058 (B) wyznaczona metodą ICP-MS, po 24 h inkubacji z $[Ru(dip)_2(bpy)]Cl_2$ (**Ru1**, szary), $[Ru(dip)_2(bpy-NitroIm)]Cl_2$ (**Ru2**, jasny niebieski) i $[Ru(dip)_2(bpy-SC)]Cl_2$ (**Ru3**, granat) przedstawiona jako stężenie w pojedynczej komórce.

Badane związki efektywnie akumulowały się w obu liniach komórkowych, a poziom akumulacji był zależny od zadanego stężenia podczas inkubacji. Szczególnie wysoką akumulację zaobserwowano dla linii A2058 gdzie uzyskano ponad 120-krotny wzrost stężenia jonów Ru w porównaniu do ich stężenia w medium (**Tabela 4.4.3**). Dla tych komórek poziom zakumulowanych związków był na podobnym poziomie niezależnie od modyfikacji podstawnika. Natomiast dla linii A375 zaobserwowano niższy wzrost stężenia jonów Ru w komórkach, będący ok. 20 - 30 krotnie większy w stosunku do medium.

Co więcej, dla tych komórek wymagane było znacznie większe stężenie **Ru3** w komórce wynoszące ok. 120 μM , aby uzyskać efekt 1/4 IC_{50} , podczas gdy dla pozostałych związków było to stężenie ok. 50 μM .

Tabela 4.4.3 Akumulacja kompleksów Ru(II) ($[\text{Ru}_{\text{komórka}}]/[\text{Ru}_{\text{medium}}]$) w komórkach A375, A2058 w warunkach normoksji (21% O_2) oraz lipofilowość clogP dla ligandów pomocniczych.

	Akumulacja $[\text{Ru}_{\text{komórka}}]/[\text{Ru}_{\text{medium}}]^a$		
	Ru1	Ru2	Ru3
A375 (normoksja)	~23×	~26×	~30×
A2058 (normoksja)	~122×	~63×	~112×
clogP^b	1,564	2,002	2,455

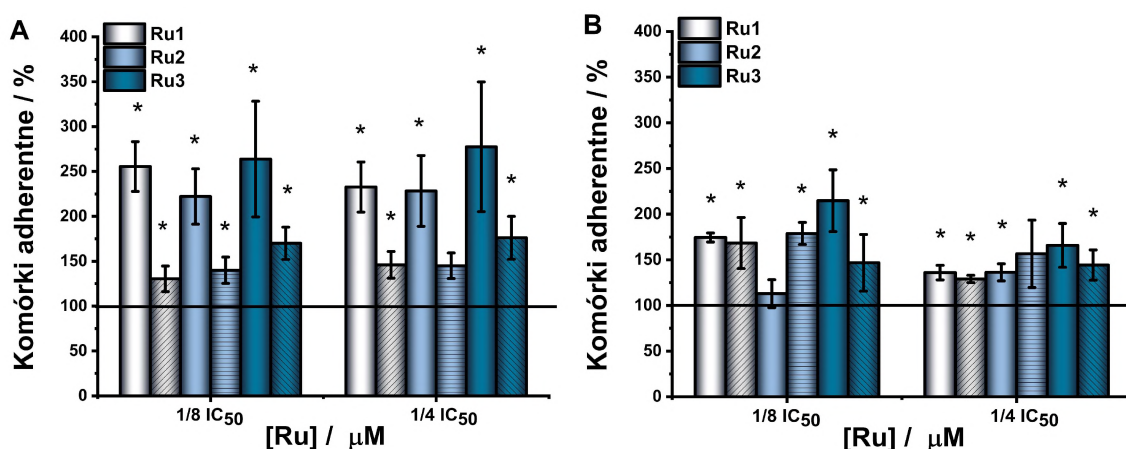
^a Akumulacja obliczona jako stosunek stężenia kompleksu Ru(II) w komórce (oznaczonego metodą ICP-MS) oraz stężenia kompleksu Ru(II) w medium. Wynik wyznaczony niezależnie dla dwóch stężeń: 1/8 IC_{50} oraz 1/4 IC_{50} ; ^b lipofilowość clogP dla ligandów pomocniczych, obliczona z wykorzystaniem programu ChemDraw Professional 17.1

Ze względu na często spotykane trudności w wyznaczeniu lipofilowości z wykorzystaniem standardowej metody wytrząsania oraz wiedząc że $\log P$ eksperymentalne dla kompleksów Ru(II) dobrze koreluje z wyliczonym clogP [223] obliczono clogP dla ligandów z wykorzystaniem ogólnie dostępnych programów. Kompleksy nie różnią się znacząco wyliczonym clogP , co tłumaczy podobną akumulację niezależnie od struktury wprowadzonego ligandu. Skłonność kompleksów do gromadzenia się w komórkach jest ważnym czynnikiem aktywności cytotoksycznej, ale kluczową rolę odgrywa zdolność dotarcia do odpowiednich organelli i interakcji z odpowiednimi celami w komórce.

4.4.2 Wpływ na właściwości adhezyjne i re-adhezyjne komórek

Pierwszym istotnym etapem w kaskadzie metastazy jest zdolność komórek nowotworowych do oderwania się z guza pierwotnego i ECM. Badania nad określeniem korelacji między opornością na oderwanie komórek od powierzchni a powstawaniem przerzutów wskazują, że subpopulacja komórek wrażliwych na traktowanie trypsyną indukuje zwiększony potencjał metastatyczny niż komórki odporne na oderwanie [231]. Dodatkowo wiadome jest, że w progresji i przerzutowaniu nowotworów, w tym szczególnie czerniaka, istotny wpływ mają cząsteczki adhezyjne, które są kluczowe w modulowaniu interakcji między komórkami [232]. W związku z tym zwiększenie przyczepności komórek do podłoża jest jednym z podstawowych celów terapeutycznych podczas projektowania leków przeciwprzerzutowych. Potencjał związków Ru(II) do zwiększenia właściwości adhezyjnych komórek linii A375 oraz A2058 zweryfikowano wykorzystując test oporności na trypsynizację. Badane linie komórkowe należą do kultur adherentnych, czyli rosną

i namnażają się jedynie po przyłączeniu do powierzchni naczynia hodowlanego. Komórki po 24-godzinnej inkubacji z kompleksami Ru(II) poddano krótkiej inkubacji z rozcieńczonym roztworem trypsyny w celu zminimalizowania uszkodzenia komórek i jednoczesnym oderwaniu części komórek od podłoża. Ilość komórek, które nie uległy oderwaniu i wykazały oporność na traktowanie trypsyną oceniono ilościowo za pomocą testu żywności z zastosowaniem resazuryny. Wyniki przedstawione na **Rysunku 4.4.3**, wyraźnie wskazują, że wszystkie badane kompleksy znacząco wpływają na obniżenie wrażliwości komórek na odrywanie za pomocą trypsyny.

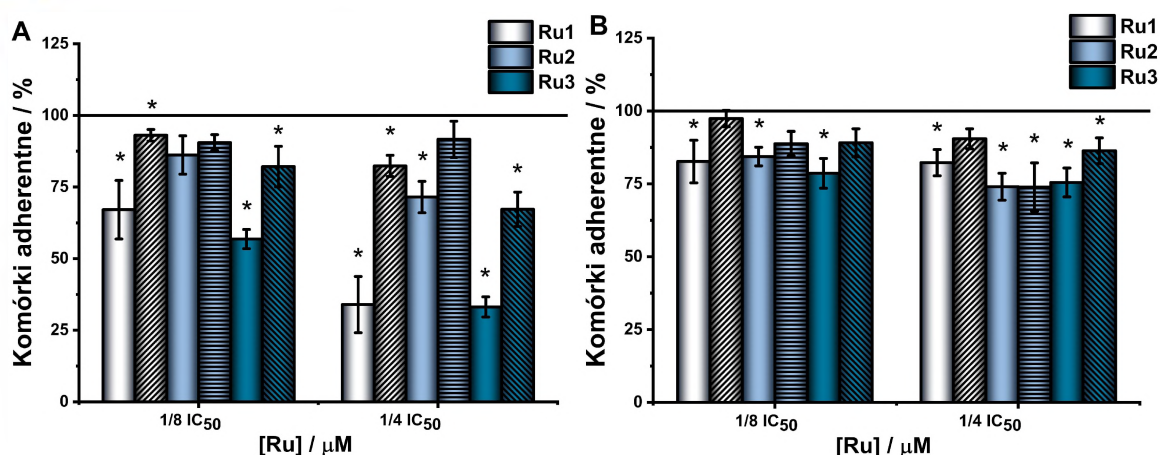


Rysunek 4.4.3 Ilość komórek linii A375 (A) oraz A2058 (B) przyklejonych do powierzchni płytki przedstawiona jako procent komórek pozostałych po kontrolowanym traktowaniu trypsyną. Komórki inkubowane 24 h z $[Ru(dip)_2(bpy)]Cl_2$ (**Ru1**, szary), $[Ru(dip)_2(bpy-NitroIm)]Cl_2$ (**Ru2**, jasny niebieski) i $[Ru(dip)_2(bpy-SC)]Cl_2$ (**Ru3**, granat) w warunkach normoksji (pełne słupki) i hipoksji (kreskowane słupki). Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę (100%). * $p < 0,05$.

Wywołane efekty nie były zależne od stężenia, a zastosowanie niskich stężeń wynoszących 1/8 IC₅₀ już wystarczało, aby obserwować wyraźne efekty. Porównując linie komórkowe o różnej inwazyjności zauważono, że dla linii A375 widoczny był bardzo silny wzrost właściwości adhezyjnych po inkubacji z kompleksami Ru(II), które wywołały ok. 3-krotny wzrost ilości komórek adhezyjnych opornych na trypsynizację. W warunkach niedotlenienia odnotowano zmniejszony, ale nadal istotny wpływ na adhezję tych komórek. Natomiast traktowanie wysoce przerzutowych komórek A2058 związkami Ru(II) wywołało nieco mniejszą oporność na działanie trypsyny w warunkach normoksji. Warto zauważyć, że hipoksja w tym przypadku nie zmniejsza w istotny sposób wpływu związków na adhezję komórek. W przypadku komórek A375 nie zaobserwowano różnic wynikających z różnych ligandów w kompleksach, natomiast w przypadku komórek A2058 najsilniejszy efekt widoczny był dla **Ru3**, stosując niskie stężenia związków wynoszące 1/8 IC₅₀.

Podsumowując obserwowany wynik silnie zależał od rodzaju linii komórkowej, co wskazuje na dużą heterogeniczność komórek nowotworowych oraz występowanie większej oporności wysoce inwazyjnych komórek na działanie kompleksów Ru(II). Przedstawione dane wyraźnie wykazują korzystny wpływ polipirydylowych kompleksów Ru(II) na wzrost właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych, a tym samym zablokowanie odrywania się ich od guza pierwotnego i w konsekwencji obniżenie potencjału metastatycznego.

Ponowna adhezja komórek do podłoża jest jednym z końcowych etapów przerzutowania, szczególnie istotna podczas zatrzymania się komórek nowotworowych w naczyniu krwionośnym, co jest możliwe dzięki przyczepieniu się ich do śródbłonna naczyniowego oraz jest niezbędna do rozpoczęcia procesu ekstrawazacji. Co więcej, jest ona konieczna podczas kolonizacji komórek w obcym mikrośrodkowisku, i umożliwia przeżycie, proliferację oraz utworzenie guza wtórnego. W związku z tym oceniono wpływ badanych kompleksów na zdolność komórek nowotworowych do ponownego przyczepienia się do powierzchni po wcześniejszym oderwaniu. Komórki traktowane 24 godziny nietoksycznymi dawkami kompleksów Ru(II) ($1/4 IC_{50}$ i $1/8 IC_{50}$) oderwano od podłoża i ponownie wysiano na 96-dółkowe płytki. Zoptymalizowano czas niezbędny do zajęcia adhezji komórek nowotworowych dla badanych linii, który wyniósł 1 h. Taki czas inkubacji był wystarczający do uzyskania odpowiedniego poziomu adhezji dla komórek kontrolnych. Jak pokazano na **Rysunku 4.4.4**, spadek skuteczności ponownej adhezji komórek występował dla wszystkich kompleksów. Największe hamowanie re-adhezji zaobserwowana dla **Ru3**, a w następnej kolejności dla **Ru1**. Dla komórek A375 efekt inhibicji re-adhezji był silnie widoczny i zależał od stężenia kompleksów Ru(II), podczas gdy w przypadku komórek A2058 efekt był zdecydowanie mniejszy, chociaż również statystycznie istotny, ale w mniejszym stopniu zależał od stężenia związku. Warunki niedotlenienia sprawiły, że traktowanie kompleksami Ru(II) osłabiło komórki A375, zachowując ich właściwości do ponownej adhezji zbliżone do kontroli. Niski wpływ związków Ru(II) na właściwości adhezyjne i re-adhezyjne komórek A375 w warunkach niedotlenienia sugeruje, że warunki obniżonego poziomu tlenu indukują zmiany fenotypowe w komórkach, czyniąc je bardziej odpornymi na zmiany molekularne indukowane przez badane związki.



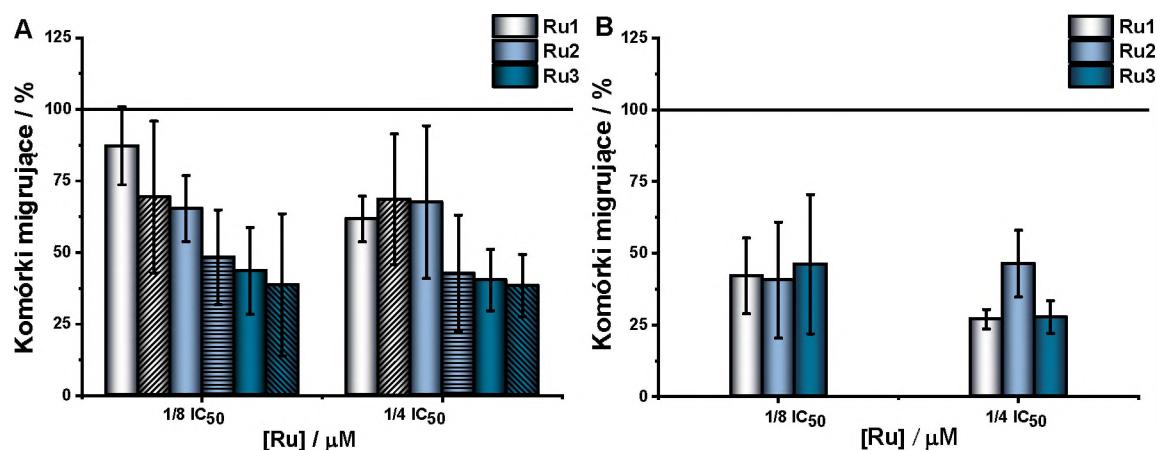
Rysunek 4.4.4 Zdolność komórek linii A375 (A) oraz A2058 (B) do re-adhezji do plastiku mierzona po 24 h inkubacji z $[Ru(dip)_2(bpy)]Cl_2$ (**Ru1**, szary), $[Ru(dip)_2(bpy-NitroIm)]Cl_2$ (**Ru2**, jasny niebieski) i $[Ru(dip)_2(bpy-SC)]Cl_2$ (**Ru3**, granat) w warunkach normoksji (pełne słupki) i hipoksji (kreskowane słupki). Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę. * $p < 0,05$

Opisany powyżej przeciwstawny wpływ związków Ru na właściwości adhezyjne komórek nowotworowych, które z jednej strony wzmacniają przyczepność komórek do podłoża, a jednocześnie hamują zdolność do ponownej adhezji, może być spowodowany aktywacją innego typu cząsteczek adhezyjnych (CAM) zaangażowanych w adhezję komórkową w porównaniu z procesem ponownej adhezji. W obu opisywanych procesach **Ru3** wykazywał wysoką aktywność ich inhibicji, jednak jego aktywność zależała od linii komórkowej. Uzyskane wyniki potwierdzają istnienie wyraźnej heterogeniczności pomiędzy liniami komórkowymi, dodatkowo pogłębianej przez warunki niedotlenienia.

4.4.3 Wpływ na migrację, inwazję i transmigrację komórek nowotworowych

Jedną z głównych cech nowotworów złośliwych jest wzmożona zdolność komórek nowotworowych do migracji i inwazji, które są istotne na wielu etapach kaskady przerzutowania. Komórki nabywając zdolność do poruszania się, penetrują otaczającą tkankę i przedostają się do naczyń krwionośnych i limfatycznych, co w konsekwencji umożliwia ich rozsianie się w organizmie. Procesy migracji i inwazji wymagają zaangażowania szerokiego wachlarza mechanizmów komórkowych związanych z dynamiką cytoszkieletu, a także zmian molekularnych takich jak nadekspresja enzymów adhezyjnych i proteolitycznych [221]. Migracja komórek sama w sobie jest wysoce zintegrowanym procesem, który obejmuje rozwój wypustek cytoplazmatycznych, równowagę pomiędzy procesem przylegania komórki, a jej odrywaniem się od podłoża oraz kurczliwością cytoszkieletu umożliwiającą przemieszczenie komórki [233]. Co więcej niedotlenienie komórek nowotworowych drastycznie aktywuje procesy migracyjne komórek poprzez

zmniejszenie ekspresji E-kadheryny oraz promowanie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). Aktywność HIF-1 α może również wpływać na ekspresję enzymów, które polimeryzują i regulują ułożenie włókien kolagenowych oraz na aktywność integrzyn promując migrację nowotworu [220,234]. W celu sprawdzenia czy migracja może być celem terapeutycznym w przypadku stosowanych kompleksów Ru(II) zbadano ich wpływ na zdolności migracyjne komórek nowotworowych wykorzystując inserty z mikroporowatą membraną (system Transwell).

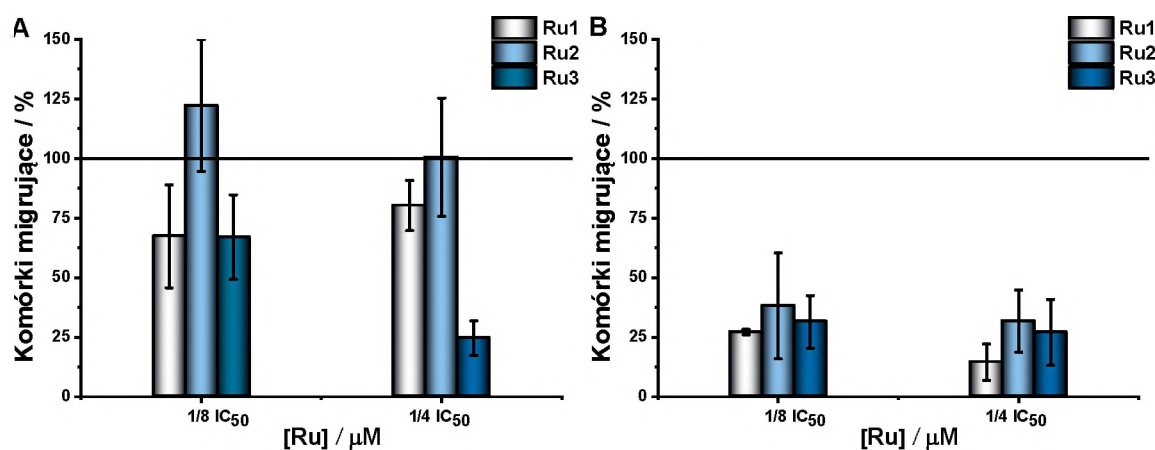


Rysunek 4.4.5 Wpływ badanych kompleksów $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bpy})]\text{Cl}_2$ (**Ru1**, szary), $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bpy-NitroIm})]\text{Cl}_2$ (**Ru2**, jasny niebieski) i $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bpy-SC})]\text{Cl}_2$ (**Ru3**, granat) na zdolność komórek linii A375 (A) oraz A2058 (B) do migracji przez mikroporowatą membranę w warunkach normoksji (pełne słupki) i hipoksji (kreskowane słupki). Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę. **Metoda I:** bezpośrednia inkubacja komórek z kompleksami Ru(II) w insercie przez 16 h.

Na **Rysunku 3.8.1** w części eksperymentalnej przedstawiono schematycznie procedurę testu migracji w dwóch modyfikacjach. Aby ocenić wpływ kompleksów Ru(II) na właściwości migracyjne, zawiesinę komórek wprowadzono do górnej komory systemu Transwell w medium zawierającym 1% FBS oraz zadano badanymi związkami w odpowiednim, nietoksycznym stężeniu. Do dołka wprowadzono medium zawierające takie same stężeniu Ru(II) oraz 20% FBS, który pełnił funkcję chemoatraktantu i promował migrację przez membranę. Gradient chemotaktyczny z wykorzystaniem FBS był wystarczający do promowania migracji A375, natomiast aby wywołać migrację komórek A2058 konieczna była 24 - godzinna inkubacja w medium bez surowicy przed eksperymentem (tzw. głódzenie). Zdolność do migracji komórek przez błonę określono ilościowo po 16 godzinach inkubacji, wykorzystując fiolet krystaliczny. Otrzymane wyniki (**Rysunek 4.4.5**) wskazują, że wszystkie testowane kompleksy silnie hamowały migrację zarówno komórek A375, jak i A2058.

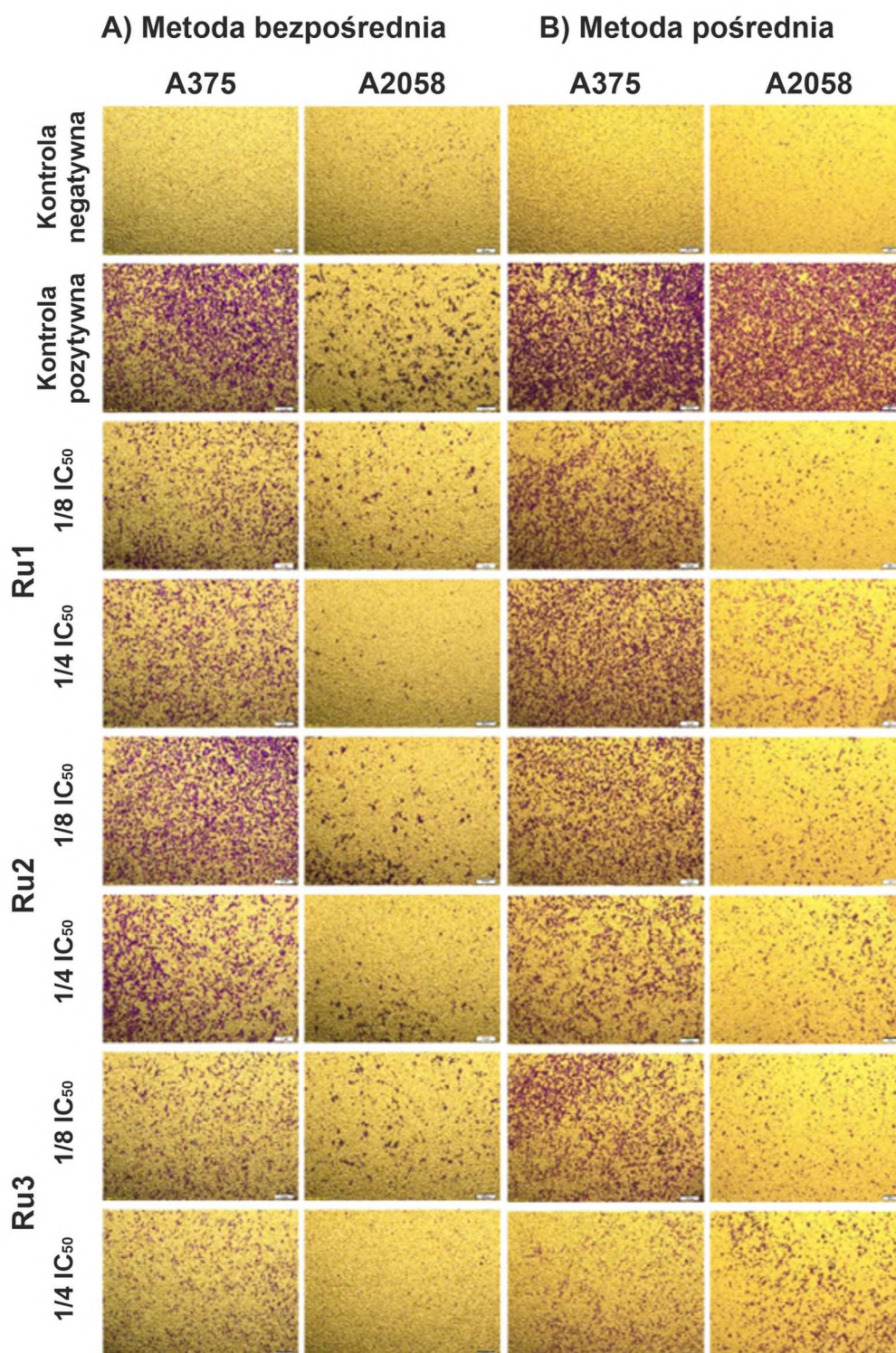
Najsilniejszy wpływ na mobilność miał **Ru3**, który tłumiał ruchliwość komórek o ponad 50%. Warunki hipoksji zastosowano jedynie dla jednej linii nowotworowej tj. A375 ze względu na problem z wywołaniem migracji komórek A2058 w tych warunkach dla kontroli. Niedotlenienie komórek A375 nie obniżało hamującego działania Ru(II). Co więcej, **Ru2**, który dzięki ugrupowaniu nitroimidazolu może efektywnie redukować się kance hipoksycznej [184], hamował migracje komórek nowotworowych w hipoksji nieco bardziej niż w normoksji.

W celu oceny zmian właściwości adhezyjnych komórek wywołanych poprzez wcześniejszą inkubację z kompleksami Ru(II) na ich migrację, zmodyfikowano poprzedni protokół. W tym przypadku zastosowano wstępną, 24 - godziną inkubację komórek nowotworowych z badanymi związkami przed ich wysianiem do komory migracyjnej (**Metoda 2**). Dla tego protokołu badań również **Ru3** był najsukuteczniejszym inhibitorem migracji (**Rysunek 4.4.6**).



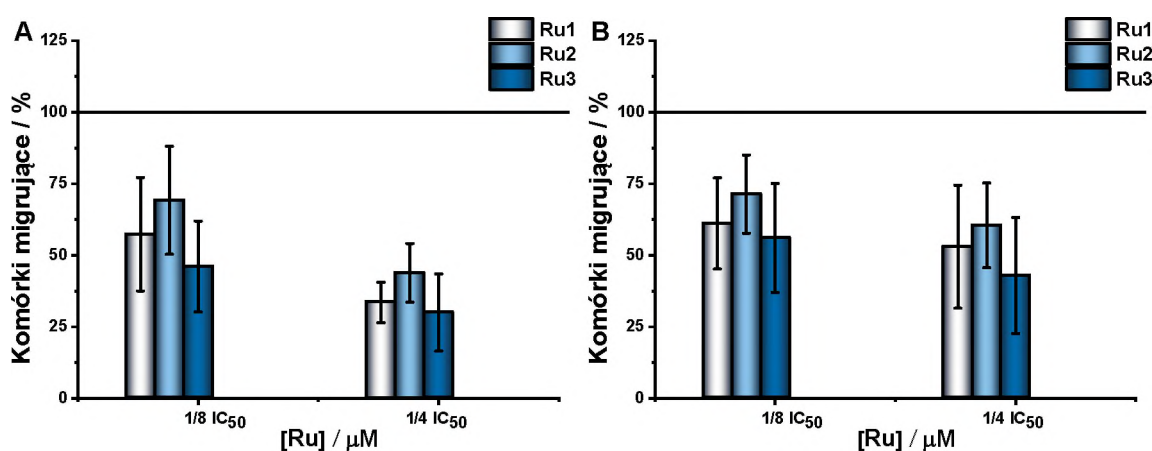
Rysunek 4.4.6 Wpływ badanych kompleksów $[Ru(dip)_2(bpy)]Cl_2$ (**Ru1**, szary), $[Ru(dip)_2(bpy-NitroIm)]Cl_2$ (**Ru2**, jasny niebieski) i $[Ru(dip)_2(bpy-SC)]Cl_2$ (**Ru3**, granat) na zdolność komórek linii A375 (A) oraz A2058 (B) do migracji przez mikroporowatą membranę w warunkach normoksji. Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę. **Metoda II**: 24 h preinkubacja komórek z kompleksami Ru(II), a po oderwaniu pomiar zdolności migracyjnych z użyciem insertów.

Generalnie w tej metodzie zahamowanie ruchliwości komórek było nieco silniejsze niż podczas traktowania komórek kompleksami Ru(II) bezpośrednio w insercie. Można wytłumaczyć ten fakt tym, że preinkubacja komórek z kompleksami Ru(II) spowodowała zmiany w białkach adhezyjnych, powodując zahamowanie zdolności do ponownej adhezji komórek. Dla linii A375 **Ru2** nie hamował migracji w tych warunkach, podczas gdy zastosowano metodę bezpośrednią efekt był widoczny i wynosił ok. 25%. Zestawienie zdjęć obrazujących wpływ kompleksów Ru(II) na właściwości migracyjne przedstawiono na **Rysunku 4.4.7**.



Rysunek 4.4.7 Zestawienie zdjęć z mikroskopu optycznego obrazujących wpływ badanych kompleksów Ru(II) na zdolność komórek linii A375 oraz A2058 na proces migracji przez mikroporowatą membranę. **A)** bezpośrednia inkubacja kompleksów Ru(II) z komórkami w insercie; **B)** 24 h preinkubacja komórek z kompleksami Ru(II), a po oderwaniu pomiar zdolności migracyjnych z użyciem insertów.

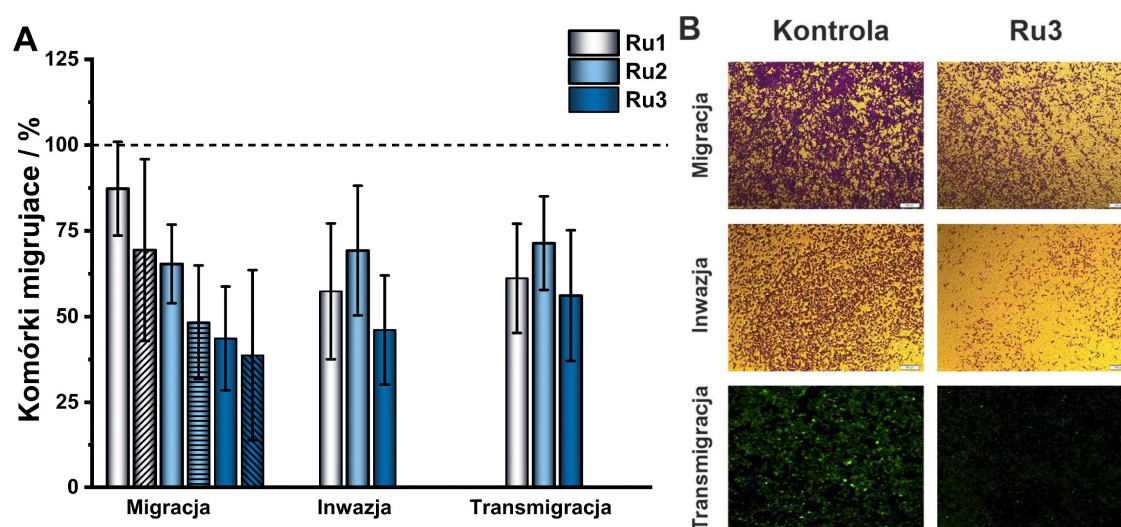
Poprzez modyfikację systemu Transwell można również ocenić zdolność komórek nowotworowych do inwazji oraz transmigracji poprzez śródbłonek. W celu oceny wpływu polipirydylowych kompleksów Ru(II) na inwazję, mikroporowatą membranę pokryto syntetyczną matrycą Geltrex®, która naśladuje macierz podstawową guza. Badania przeprowadzono dla komórek A375, które charakteryzowały się większą ruchliwością. Ze względu na wykazany wcześniej brak wpływu niedotlenienia na migrację komórek eksperyment wykonano jedynie w normoksji. Jak pokazano na **Rysunku 4.4.8A**, wszystkie badane kompleksy hamowały inwazję komórek, a obserwowany efekt był zależny od stężenia. Po raz kolejny **Ru3** wykazywał najsilniejsze działanie hamujące, natomiast dla wyższego stężenia ($1/4 IC_{50}$), wszystkie trzy związki tłumili inwazję o ponad 50%.



Rysunek 4.4.8 Wpływ badanych kompleksów $[Ru(dip)_2(bpy)]Cl_2$ (**Ru1**, szary), $[Ru(dip)_2(bpy-NitroIm)]Cl_2$ (**Ru2**, jasny niebieski) i $[Ru(dip)_2(bpy-SC)]Cl_2$ (**Ru3**, granat) na zdolność komórek A375 do inwazji przez mikroporowatą membranę pokrytą Geltrex® (**A**) oraz transmigracji przez mikroporowatą membranę pokrytą monowarstwą komórek śródbłonna (**B**) w normoksji. Nietraktowane komórki zastosowane jako kontrolę.

Ponadto oceniono transmigrację komórek nowotworowych A375 przez monowarstwą komórek śródbłonna HMEC-1. Zdolność komórek nowotworowych do przekraczania bariery komórek śródbłonna jest niezbędna podczas procesu intrawazacji oraz ekstrawazacji, a więc inhibicja tych procesów może przyczynić się do zablokowania procesu metastazy. W celu odróżnienia komórek nowotworowych od komórek śródbłonna, komórki A375 wyznakowano fluorescencyjnie. Inkubacja komórek nowotworowych z kompleksami Ru(II) doprowadziła do obniżenia całkowitej liczby komórek transmigrujących na zbliżonym poziomie jak zaobserwowano w badaniach inwazji komórek przez matrycę Geltrex® (**Rysunek 4.4.8B**). Również w tym przypadku **Ru3** najsilniej hamował mobilność komórek nowotworowych, natomiast jedynie nieco mniej skuteczny okazał się **Ru2**.

Jak pokazano na **Rysunku 4.4.9** badane polipirydylowe kompleksy Ru(II) miały znaczący wpływ na zahamowanie zarówno procesu migracji, inwazji oraz transmigracji już przy zastosowaniu bardzo niskich stężeń. Oddziaływanie na każdy z powyższych etapów jest niezwykle istotne pod kątem inhibicji rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych. Modyfikacja ligandu bpy polegająca na wprowadzeniu podstawnika będącego pochodną semikarbazonu znacząco wzmocniła działanie hamujące ruchliwość komórek nowotworowych. Co więcej nie zaobserwowano niekorzystnego wpływu niedotlenienia na właściwości związków, co daje potencjalne możliwości ich zastosowania do leczenia guzów zawierających tkanki hipoksyczne.



Rysunek 4.4.9 A) Porównanie wpływu badanych kompleksów $[Ru(dip)_2(bpy)]Cl_2$ (**Ru1**, szary), $[Ru(dip)_2(bpy-NitroIm)]Cl_2$ (**Ru2**, jasny niebieski) i $[Ru(dip)_2(bpy-SC)]Cl_2$ (**Ru3**, granat) na zdolność komórek A375 do migracji, inwazji oraz transmigracji w normoksji (pełne słupki) i hipoksji (kreskowane słupki). Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę. **B)** Zestawienie zdjęć z mikroskopu optycznego lub fluorescencyjnego obrazujących wpływ **Ru3** na procesy migracji, inwazji oraz transmigracji

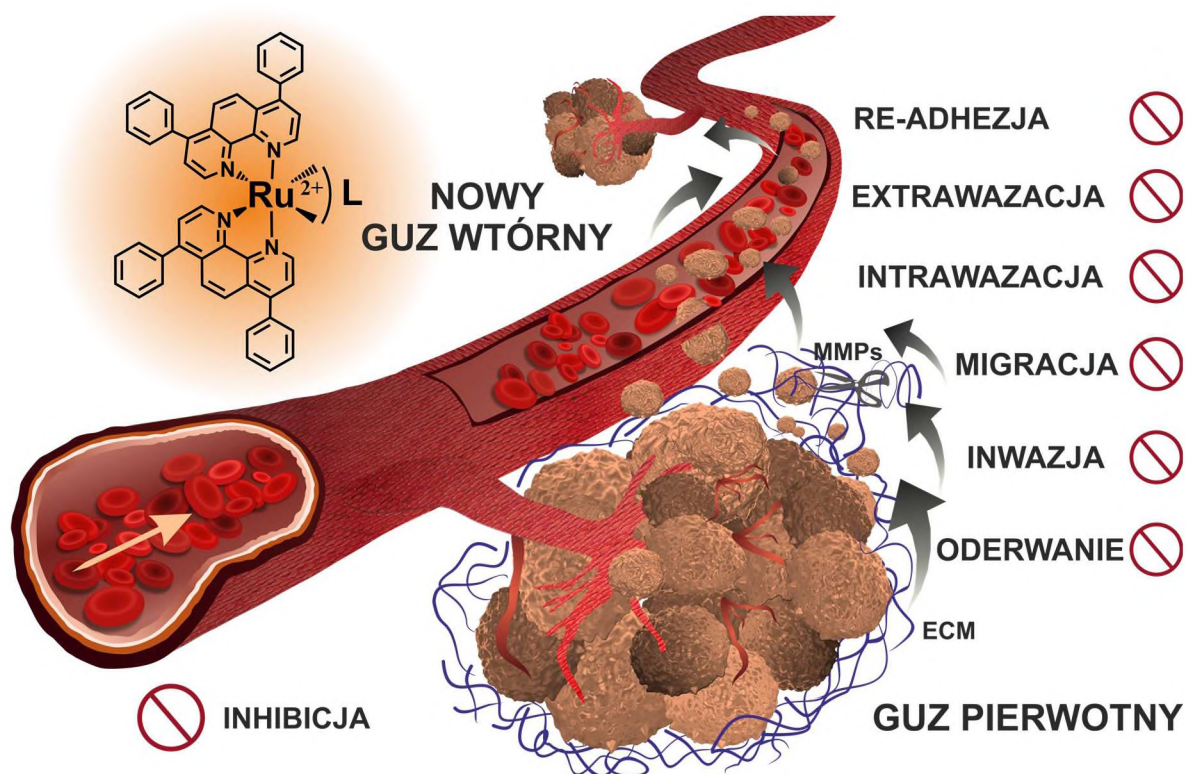
4.4.4 Podsumowanie

Podsumowując, w tej części pracy wykazano, że proces metastazy, jeden z kluczowych aspektów złego rokowania guzów hipoksycznych, może być hamowany przez przebadane polipirydylowe kompleksy Ru(II), poprzez równoczesne działanie na wiele etapów kaskady przerzutowania (**Rysunek 4.4.10**). Opisano potencjał kompleksów Ru(II) do modyfikacji właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych. Badane związki jednocześnie wzmacniają oddziaływania adhezyjne komórek do powierzchni tworzywa sztucznego, uniemożliwiając ich oderwanie, natomiast po ich oderwaniu od pierwotnego siedliska ponowna adhezja do powierzchni ulega znacznemu zahamowaniu. Takie równoległe działanie na wzmocnienie adhezji oraz inhibicję re-adhezji zapobiega odrywaniu się komórek nowotworowych od guza pierwotnego i tym samym zmniejsza szansę komórek metastatycznych na opuszczenie otaczającej tkanki, i jednocześnie uniemożliwia ekstrawazację przez naczynie krwionośne oraz kolonizację w nowym, odległym miejscu. Zastosowanie warunków niedotlenienia, nie zmieniło istotnie cytotoksyczności badanych związków, co jest bardzo obiecującym efektem, natomiast osłabiło obserwowany wpływ na właściwości adhezyjne.

Tworzenie i rozpad ognisk adhezyjnych napędzają migrację komórek i odgrywają kluczową rolę w skłonności komórek nowotworowych do inwazji. Wszystkie badane związki wyraźnie zmniejszyły kluczowe procesy przerzutowania, czyli migrację, inwazję i transmigrację. Traktowanie kompleksami Ru(II) spowodowało znaczne obniżenie mobilności komórek nowotworowych, zarówno nisko inwazyjnej linii czerniaka A375 jak i wysoce inwazyjnej linii A2058 w normoksji oraz hipoksji. Proces inwazji i transmigracji przez monowarstwę komórek śródbłonna był również widocznie zahamowany dla badanej linii A375. Warto zwrócić uwagę, że wszystkie obserwowane zmiany funkcjonalne w komórkach nowotworowych były zarejestrowane dla dawek znacznie niższych niż stężenie cytotoksyczne. Dzięki stosowaniu tak niskich dawek leku wydaje się być możliwe zastosowanie kompleksów Ru(II) w małoinwazyjnej terapii niskodawkowej.

Najsilniej działającym związkiem we wszystkich istotnych testach był **Ru3**, który wykazywał najsilniejsze zmiany w adhezji i mobilności komórek. Dodatkowo wykazywał doskonały wychwyty przez komórki i był szczególnie cytotoksyczny wobec wysoce inwazyjnej linii czerniaka A2058. Zaobserwowane różnice w działaniu poszczególnych kompleksów wskazują, że modyfikacja struktury liganda bpy polegająca na wprowadzeniu pochodnej nitroimidazolu lub semikarbazonu wpływa korzystnie na właściwości

antymetastatyczne kompleksów Ru(II). Warunki hipoksji, pomimo tworzenia bardziej opornego na leczenie fenotypu komórek, nie zniwelowały całkowicie antymetastatycznego wpływu kompleksów Ru(II), co umożliwia stosowanie ich również w guzach o zidentyfikowanych obszarach silnego niedotlenienia. Przedstawiona różnorodność celów terapeutycznych w kaskadzie metastazy i wywoływanych efektów połączona ze skutecznym działaniem w warunkach niedotlenienia wskazują, że badane związki Ru(II) mogą być interesującymi kandydatami do dalszych badań w kierunku skutecznej terapii przeciwrzutowej. Należy zaznaczyć, że platformy *in vitro* stosowane w niniejszych badaniach mają wiele ograniczeń w stosunku do eksperymentów *in vivo*, niemniej jednak są podstawowym narzędziem do badań przesiewowych nad właściwościami potencjalnych leków ingerujących w proces przerzutowania.



Rysunek 4.4.10 Schematyczne przedstawienie antymetastatycznego wpływu polipirydylowych kompleksów Ru(II) na komórki nowotworowe.

Przedstawione w tym rozdziale badania weszły w skład publikacji:

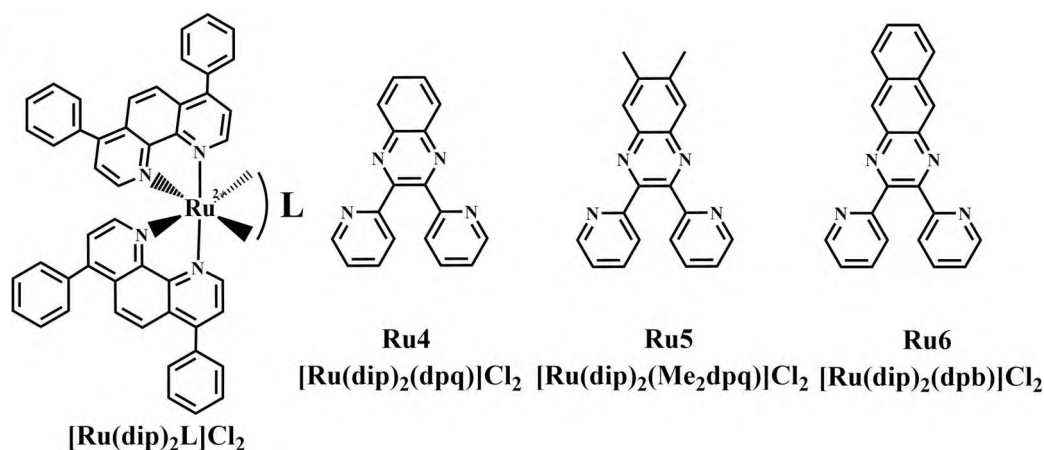
I. Gurgul[#], E. Janczy-Cempa[#], O. Mazuryk, M. Lekka, M. Łomzik, F. Suzenet, P. C. Gros, M. Brindell "Inhibition of metastasis by polypyridyl Ru(II) complexes through modification of cancer cell adhesion – *in vitro* functional and molecular studies" *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 15, 10459–10470. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c00580

[#]obaj autorzy w równym stopniu przyczynili się do powstania tej pracy

4.5 Wpływ niedotlenienia komórek nowotworowych na aktywność biologiczną polipirydylowych kompleksów Ru(II) w terapii fotodynamicznej

Jednym z głównych, niekorzystnych aspektów niedotlenienia tkanki nowotworowej jest oporność guza na wiele terapii, w tym terapii fotodynamicznej (PDT) [13,234]. PDT, w porównaniu z tradycyjnymi metodami leczenia nowotworów, zapewnia nieinwazyjność, precyzyjne ukierunkowanie poprzez aktywację światłem fotosensybilizatora jedynie w tkance nowotworowej, a tym samym minimalizuje skutki uboczne. Niestety skuteczność terapeutyczna PDT jest silnie uzależniona od poziomu tlenu w guzie i często jest poważnie ograniczona ze względu na występowanie niedotlenienia w tkance nowotworowej [235]. Co więcej, podczas terapii fotodynamicznej typu II, w której wytwarzany jest tlen singletowy, następuje zużycie tlenu, co skutkuje nasileniem hipoksji [236,237]. W związku z tym obecnie liczne badania koncentrują się nad rozwojem strategii poprawiających efektywność terapii fotodynamicznej w stanach niedotlenienia. Jedną z strategii dotyczącej rozwoju PDT, opiera się na fotosensybilizatorach typu I, które wytwarzają reaktywne formy tlenu (RFT) w procesie przenoszenia elektronów na skutek oddziaływania z biomolekułami, w związku z czym nie jest to proces tak mocno zależny od stężenia tlenu w otoczeniu [238]. RFT generowane w reakcjach typu I mogą być aktywne wobec celów biologicznych innych niż $^1\text{O}_2$ ze względu na ich różne właściwości chemiczne. W związku z tym fotosensybilizatory podwójnego typu I/II mogą mieć ogromny potencjał, aby przezwyciężyć ograniczenia niedotlenienia guza w PDT, a jednocześnie efektywnie działać w tkance dobrze utlenionej.

W tej części badań skupiono się na badaniu wpływu niedotlenienia na efektywność działania polipirydylowych kompleksów Ru(II) typu $[\text{Ru}(\text{dip})_2\text{L}]\text{Cl}_2$ w skojarzonej chemioterapii i terapii fotodynamicznej. Kompleksy $[\text{Ru}(\text{dip})_2\text{L}]\text{Cl}_2$ zawierają dwa ligandy 4,7-difenylo-1,10-fenantroliny (dip) oraz trzeci ligand 2,3-bis(2-pirydylo)chinoksalinę (dpq) (**Ru4**) lub jej pochodne : 6,7-dimetylo-2,3-bis(2-pirydylo)chinoksalinę (Me_2dpq) (**Ru5**) oraz 2,3-bis(2-pirydylo)benzo[g]chinoksalinę (dpb) (**Ru6**) (**Rysunek 4.5.1**).



Rysunek 4.5.1 Wzory strukturalne badanych kompleksów Ru(II) typu $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{L})]^{2+}$ gdzie ($\text{L} = \text{dpq}$ – **Ru4**, Me_2dpq – **Ru5**, dpb – **Ru6**).

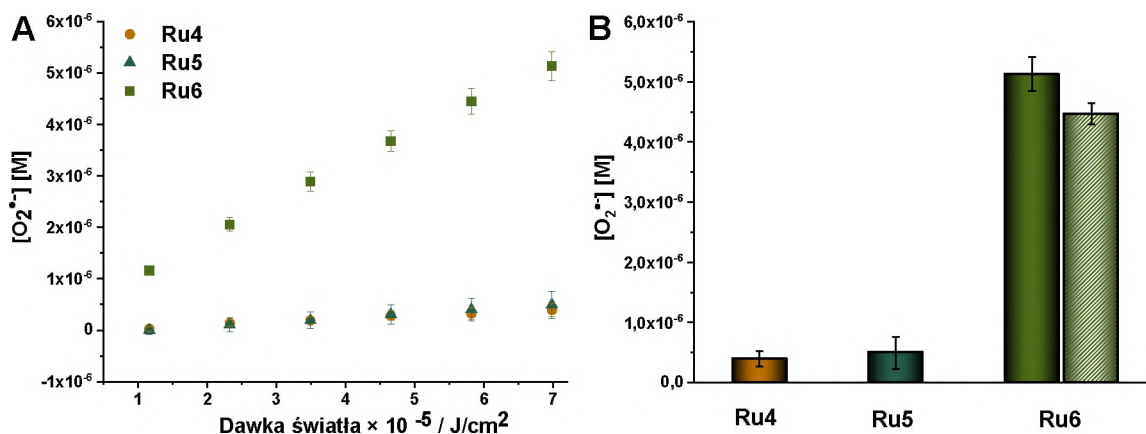
W celu porównania efektywności działania związków względem warunków normoksji odniesiono się do wcześniejszych badań fizykochemicznych prowadzonych przez dr Olę Mazuryk, badań biologicznych prowadzonych przez mnie podczas pracy magisterskiej (*Badanie wpływu ligandów polipirydylowych (L) na cytotoksyczność oraz fotocytotoksyczność kompleksów typu $[\text{Ru}(\text{dip})_2\text{L}]^{2+}$ (dip - 4,7-difenylo-1,10-fenantrolina)*, 2018) oraz badań oznaczania generowania $^1\text{O}_2$ i H_2O_2 prowadzonych przez Panią Justynę Łagosz w ramach pracy magisterskiej (*Oznaczanie reaktywnych form tlenu za pomocą znaczników fluorescencyjnych dla fotoaktywnych kompleksów rutenu*, 2018). Jak wykazano we wspomnianych badaniach wprowadzenie do układu ligandów posiadających dodatkowe pierścienie, poskutkowało zwiększeniem liczby zdelokalizowanych elektronów π , i w konsekwencji obniżeniem energii przejścia MLCT oraz przesunięciem pasma absorpcji w kierunku dłuższych długości fal. W środowisku wolnym od komórek badane kompleksy Ru(II) skutecznie generowały RFT po naświetleniu, w szczególności $^1\text{O}_2$, dla którego wyznaczono wydajność kwantową generowania (Φ_Δ) w zakresie 0,4 – 0,6. Co więcej, badane kompleksy po naświetleniu indukowały wytwarzanie H_2O_2 , przy czym najefektywniejszy był **Ru6**, który wytwarzał ponad 100 μM H_2O_2 z 1 μM kompleksu po naświetleniu dawką ok. 7×10^{-5} J/cm². Warto zwrócić uwagę, że wytwarzanie wody utlenionej w warunkach beztlenowych nie zostało całkowicie zahamowane, a więc pomimo obniżenia o połowę wydajności generowania H_2O_2 badane kompleksy wykazują duży potencjał do przewyciężania ograniczeń niedotlenienia tkanki w PDT. Badania *in vitro* wykazały, że wszystkie związki były umiarkowanie cytotoksyczne, podczas gdy naświetlenie światłem widzialnym znacznie zwiększyło ich aktywność antyproliferacyjną. **Ru4** wykazywał najsilniejsze właściwości fototocytotoksyczne (wskaźnik fototoksyczności, PI > 30).

Fotocytotoksyczność badanych związków wynikała z ich wydajnego generowania RFT, głównie H_2O_2 i $^1\text{O}_2$, potwierdzając zarówno mechanizm działania fotosensybilizatorów typu I, jak i typu II.

W związku z obiecującymi wynikami świadczącymi, że kompleksy Ru(II) mogą wykazywać wiele ścieżek fotoreaktywności, w pracy doktorskiej zajęłam się określeniem poziomu generowania w roztworze pozostałych reaktywnych form tlenu wytwarzanych podczas reakcji fotosensybilizowanego utlenienia typu I, tj. $\text{O}_2^{\cdot-}$ oraz $\cdot\text{OH}$. Dodatkowo zbadalam potencjał kompleksów Ru(II) jako fotosensybilizatorów w warunkach hipoksji oraz w terapii łączonej z chemioterapią jako alternatywna strategia przewycięzania ograniczeń PDT. Mając na uwadze możliwy potencjał antymetastatyczny kompleksów Ru zostały przeprowadzone wstępne badania wpływu kompleksów na właściwości adhezyjne komórek nowotworowych.

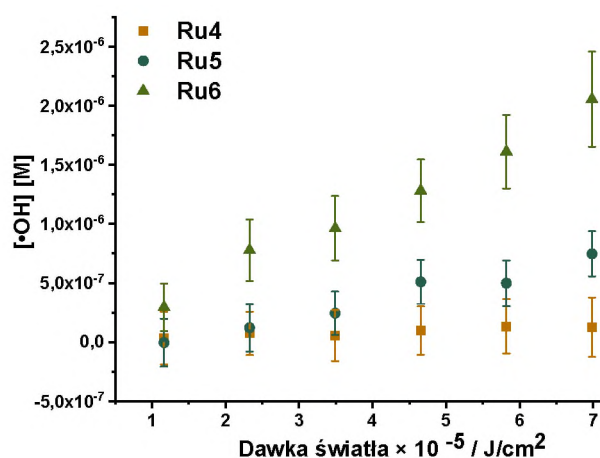
4.5.1 Generowanie anionorodnika ponadtlenkowego oraz rodnika hydroksylowego w roztworze

Zarysowany we wstępie potencjał kompleksów Ru(II) do generowania RFT w reakcji typu I skłonił do zbadania poziomu generowania anionorodnika ponadtlenkowego w roztworze. Niefluorescencyjna sonda hydroetydyna (HE) została wykorzystana do oceny poziomu generowania anionorodnika ponadtlenkowego w roztworze. Ilościową fotogenerację $O_2^{\bullet-}$ oceniono za pomocą układu ksantyna/oksydoreduktaza ksantynowa w połączeniu z cytochromem C. Jak pokazano na **Rysunku 4.5.2**, jedynie **Ru6** był zdolny do generowania $O_2^{\bullet-}$ po naświetleniu, a poziom wytworzonego rodnika był zależny od dawki światła. Aktywacja światłem **Ru6** w dawce wynoszącej $7 \times 10^{-5} \text{ J/cm}^2$ spowodowała powstanie ponad $5 \mu\text{M}$ $O_2^{\bullet-}$ z $1 \mu\text{M}$ kompleksu. Takie stężenie $O_2^{\bullet-}$ potwierdza fotokatalityczne pochodzenie obserwowanego procesu. Znaczny spadek dostępnego tlenu w wyniku przepłukiwania roztworu argonem miał minimalny wpływ na produkcję $O_2^{\bullet-}$ (**Rysunek 4.5.2B**), co wskazuje, że ten rodzaj produkowanych RFT nie jest zależny od stężenia tlenu w otoczeniu i może być wytwarzany w warunkach silnego niedotlenienia bez ograniczenia skuteczności PDT. Wysoka skuteczność generowania $O_2^{\bullet-}$ przez **Ru6** w roztworze dobrze koreluje z wcześniejszymi badaniami, w których wykazano najwyższe wytwarzania 1O_2 oraz H_2O_2 również dla tego związku.



Rysunek 4.5.2 A) Ilość wygenerowanego $O_2^{\bullet-}$ po naświetleniu $1 \mu\text{M}$ **Ru4** (kolor pomarańczowy), **Ru5** (kolor niebieski) oraz **Ru6** (kolor zielony) światłem o długości fali odpowiednio 530, 528 i 570 nm, w zależności od dawki światła obliczone przy użyciu układu ksantyna/oksydoreduktaza ksantynowa w połączeniu cytochromem C, **B)** Ilość wygenerowanego $O_2^{\bullet-}$ po naświetleniu $1 \mu\text{M}$ **Ru4** (kolor pomarańczowy), **Ru5** (kolor niebieski) oraz **Ru6** (kolor zielony) dawką światła $7 \times 10^{-5} \text{ J/cm}^2$ o długości fali odpowiednio 530, 528 i 570 nm w warunkach tlenowych (21% O_2) (pełne słupki) lub beztlenowych (kreskowane słupki); moc lampy 38 nW/cm^2 .

Generowanie rodników hydroksylowych oznaczono przy użyciu aminofenylfluoresceiny (APF). APF to niefluorescencyjny związek, który pod wpływem wybranych RFT, zostaje przekształcony do wysoce fluorescencyjnej fluoresceiny. Sonda jest szczególnie czuła na rodnika $\cdot\text{OH}$, dlatego wykorzystuje się ją do określenia jego poziomu. Należy zaznaczyć, że wykorzystywana sonda nie jest w pełni selektywna, gdyż ulega reakcji również w obecności nadtlenoazotynu oraz anionu podchlorynowego. Otrzymane wyniki przedstawione na **Rysunku 4.5.3**, wykazały, że kompleksy Ru(II) produkują minimalne ilości rodnika hydroksylowego, które można zaniedbać w całej puli produkowanych RFT. Nieznaczne ilości $\cdot\text{OH}$ zostały oznaczone jedynie dla **Ru6**.



Rysunek 4.5.3 Ilość wygenerowanego $\cdot\text{OH}$ po naświetleniu $1\mu\text{M}$ **Ru4** (kolor pomarańczowy), **Ru5** (kolor niebieski) oraz **Ru6** (kolor zielony) światłem o długości fali odpowiednio 530, 528 i 570 nm, w zależności od dawki światła w warunkach tlenowych (21% O_2); moc lampy 38 nW/cm^2 .

4.5.2 Cytotoksyczność oraz fotocytotoksyczność w warunkach hipoksji

Z przeprowadzonych badań nad kompleksami Ru(II) wynika, iż badane kompleksy Ru(II) posiadają potencjał jako fotosensybilizatory zarówno typu I jak i typu II. Ta podwójna aktywność może lepiej dostosować się do warunków niedoboru tlenu występujących w wielu guzach litych. W dotychczasowych badaniach dotyczących PDT zbyt mało uwagi poświęca się na ocenę skuteczności związków w warunkach silnego niedotlenienia. W związku z tym zbadano aktywność kompleksów w warunkach hipoksji i porównano z toksycznością w warunkach normoksji (dane otrzymane w ramach pracy magisterskiej). Cytotoksyczność oraz fotocytotoksyczność określono dla dwóch linii komórkowych CT-26 oraz PANC-1, które charakteryzują się dobrze udokumentowanym potencjałem inwazyjnym [239,240]. Badania w warunkach hipoksji wykazały około 2-3-krotny spadek aktywności cytotoksycznej wszystkich badanych kompleksów Ru(II)

w porównaniu do warunków normoksji. Wskazuje to na występowanie mechanizmów oporności niedotlenionych komórek nowotworowych na testowane związki. Pomimo obniżenia toksyczności kompleksów wartości IC_{50} przy obniżonym stężeniu tlenu nadal były niskie i mieściły się w zakresie od 2 do 18 μM (Tabela 4.5.1), co wskazuje, że związki zachowywały znaczną aktywność cytotoksyczną w warunkach niedotlenienia.

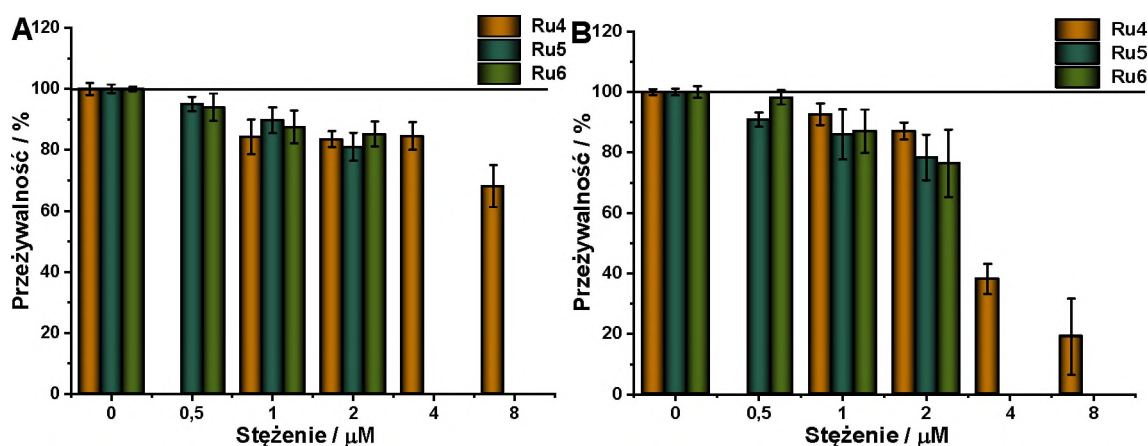
Tabela 4.5.1 Cytotoksyczność (IC_{50}), fotocytotoksyczność (IC_{50}^{hv}) oraz indeks fotodynamiczny (PI) badanych kompleksów Ru(II) względem linii CT26, PANC-1 oraz A559 w warunkach normoksji (21% O_2) i hipoksji (1% O_2). Żywołność komórek linii CT-26 oraz PANC-1 oceniona testem rezazuryny, natomiast komórek linii A549 testem MTT.

CT-26					
	$IC_{50}^{normoksja} [\mu\text{M}]$	$IC_{50}^{hv, normoksja} [\mu\text{M}]$	PI	$IC_{50}^{hipoksja} [\mu\text{M}]$	$IC_{50}^{hv, hipoksja} [\mu\text{M}]$
Ru4	34,6 ± 6,2	1,1 ± 0,2	30,6	12,8 ± 0,4	> 8
Ru5	7,4 ± 0,9	2,2 ± 0,2	3,4	9,2 ± 0,3	> 8
Ru6	4,3 ± 0,2	1,1 ± 0,2	4,0	5,3 ± 0,3	> 8
PANC-1					
	$IC_{50}^{normoksja} [\mu\text{M}]$	$IC_{50}^{hv, normoksja} [\mu\text{M}]$	PI	$IC_{50}^{hipoksja} [\mu\text{M}]$	$IC_{50}^{hv, hipoksja} [\mu\text{M}]$
Ru4	7,3 ± 1,0	0,2 ± 0,1	36,5	17,7 ± 2,1	3,5 ± 0,2
Ru5	2,9 ± 0,4	1,8 ± 0,1	1,6	9,9 ± 1,0	> 8
Ru6	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1	2,0	2,6 ± 0,5	> 8
A549					
	$IC_{50}^{normoksja} [\mu\text{M}]$	$IC_{50}^{hv, normoksja} [\mu\text{M}]$	PI	$IC_{50}^{hipoksja} [\mu\text{M}]$	$IC_{50}^{hv, hipoksja} [\mu\text{M}]$
Ru4	8,1 ± 0,7	-	-	-	-
Ru5	8,3 ± 0,5	-	-	-	-
Ru6	12,0 ± 1,5	-	-	-	-

$IC_{50}^{normoksja/hipoksja}$ – oznaczano po 24 h inkubacji komórek z kompleksami Ru(II) bez naświetlania w normoksji (21% O_2) lub w hipoksji (1% O_2); $IC_{50}^{hv, normoksji/hipoksja}$ – oznaczano po naświetlaniu komórek światłem niebieskim (465 nm) w dawce 20 J/cm^2 po wstępnej inkubacji z kompleksami Ru(II) przez 24 godziny w normoksji (21% O_2) lub w hipoksji (1% O_2); $PI = IC_{50}/IC_{50}^{hv}$.

W warunkach normoksji naświetlenie komórek inkubowanych z kompleksami znacznie zwiększyło ich aktywność antyproliferacyjną. Stwierdzono, że **Ru4** jest najsilniejszym związkiem fototoksycznym, który powodował ponad 30-krotny wzrost toksyczności po naświetleniu światłem niebieskim (465 nm) w dawce 20 J/cm^2 . Aktywność fotodynamiczna w warunkach niedotlenienia ujawniła znaczne zmiany obserwowanych efektów. **Ru5** i **Ru6** straciły całkowicie swoją aktywność fotocytotoksyczną w warunkach hipoksji. **Ru4** zachował pewną aktywność fotodynamiczną, szczególnie przeciwko linii komórkowej PANC-1 (Rysunek 4.5.4), dla której indeks fotodynamiczny (PI) dla **Ru4** wyniósł 5. Efekt ten był jednak znacznie mniejszy niż w warunkach normoksji po naświetleniu. Zaobserwowane ograniczenie aktywacji fotosensybilizatorów w niedotlenionej tkance, może być jednak rozwiązane dosyć wysoką cytotoksycznością związków w ciemności.

W związku z tym badane fotosensybilizatory w tkance nowotworowej dobrze utlenionej mogą ulegać aktywacji, natomiast w niedotlenionej mogą działać jak klasyczne cytostatyki. Takie łączenie PDT z chemioterapią jest również jedną ze znanych strategii pokonywania ograniczeń terapii fotodynamicznej [241]. Z przytoczonych danych wynika, że badane polipirydyłowe kompleksy Ru(II), które charakteryzują się umiarkowaną aktywnością cytotoksyczną i wysoką wydajnością fotogeneracji RFT, mogą służyć jako dobrzy kandydaci do skojarzonej chemoterapii i terapii fotodynamicznej i tym samym mogą pomóc w przezwycięzeniu ograniczeń obecnie dostępnych terapii, takich jak występowanie stanu niedotlenienia czy problemy z nieefektywną aktywacją fotosensybilizatora.

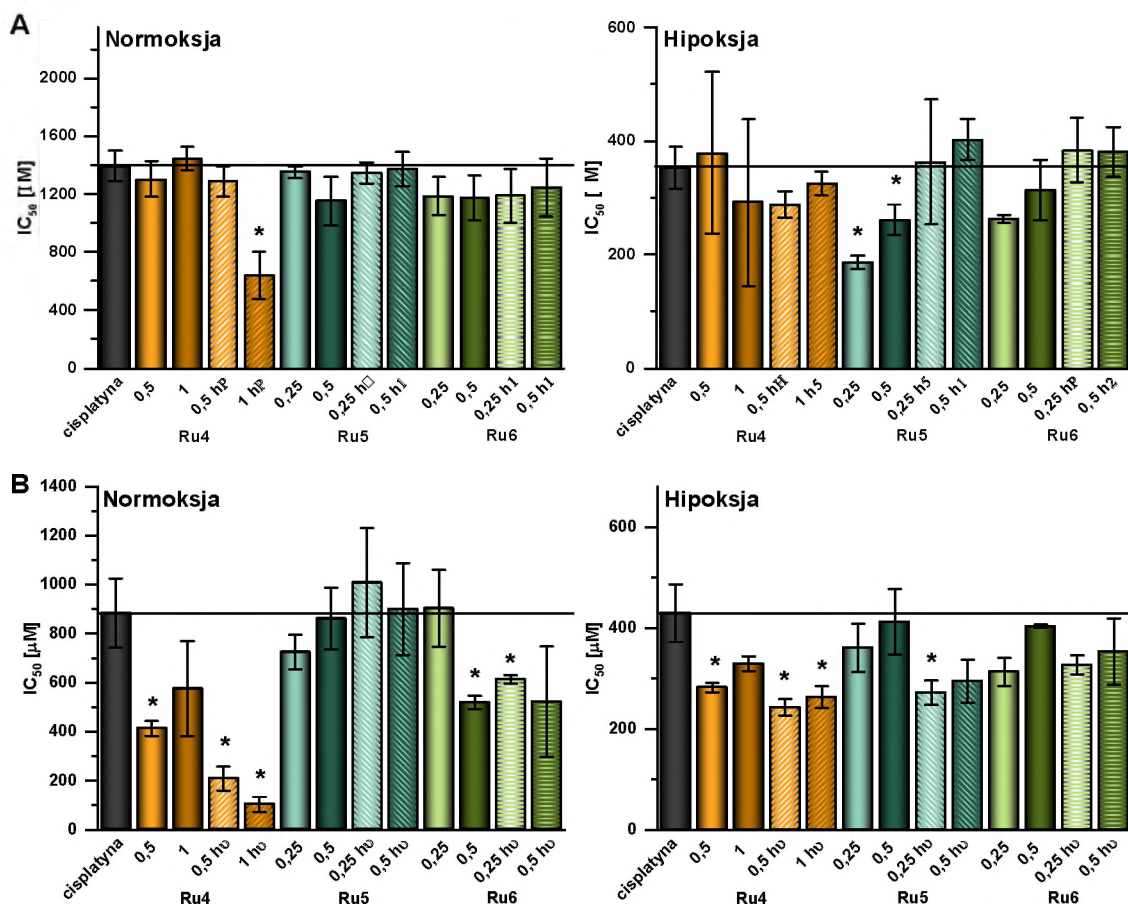


Rysunek 4.5.4 Przeżywalność komórek linii komórkowej CT-26 (A) oraz PANC-1 (B) inkubowanych 24 godziny z kompleksami Ru(II) w warunkach hipoksji, a następnie naświetlanych światłem niebieskim (465 nm) o dawce 20 J/cm².

4.5.3 Wpływ kompleksów Ru(II) na cytotoksyczność cisplatyny

PDT w ostatnich czasach zyskuje coraz większe uznanie jako potencjalny środek wspomagający konwencjonalne metody leczenia nowotworów. Niektóre badania kliniczne oraz przedkliniczne sugerują, że stosowanie fotosensybilizatorów PDT w połączeniu z dobrze znanymi chemioterapeutykami (np. cisplatyną, doksorubicyną i mitomycyną C) mogą być bardziej efektywne niż indywidualne terapie [242]. W związku z tym, określono potencjalne działanie synergistyczne badanych kompleksów Ru(II) w terapii skojarzonej z klasyczną chemioterapią wykorzystującą cisplatynę. Komórki nowotworowe hodowane w normoksji lub hipoksji w pierwszej kolejności inkubowano 24 godziny z nietoksycznymi stężeniami Ru(II), a następnie część naświetlono światłem niebieskim (465 nm) o dawce 10 J/cm².

W kolejnym etapie wszystkie komórki inkubowano z różnymi stężeniami cisplatyny. Cytotoksyczność oceniono po 24 godzinach wykonując test przeżywalności resazury. Jak wynika z danych przedstawionych na **Rysunku 4.5.5**, zastosowanie Ru(II) w nietoksycznych dawkach przed traktowaniem komórek cisplatyną uwrażliwiło komórki na toksyczność cisplatyny, zasadniczo obniżając początkową wartość IC_{50} .



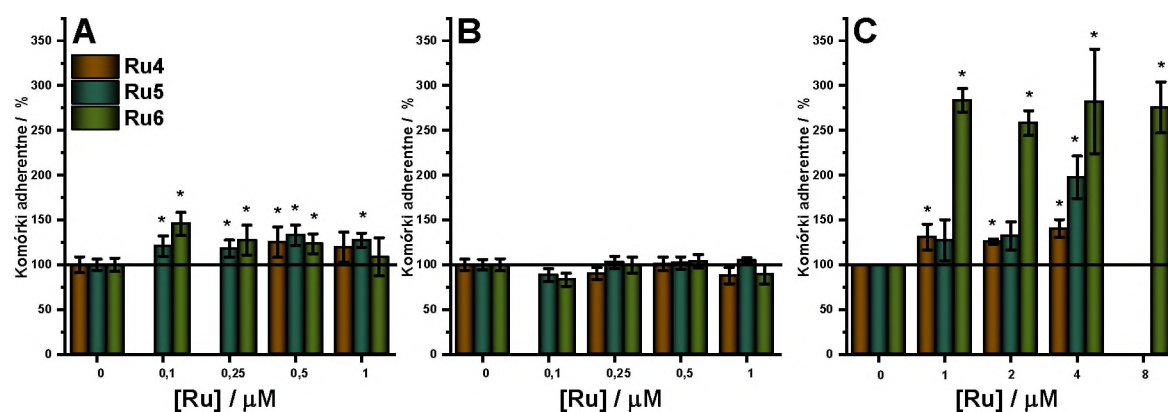
Rysunek 4.5.5 Synergistyczny efekt badanych kompleksów Ru(II) w połączeniu z cisplatyną oceniany na komórkach CT-26 (A) i PANC-1 (B). Komórki wstępnie inkubowano z nietoksycznym stężeniem kompleksów Ru(II) (0,25, 0,5 lub 1 μ M) przez 24 godziny w warunkach normoksji lub hipoksji, a następnie przemyto buforem DPBS. Część z nich naświetlono (hv- słupki kreskowane) światłem niebieskim (465 nm) o dawce 10 J/cm^2 , a następnie wszystkie inkubowano przez następną 24 h z cisplatyną. Żywotność komórek oceniona testem resazury.

Znaczny efekt zaobserwowano dla linii PANC-1, dla której **Ru4** oraz **Ru6** obniżał IC_{50} cisplatyny o ponad 50% przy bardzo niskich dawkach bez naświetlania. Synergistyczne działanie zostało dodatkowo zwiększone po naświetleniu komórek traktowanych Ru(II) przed dodaniem cisplatyny. Wówczas **Ru4** obniżył IC_{50} cisplatyny wobec komórek PANC-1 ponad 4-krotnie, natomiast **Ru6** stał się efektywny przy niższych stężeniach. Dla **Ru5** nie zaobserwowano znaczącego, pozytywnego wpływu na toksyczność cisplatyny nawet po naświetleniu. Linia CT-26 wykazywała mniejszą wrażliwość na terapię łączoną.

Sama cisplatyna w tym przypadku była znacznie mniej toksyczna, niż wobec komórek PANC-1, a połączenie z kompleksami Ru(II) spowodowało wzrost efektywności terapii jedynie dla kompleksu **Ru4** po naświetleniu. Warunki hipoksji spowodowały wzrost toksyczności cisplatyny do IC₅₀ ok. 400 μM dla obu linii komórkowych. W tych warunkach działanie Ru(II) zostało nieznacznie zahamowane, jednak efekt był nadal widoczny. Dla linii PANC-1 zaobserwowano wzrost aktywności antyproliferacyjnej **Ru5** po naświetleniu, który nie był efektywny w warunkach normoksji. Otrzymane wyniki dobrze korelują z fototoksycznością kompleksów w terapii podstawowej. **Ru4** charakteryzujący się najwyższą fototoksycznością, również w terapii łączonej wykazywał najlepsze działanie.

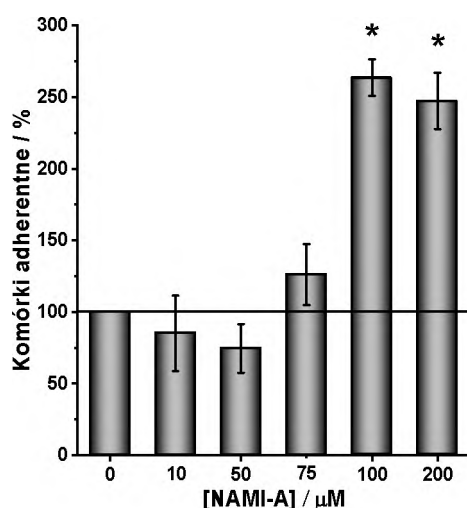
4.5.4 Zmiana właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych

Odnosząc się do danych z rozdziału wcześniejszego, które ukazały silne właściwości antymetastatyczne kompleksów Ru(II) typu [Ru(dip)₂L]Cl₂, zbadano również wpływ tych kompleksów na właściwości adhezyjne komórek nowotworowych. Oprócz analizowanych w tym rozdziale linii komórkowych CT-26 oraz PANC-1 badania przeprowadzono dodatkowo na linii komórkowej ludzkiego gruczolakoraka płuca A549, dla której opisano już wcześniej w literaturze wpływ kompleksów Ru(II) o podobnej strukturze na właściwości adhezyjne [223].



Rysunek 4.5.6 Ilość komórek linii CT-26 (A), PANC-1 (B) oraz A549 (C) przylegających do powierzchni płytki przedstawiona jako procent komórek pozostałych po kontrolowanym traktowaniu trypsyną. Komórki inkubowane 24 h z kompleksami Ru(II) w warunkach normoksji. Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę (100%). * $p < 0,05$.

Jak pokazano na **Rysunku 4.5.6**, kompleksy Ru(II) mają znikomy wpływ na zmianę adhezji komórek linii CT-26 oraz PANC-1. Natomiast dla linii A549, kompleksy Ru(II) znacząco zmniejszyły poziom odklejania komórek nowotworowych od podłoża. Najwyższy wzrost przylegania komórek, nawet do 300% w stosunku do kontroli, zaobserwowano dla kompleksu **Ru6**, podczas gdy **Ru4** oraz **Ru5** w niskich stężeniach miały niewielki wpływ na adhezję komórek. Zastosowanie wyższych stężeń kompleksów **Ru4** i **Ru5** pozwoliło zaobserwować znaczącą poprawę właściwości adhezyjnych. Widoczny efekt dla **Ru4** nie był zależny od stężenia i został już wykryty dla tak niskiego stężenia związku jak 1 μM , co jest dalekie od IC_{50} (**Tabela 4.5.1**). Traktowanie komórek A549, NAMI-A (**Rysunek 4.5.7**) spowodowało również znaczny wzrost siły adhezji komórek, do ok. 250% w porównaniu z kontrolą, ale zaobserwowano to przy znacznie wyższym stężeniu 100 μM (stężenie wciąż nietoksyczne). Podobny efekt NAMI-A odnotowano już dla komórek czerniaka B16F10, których potraktowanie 100 μM związku spowodowało znaczny wzrost siły adhezji, nawet do 162% w porównaniu z kontrolą [158].



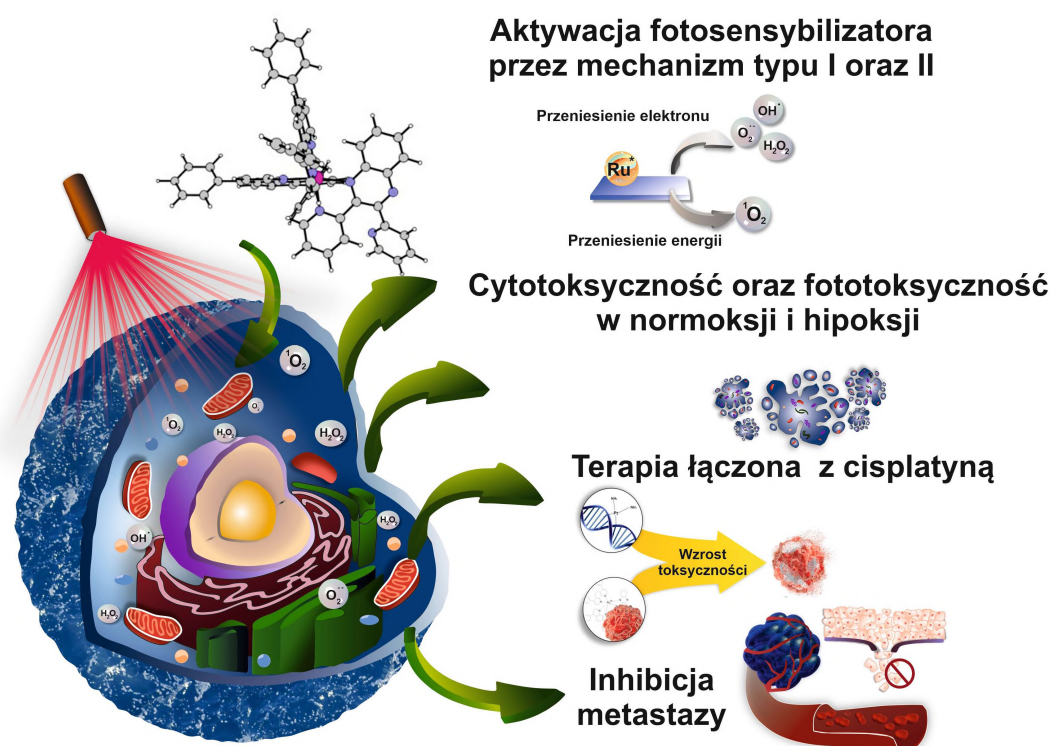
Rysunek 4.5.7 Ilość komórek linii A549 przylegających do powierzchni płytki przedstawiona jako procent komórek pozostałych po kontrolowanym traktowaniu trypsyną. Komórki inkubowane 24 h kompleksem NAMI-A w warunkach normoksji. Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę (100%). * $p < 0,05$.

4.5.5 Podsumowanie

Podsumowując, w badaniach przedstawionych w tym rozdziale szukano odpowiedzi na postawione problemy badawcze dotyczące wykorzystania polipirydylowych kompleksów Ru(II) jako nowoczesne fotosensybilizatorów typu I oraz II, które mogłyby przeciwdziałać ograniczeniom terapii PDT dotyczącym niedotlenienia tkanki nowotworowej. W środowisku pozakomórkowych, oprócz zbadanego wcześniej wytwarzania H_2O_2 i $^1\text{O}_2$ przez kompleksy Ru(II) pod wpływem naświetlenia, oceniono również generowanie $\text{O}_2^{\cdot-}$ oraz $\cdot\text{OH}$. Wyniki wykazały, że jedynie **Ru6** zdolny był do fotogenerowania znacznej ilości $\text{O}_2^{\cdot-}$ oraz niewielkiej ilości $\cdot\text{OH}$. W związku z tym można stwierdzić, że procesy przeniesienia energii były dominujące dla **Ru4** i **Ru5** (tworzenie $^1\text{O}_2$), natomiast przeniesienie elektronów było dominujące w **Ru6** (tworzenie H_2O_2 i $\text{O}_2^{\cdot-}$). Jak wykazały wcześniejsze badania, **Ru4** został określony jako najsilniejszy fotosensybilizator, charakteryzujący się indeksem fototoksycznym ponad 30. Z badań fotodynamicznych przeprowadzonych w hipoksji wynika, że tylko **Ru4** zachował część swojej pierwotnej aktywności fotocytotoksycznej. Jednak wszystkie badane kompleksy Ru(II) zachowały swoją znaczącą aktywność cytotoksyczną w warunkach obniżonego stężenia O_2 , co wskazuje, że mechanizmy oporności związane z hipoksją nie zmodyfikowały w istotny sposób aktywności kompleksów Ru(II). Połączenie aktywności cytotoksycznej w warunkach hipoksji z naświetlaniem może pomóc w przezwycięzeniu słabych wyników terapii nowotworowej spowodowanych obniżonym stężeniem O_2 w guzie lub nieskuteczną aktywacją fotosensybilizatora. Dodatkowo rozpatrywano synergistyczne działanie kompleksów Ru(II) i cisplatyny, w którym wykazano, że badane związki mocno uwrażliwiały komórki nowotworowe na cisplatynę, obniżając jej IC_{50} . Pozytywny wpływ Ru(II) w terapii łączonej nie był znacząco hamowany w warunkach hipoksji, co daje szansę na wykorzystanie tych związków w różnych terapiach skojarzonych, nawet w przypadku występowania obszarów tkanki silnie niedotlenionej (**Rysunek 4.5.8**).

Biorąc pod uwagę fakt, iż badane kompleksy posiadają podobną strukturę, jak przedstawione w poprzednim rozdziale kompleksy Ru(II) badane pod kątem terapii przeciwnowotworowej, dla tej grupy kompleksów wstępnie zbadano potencjał do zmiany właściwości adhezyjnych komórek. Związki nie wpływały znacząco na linię CT-26 oraz PANC-1, natomiast silnie zmieniały adhezję komórek A459. Największe wzmocnienie właściwości adhezyjnych zaobserwowano dla komórek traktowanych **Ru6**, oraz stwierdzono, iż jego potencjał jest równie wysoki, jak znanego związku

antymetastatycznego, NAMI-A. Z zebranych w toku badań wyników wynika, że polipirydylowe kompleksy Ru(II) z pochodną chinoksaliny mogą być interesującymi kandydatami jako fotosensybilizatory zarówno typu I jak i II. Dodatkowo szeroki wachlarz działań w szczególności potencjał antymetastatyczny oraz synergistyczne działanie w połączeniu z chemioterapią daje duże możliwości wykorzystania ich w różnych protokołach leczenia przeciwnowotworowego.



Rysunek 4.5.8 Schematyczne przedstawienie wpływu polipirydylowych kompleksów Ru(II) aktywowanych światłem na komórki nowotworowe.

Przedstawione w tym rozdziale badania weszły w skład dwóch publikacji:

- 1) P. Gajda-Morszewski, I. Gurgul, **E. Janczy-Cempa**, O. Mazuryk, M. Łomzik, M. Brindell, "Inhibition of matrix metalloproteinases and cancer cell detachment by Ru(II) polypyridyl complexes containing 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ligands - new candidates for antimetastatic agents" *Pharmaceuticals* **2021**, 14, 1014. doi.org/10.3390/ph14101014
- 2) O. Mazuryk, **E. Janczy-Cempa**, J. Łagosz, D. Rutkowska-Zbik, A. Machnicka, A. Krasowska, P. Pietrzyk, G. Stochel, M. Brindell "Relevance of the electron transfer pathway in photodynamic activity of Ru(II) polypyridyl complexes containing 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ligands under normoxic and hypoxic conditions" *Dalton Trans.* **2022**, 51 1888–1900 doi: 10.1039/d1dt02908h

5 Podsumowanie

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej była charakterystyka serii sensorów optycznych pod kątem ich wykorzystania do oceny stężenia tlenu w tkankach nowotworowych oraz wpływ hipoksji na efektywność działania polipirydylowych kompleksów Ru(II) w terapii przeciwrzutowej i fotodynamicznej. Biorąc pod uwagę aspekty poznawcze, praca doktorska doprowadziła do odkrycia obiecujących właściwości nowej klasy sond fluorescencyjnych opartych na rusztowaniu pirazyno-1,3a,6a-triazapentalenowym w kontekście ich wykorzystania do nieinwazyjnego obrazowania optycznego hipoksycznej tkanki nowotworowej, charakteryzującej się nadekspresją oksydoreduktaz. Wykazano doskonałe właściwości fotochemiczne sond oraz selektywną redukcję jedynie przez nitroreduktazy, co umożliwiło jednoznaczne rozróżnienie komórek hodowanych w warunkach hipoksji od komórek hodowanych w warunkach normoksji oraz korelację poziomu fluorescencji sondy z poziomem ekspresji nitroreduktazy w komórkach w tych warunkach.

Szczególną uwagę poświęcono poprawie selektywnego dostarczania znacznika względem tkanki nowotworowej, którą osiągnięto dzięki sprzężeniu sondy z holo-transferyną oraz wykorzystaniu nadekspresji receptora transferyny w komórkach nowotworowych. Zaproponowana i zoptymalizowana metoda biokoniugacji Tf z sondą umożliwiła otrzymanie biokoniugatu, który dzięki połączeniu 8 cząsteczek pochodnej pirazyno-1,3a,6a-triazapentalenu do białka wykazywał wysoką czułość względem komórek nowotworowych oraz wzmocnienie sygnału fluorescencyjnego w komórkach niedotlenionych dzięki ugrupowaniu nitrowemu redukowanemu przez nitroreduktazy. Badania akumulacji biokoniugatu w komórkach wykazały, że jego wchłanianie jest całkowicie zależne od aktywności receptora transferyny (TfR), co potwierdza jego możliwości aplikacyjne jako podwójnego barwnika dla komórek nowotworowych charakteryzujących się zwiększonym poziomem TfR oraz markera komórek niedotlenionych o zwiększonej ekspresji oksydoreduktaz.

Pomimo powszechnej opinii, iż hipoksja powoduje nadekspresję nitroreduktaz, w literaturze do tej pory istniało niewiele danych badawczych dotyczących ekspresji oksydoreduktaz zaangażowanych w redukcję związków zawierających ugrupowanie nitroaromatyczne w zależności od poziomu tlenu w tkankach. W związku z tym kolejną część badań skupiła się na ocenie wpływu hipoksji na poziom ekspresji oksydoreduktaz zaangażowanych w aktywację związków nitroaromatycznych dla różnych nowotworowych

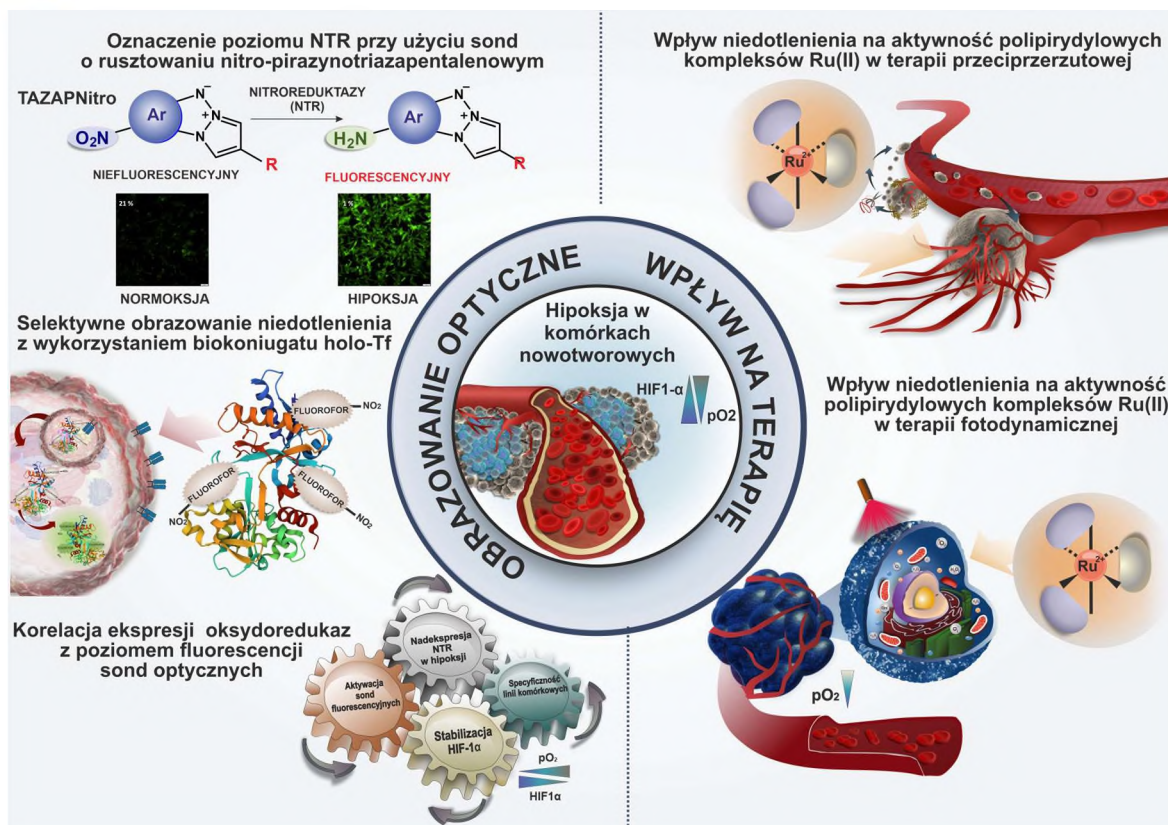
linii komórkowych oraz korelacji ekspresji tych białek z aktywacją sond nitropirazynotriazapentalenowych. Wykazano, że ekspresja enzymów oksydoredukcyjnych w warunkach niedotlenienia jest silnie zależna od linii nowotworowej. W związku z czym konieczna jest weryfikacja poziomu ekspresji oksydoreduktaz dla danego typu nowotworu, co pozwoli na odpowiednią selekcję pacjentów przed podjęciem decyzji o sposobie ich leczenia. Przeprowadzone badania udowodniły, że ekspresja oksydoreduktaz jest silnie powiązana z aktywacją HIF-1 α oraz wpływa na efektywność redukcji badanych sond. Spośród badanych linii komórkowych najwyższy potencjał do selektywnej redukcji sondy w warunkach hipoksji wykazywały linie A2058 oraz A549, co dobrze koreluje ze zwiększonym poziomem ekspresji oksydoreduktaz w tych komórkach, szczególnie oksydoreduktaz jednoelektronowych. Wyniki tych badań mogą mieć duże znaczenie kliniczne, stwarzając nowe możliwości wykorzystania sond pirazynotriazapentalenowych do badań przesiewowych przed zastosowaniem HAPs, w celu selekcji pacjentów z nowotworami charakteryzującymi się niedotlenieniem oraz obecnością wysokich poziomów oksydoreduktaz. Eksperymenty *in vitro* przeprowadzone w ramach niniejszej pracy potwierdzają wysoki potencjał badanych sond do optycznej identyfikacji niedotlenionej tkanki, w tym do oceny zawartości tlenu w jej obrębie. Należy jednak pamiętać, iż badania *in vitro* posiadają wiele ograniczeń w stosunku do eksperymentów *in vivo*, niemniej jednak, uzyskane satysfakcjonujące wyniki czynią badaną grupę sond triazapentalenowych interesującymi kandydatami do wykorzystania ich jako sond w badaniach biologii molekularnej w bardziej zaawansowanych modelach *in vitro*, takich jak trójwymiarowe hodowle sferoidalne, czy też w badaniach *in vivo* na modelach zwierzęcych.

Dalsza część badań dotyczyła wykorzystania polipirydylowych kompleksów Ru(II) w terapii przeciwprzerzutowej w tkankach hipoksycznych. Stan hipoksji aktywuje proces metastazy oraz jest często przyczyną występowania oporności na różnego rodzaju terapie antynowotworowe. W prezentowanej pracy wykazano istotny wpływ badanych kompleksów Ru(II) na wiele etapów kaskady przerzutowania. Udowodniono, że badane kompleksy działają jednocześnie na właściwości adhezyjne komórek, uniemożliwiając ich oderwanie, natomiast po oderwaniu hamują ponowną adhezję. Ponadto, zaobserwowano, że komórki nowotworowe traktowane badanymi kompleksami charakteryzują się zmniejszoną mobilnością, w tym migracją, inwazją i transmigracją. Warunki niedotlenienia, pomimo tworzenia bardziej agresywnego i opornego na terapię fenotypu komórek, nie zniwelowały całkowicie cytotoksycznego oraz antymetastatycznego działania kompleksów

Ru(II), co stwarza szansę na wykorzystanie ich również w terapii nowotworów o zidentyfikowanych obszarach silnego niedotlenienia. Zaprezentowana mnogość celów terapeutycznych w kaskadzie metastazy i wywoływanych efektów połączona ze skutecznym działaniem w warunkach niedotlenienia wskazuje, że badane związki Ru(II) mogą stwarzać nowe możliwości badań w kierunku skutecznej terapii przeciwprzerzutowej.

W kolejnej części zbadano wpływ niedotlenienia na efektywność działania polipirydylowych kompleksów Ru(II) w skojarzonej chemioterapii i terapii fotodynamicznej. Potwierdzono, że badane kompleksy mogą działać jako fotosensybilizatory typu I oraz II, co umożliwiłoby przeciwdziałanie niskiej skuteczności terapii PDT w niedotlenionej tkance nowotworowej. W warunkach niedotlenienia kompleksy zachowały swoją aktywność cytotoksyczną, natomiast ich aktywność fotocytotoksyczna uległa znaczącemu pogorszeniu. Niemniej jednak, wykorzystanie aktywności cytotoksycznej w warunkach niedotlenienia wraz z naświetlaniem może pomóc w przezwycięzeniu słabych wyników terapii nowotworowej spowodowanych obniżonym stężeniem O_2 w guzie lub nieskuteczną aktywacją fotosensybilizatora. Co więcej, wszechstronne działanie kompleksów Ru(II), w szczególności ich właściwości antymetastatyczne oraz synergistyczne działanie w połączeniu z chemioterapią daje duże możliwości aplikacyjne w różnych typach terapii skojarzonej, nawet w przypadku występowania tkanki niedotlenionej.

Podsumowując, przedłożona rozprawa doktorska prezentuje zbiór wyników świadczących o dużym potencjale nowej klasy sond fluorescencyjnych do detekcji niedotlenienia w guzach oraz jego korelacji z poziomem ekspresji oksydoreduktaz. Co więcej, pokazano, że hipoksja ma znaczący wpływ na skuteczność terapii przeciwnowotworowych. Niemniej jednak, pomimo niekorzystnego aspektu niedotlenienia, pokazano, iż możliwie jest efektywne wykorzystanie polipirydylowych kompleksów Ru(II) w różnych terapiach przeciwnowotworowych, w tym o działaniu antymetastatycznym i PDT również w takich warunkach, co ilustruje ich duże możliwości aplikacyjne. W celu uzyskania pełniejszego obrazu potencjału kompleksów Ru(II) konieczne jest prowadzenie dalszych badań, w szczególności na bardziej zaawansowanych modelach *in vitro* oraz *in vivo*.



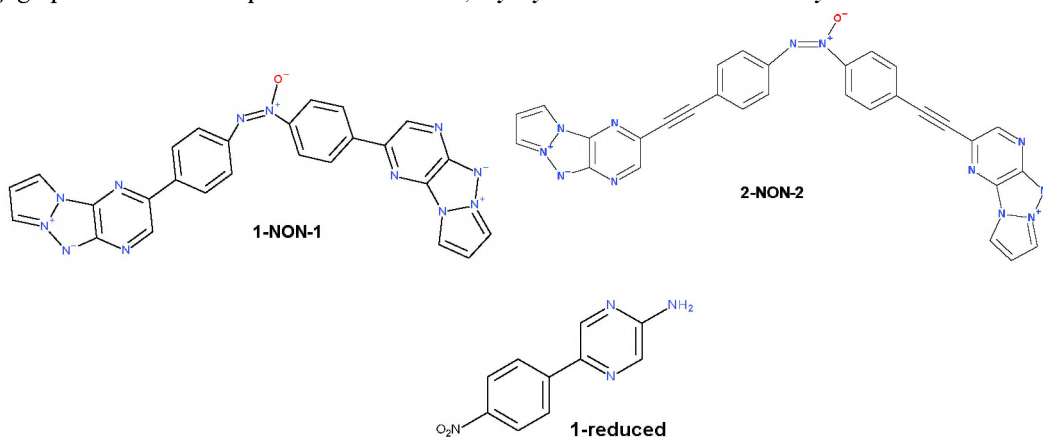
Rysunek 4.5.1 Schemat podsumowujący główne zagadnienia poruszone w pracy.

6 Suplement

Dane MS dla mieszaniny otrzymanej po redukcji sond **1-NO₂** i **2-NO₂** (16 μM) w obecności NADH (160 μM) w oraz NTR (2,4 μg/mL).

Reakcja	Wzór chemiczny	m/z teoretyczna	m/z dośw.	Produkt reakcji
1-NO₂ + NADH + NTR	C ₁₃ H ₈ N ₆ O ₂ +H	281,0781	281,0785	[1-NO ₂ +H] ⁺
	C ₁₃ H ₈ N ₆ O+H	265,0832	265,0832	[1-NO+H] ⁺
	C ₂₆ H ₁₆ N ₁₂ O+H	513,1643	513,1638	[1-NON-1+H] ⁺
	C ₂₆ H ₁₆ N ₁₂ O+2H	257,0858	257,0865	[1-NON-1+2H] ²⁺
	C ₁₃ H ₁₀ N ₆ +H	251,1040	251,1040	[1-NH ₂ +H] ⁺
	C ₁₃ H ₁₀ N ₆ +2H	126,0556	126,0559	[1-NH ₂ +H] ²⁺
	C ₁₃ H ₁₀ N ₆ O+H	267,0992	267,0989	^a [1-NHOH+H] ⁺
	C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₂ +H	217,0468	217,0475	1-zredukowany
2-NO₂ + NADH + NTR	C ₁₅ H ₈ N ₆ O ₂ +H	305,0781	305,0784	[2-NO ₂ +H] ⁺
	C ₁₅ H ₈ N ₆ O+H	289,0832	289,0835	[2-NO+H] ⁺
	C ₃₀ H ₁₆ N ₁₂ O+H	561,1643	561,1635	[2-NON-2+H] ⁺
	C ₃₀ H ₁₆ N ₁₂ O+2H	281,08581	281,0865	[2-NON-2+2H] ²⁺
	C ₁₅ H ₁₀ N ₆ +H	275,1040	275,1039	[2-NH ₂ +H] ⁺
	C ₁₅ H ₁₀ N ₆ +2H	138,0556	138,0557	[2-NH ₂ +2H] ⁺
	C ₁₅ H ₁₀ N ₆ O+H	291,0989	291,0988	^a [2-NHOH+H] ⁺

^aKompleks hydroksyloaminowy nie jest wystarczająco stabilny, dlatego w trakcie analizy następuje jego przekształcenie w pochodne nitrozowe, wykrywane w widmach masowych.



Ustalone struktury dimerów azoksylowych oznaczonych jako **1-NON-1** i **2-NON-2** powstających podczas redukcji sondy odpowiednio **1-NO₂** lub **2-NO₂** w obecności NADH oraz NTR w warunkach tlenowych. Struktury te zostały zasugerowane na podstawie danych HRMS oraz dostępnych danych literaturowych. **1-redukowany** jest wstępną strukturą związku powstającą podczas redukcji cząsteczki **1-NO₂**.

7 Bibliografia

- [1] M.Y. Koh, G. Powis, Passing the baton: the HIF switch, *Trends Biochem Sci.* 37 (2012) 364–372. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2012.06.004>.
 - [2] J.S. Maltzman, V.H. Haase, Low oxygen stimulates the immune system, *Kidney Int.* 73 (2008) 797. <https://doi.org/10.1038/KI.2008.15>.
 - [3] L. Fajersztajn, M.M. Veras, Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming, *Birth Defects Res.* 109 (2017) 1377–1385. <https://doi.org/10.1002/BDR2.1142>.
 - [4] Y. Li, L. Zhao, X.F. Li, Targeting Hypoxia: Hypoxia-Activated Prodrugs in Cancer Therapy, *Front Oncol.* 11 (2021) 2920. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.700407>.
 - [5] V. Petrova, M. Annicchiarico-Petruzzelli, G. Melino, I. Amelio, The hypoxic tumour microenvironment, *Oncogenesis.* 7 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0011-9>.
 - [6] J.C. Walsh, A. Lebedev, E. Aten, K. Madsen, L. Marciano, H.C. Kolb, The Clinical Importance of Assessing Tumor Hypoxia: Relationship of Tumor Hypoxia to Prognosis and Therapeutic Opportunities, *Antioxid Redox Signal.* 21 (2014) 1516–1554. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5378>.
 - [7] C. Bayer, K. Shi, S.T. Astner, C.A. Maftai, P. Vaupel, Acute versus chronic hypoxia: why a simplified classification is simply not enough, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 80 (2011) 965–968. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2011.02.049>.
 - [8] S.R. McKeown, Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response, *Br J Radiol.* 87 (2014). <https://doi.org/10.1259/BJR.20130676>.
 - [9] M. Najafi, B. Farhood, K. Mortezaee, E. Kharazinejad, J. Majidpoor, R. Ahadi, Hypoxia in solid tumors: a key promoter of cancer stem cell (CSC) resistance, *J Cancer Res Clin Oncol.* 146 (2020) 19–31. <https://doi.org/10.1007/S00432-019-03080-1>.
 - [10] A. Challapalli, L. Carroll, E.O. Aboagye, Molecular mechanisms of hypoxia in cancer, *Clin Transl Imaging.* 5 (2017) 225–253. <https://doi.org/10.1007/S40336-017-0231-1>.
 - [11] A. Wouters, B. Pauwels, F. Lardon, J.B. Vermorken, Review: implications of in vitro research on the effect of radiotherapy and chemotherapy under hypoxic conditions, *Oncologist.* 12 (2007) 690–712. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.12-6-690>.
 - [12] P. Vaupel, L. Harrison, Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response, *Oncologist.* 9 Suppl 5 (2004) 4–9. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.9-90005-4>.
 - [13] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, A.K. Azab, The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy, *Hypoxia.* 3 (2015) 83. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.
 - [14] X.F. Li, J.A. O'Donoghue, Hypoxia in microscopic tumors, *Cancer Lett.* 264 (2008) 172–180. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2008.02.037>.
 - [15] P. Vaupel, *Physiological Mechanisms of Treatment Resistance*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74386-6_15.
 - [16] B.J. Moeller, R.A. Richardson, M.W. Dewhirst, Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment, *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 241–248. <https://doi.org/10.1007/S10555-007-9056-0>.
 - [17] E.K. Rofstad, K. Sundfor, H. Lyng, C.G. Tropé, Hypoxia-induced treatment failure in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix is primarily due to hypoxia-induced radiation resistance rather than hypoxia-induced metastasis, *Br J Cancer.* 83 (2000) 354–359. <https://doi.org/10.1054/BJOC.2000.1266>.
 - [18] D.C. Singleton, A. Macann, W.R. Wilson, Therapeutic targeting of the hypoxic tumour microenvironment, *Nature Reviews Clinical Oncology* 2021 18:12. 18 (2021) 751–772. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00539-4>.
 - [19] A.M. Jubb, F.M. Buffa, A.L. Harris, Assessment of tumour hypoxia for prediction of response to therapy and cancer prognosis, *J Cell Mol Med.* 14 (2010) 18–29. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2009.00944.X>.
 - [20] C.J. Koch, S.M. Evans, Optimizing Hypoxia Detection and Treatment Strategies, *Semin Nucl Med.* 45 (2015) 163. <https://doi.org/10.1053/J.SEMNUCLMED.2014.10.004>.
 - [21] G.L. Semenza, Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine, *Cell.* 148 (2012) 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>.
 - [22] A. Zimna, M. Kurpisz, Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies, (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/549412>.
 - [23] G.L. Semenza, G.L. Wang, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol Cell Biol.* 12 (1992) 5447–5454. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.12.5447-5454.1992>.
-

- [24] G.L. Wang, G.L. Semenza, Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia., *Journal of Biological Chemistry*. 268 (1993) 21513–21518. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)80571-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)80571-7).
- [25] G.L. Wang, B.H. Jiang, E.A. Rue, G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension., *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92 (1995) 5510–5514. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.12.5510>.
- [26] P.H. Maxwell, The HIF pathway in cancer, *Semin Cell Dev Biol*. 16 (2005) 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.03.001>.
- [27] M. Ohh, Ubiquitin Pathway in VHL Cancer Syndrome, *Neoplasia*. 8 (2006) 623–629. <https://doi.org/10.1593/NEO.06442>.
- [28] P.S.J. Bailey, J.A. Nathan, Metabolic Regulation of Hypoxia-Inducible Transcription Factors: The Role of Small Molecule Metabolites and Iron, *Biomedicines* 2018, Vol. 6, Page 60. 6 (2018) 60. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES6020060>.
- [29] F. Dayan, N.M. Mazure, M. Christiane Brahimi-Horn, J. Pouyssegur, A Dialogue between the Hypoxia-Inducible Factor and the Tumor Microenvironment, *Cancer Microenvironment*. 1 (2008) 53–68. <https://doi.org/10.1007/s12307-008-0006-3>.
- [30] G.L. Semenza, Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease, *Mechanisms of Disease*. 365 (2011) 537–547. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1011165>.
- [31] G.N. Masoud, W. Li, HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy, *Acta Pharm Sin B*. 5 (2015) 378–389. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2015.05.007>.
- [32] G.P. Elvidge, L. Glenny, R.J. Appelhoff, P.J. Ratcliffe, J. Ragoussis, J.M. Gleadle, Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: The role of HIF-1 α , HIF-2 α , and other pathways, *Journal of Biological Chemistry*. 281 (2006) 15215–15226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511408200>.
- [33] J. Schödel, S. Oikonomopoulos, J. Ragoussis, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, D.R. Mole, High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq, *Blood*. 117 (2011). <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-10-314427>.
- [34] A. Ortiz-Barahona, D. Villar, N. Pescador, J. Amigo, L. del Peso, Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction, *Nucleic Acids Res*. 38 (2010) 2332–2345. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP1205>.
- [35] M.C. Brahimi-Horn, J. Chiche, J. Pouyssegur, Hypoxia and cancer, *J Mol Med*. 85 (2007) 1301–1307. <https://doi.org/10.1007/S00109-007-0281-3>.
- [36] G.L. Semenza, Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics, *Oncogene*. 29 (2010) 625–634. <https://doi.org/10.1038/ONC.2009.441>.
- [37] V. Infantino, A. Santarsiero, P. Convertini, S. Todisco, V. Iacobazzi, Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target, *Int J Mol Sci*. 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/IJMS22115703>.
- [38] V.L. Dengler, M.D. Galbraith, J.M. Espinosa, Transcriptional Regulation by Hypoxia Inducible Factors, *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 49 (2014) 1. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205>.
- [39] A. Loboda, A. Jozkowicz, J. Dulak, HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical, *Mol Cells*. 29 (2010) 435–442. <https://doi.org/10.1007/S10059-010-0067-2>.
- [40] S.L. Yang, C. Wu, Z.F. Xiong, X. Fang, Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review), *Mol Med Rep*. 12 (2015) 2411–2416. <https://doi.org/10.3892/MMR.2015.3689>.
- [41] J.Y. Kim, J.Y. Lee, Targeting Tumor Adaption to Chronic Hypoxia: Implications for Drug Resistance, and How It Can Be Overcome, *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 1854. 18 (2017) 1854. <https://doi.org/10.3390/IJMS18091854>.
- [42] W.W. Wheaton, N.S. Chandel, Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism, *Am J Physiol Cell Physiol*. 300 (2011). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>.
- [43] W.R. Wilson, M.P. Hay, Targeting hypoxia in cancer therapy, *Nature Reviews Cancer* 2011 11:6. 11 (2011) 393–410. <https://doi.org/10.1038/nrc3064>.
- [44] S.A. Fitzsimmons, P. Workman, M. Grever, K. Paull, R. Camalier, A.D. Lewis, Reductase Enzyme Expression Across the National Cancer Institute Tumor Cell Line Panel: Correlation With Sensitivity to Mitomycin C and EO9, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 88 (1996) 259–269. <https://doi.org/10.1093/JNCI/88.5.259>.
- [45] E.E. Kelley, T. Hock, N.K.H. Khoo, G.R. Richardson, K.K. Johnson, P.C. Powell, G.I. Giles, A. Agarwal, J.R. Lancaster, M.M. Tarpey, Moderate hypoxia induces xanthine oxidoreductase activity in arterial endothelial cells, *Free Radic Biol Med*. 40 (2006) 952–959. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2005.11.008>.

- [46] F.W. Hunter, B.G. Wouters, W.R. Wilson, Hypoxia-activated prodrugs: paths forward in the era of personalised medicine, *Br J Cancer*. 114 (2016) 1071–1077. <https://doi.org/10.1038/BJC.2016.79>.
- [47] L. Spiegelberg, R. Houben, R. Niemans, D. de Ruyscher, A. Yaromina, J. Theys, C.P. Guise, J.B. Smaill, A. V. Patterson, P. Lambin, L.J. Dubois, Hypoxia-activated prodrugs and (lack of) clinical progress: The need for hypoxia-based biomarker patient selection in phase III clinical trials, *Clin Transl Radiat Oncol*. 15 (2019) 62–69. <https://doi.org/10.1016/J.CTRO.2019.01.005>.
- [48] I.N. Mistry, M. Thomas, E.D.D. Calder, S.J. Conway, E.M. Hammond, Clinical Advances of Hypoxia-Activated Prodrugs in Combination With Radiation Therapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 98 (2017) 1183–1196. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2017.03.024>.
- [49] L.S. Mortensen, S. Buus, M. Nordmark, L. Bentzen, O.L. Munk, S. Keiding, J. Overgaard, Identifying hypoxia in human tumors: A correlation study between 18F-FMISO PET and the Eppendorf oxygen-sensitive electrode, *Acta Oncol*. 49 (2010) 934–940. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2010.516274>.
- [50] J.S. Rasey, W.J. Koh, M.L. Evans, L.M. Peterson, T.K. Lewellen, M.M. Graham, K.A. Krohn, Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [18F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 36 (1996) 417–428. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(96\)00325-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(96)00325-2).
- [51] D.S. Vikram, J.L. Zweier, P. Kuppusamy, Methods for noninvasive imaging of tissue hypoxia, *Antioxid Redox Signal*. 9 (2007) 1745–1756. <https://doi.org/10.1089/ARS.2007.1717>.
- [52] I. Daimiel, Insights into Hypoxia: Non-invasive Assessment through Imaging Modalities and Its Application in Breast Cancer, *J Breast Cancer*. 22 (2019) 155. <https://doi.org/10.4048/JBC.2019.22.E26>.
- [53] S. Carlin, J.L. Humm, PET of Hypoxia: Current and Future Perspectives, *Journal of Nuclear Medicine*. 53 (2012) 1171–1174. <https://doi.org/10.2967/JNUMED.111.099770>.
- [54] N. Dhani, A. Fyles, D. Hedley, M. Milosevic, The clinical significance of hypoxia in human cancers, *Semin Nucl Med*. 45 (2015) 110–121. <https://doi.org/10.1053/J.SEMNUCLMED.2014.11.002>.
- [55] C.J. Koch, Measurement of absolute oxygen levels in cells and tissues using oxygen sensors and 2-nitroimidazole EF5, *Methods Enzymol*. 352 (2002) 3–31. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)52003-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)52003-6).
- [56] S.G.J.A. Peeters, C.M.L. Zegers, R. Biemans, N.G. Lieuwes, R.G.P.M. Van Stiphout, A. Yaromina, J.D. Sun, C.P. Hart, A.D. Windhorst, W. Van Elmpt, L.J. Dubois, P. Lambin, TH-302 in Combination with Radiotherapy Enhances the Therapeutic Outcome and Is Associated with Pretreatment [18F]HX4 Hypoxia PET Imaging, *Clin Cancer Res*. 21 (2015) 2984–2992. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0018>.
- [57] J. Wang, C.P. Guise, G.U. Dachs, Y. Phung, A.H.L. Hsu, N.K. Lambie, A. V. Patterson, W.R. Wilson, Identification of one-electron reductases that activate both the hypoxia prodrug SN30000 and diagnostic probe EF5, *Biochem Pharmacol*. 91 (2014) 436–446. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2014.08.003>.
- [58] J. Wang, A. Foehrenbacher, J. Su, R. Patel, M.P. Hay, K.O. Hicks, W.R. Wilson, The 2-nitroimidazole EF5 is a biomarker for oxidoreductases that activate the bioreductive prodrug CEN-209 under hypoxia, *Clin Cancer Res*. 18 (2012) 1684–1695. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2296>.
- [59] I.N. Fleming, R. Manavaki, P.J. Blower, C. West, K.J. Williams, A.L. Harris, J. Domarkas, S. Lord, C. Baldry, F.J. Gilbert, Imaging tumour hypoxia with positron emission tomography, *Br J Cancer*. 112 (2014) 238–250. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.610>.
- [60] S.E. Lapi, J.S. Lewis, F. Dehdashti, Evaluation of Hypoxia With Copper-Labeled Diacetyl-bis(N-Methylthiosemicarbazone), *Semin Nucl Med*. 45 (2015) 177–185. <https://doi.org/10.1053/J.SEMNUCLMED.2014.10.003>.
- [61] Y. Yao, Y.M. Li, Z.X. He, A.C. Civelek, X.F. Li, Likely Common Role of Hypoxia in Driving 18F-FDG Uptake in Cancer, Myocardial Ischemia, Inflammation and Infection, *Cancer Biother Radiopharm*. 36 (2021) 624–631. https://doi.org/10.1089/GBR.2020.4716/ASSET/IMAGES/LARGE/GBR.2020.4716_FIGURE3.JPG.
- [62] C.M. Desmet, A. Lafosse, S. Vèriter, P.E. Porporato, P. Sonveaux, D. Dufrane, P. Levêque, B. Gallez, Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Oximetry to Monitor Oxygen in Wounds in Diabetic Models, *PLoS One*. 10 (2015) e0144914. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0144914>.
- [63] S. Sandhu, L. Kydd, J. Jaworski, Luminescent Probe Based Techniques for Hypoxia Imaging, *J Nanomed Res*. 6 (2017). <https://doi.org/10.15406/jnmr.2017.06.00160>.
- [64] L. Fass, Imaging and cancer: A review, *Mol Oncol*. 2 (2008) 115–152. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2008.04.001>.

- [65] L.J. Lauwerends, P.B.A.A. Van Driel, R.J. Baatenburg de Jong, J.A.U. Hardillo, S. Koljenovic, G. Puppels, L. Mezzanotte, C.W.G.M. Löwik, E.L. Rosenthal, A.L. Vahrmeijer, S. Keereweer, Real-time fluorescence imaging in intraoperative decision making for cancer surgery, *Lancet Oncol.* 22 (2021) 186–195. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30600-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30600-8).
- [66] S. Keereweer, P.B.A.A. Van Driel, T.J.A. Snoeks, J.D.F. Kerrebijn, R.J.B. De Jong, A.L. Vahrmeijer, H.J.C.M. Sterenborg, C.W.G.M. Löwik, Optical image-guided cancer surgery: challenges and limitations, *Clin Cancer Res.* 19 (2013) 3745–3754. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3598>.
- [67] Z. Guo, S. Park, J. Yoon, I. Shin, Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications, *Chem Soc Rev.* 43 (2013) 16–29. <https://doi.org/10.1039/C3CS60271K>.
- [68] J.N. Liu, W. Bu, J. Shi, Chemical Design and Synthesis of Functionalized Probes for Imaging and Treating Tumor Hypoxia, *Chem Rev.* 117 (2017) 6160–6224. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00525>.
- [69] Y.L. Qi, L. Guo, L.L. Chen, H. Li, Y.S. Yang, A.Q. Jiang, H.L. Zhu, Recent progress in the design principles, sensing mechanisms, and applications of small-molecule probes for nitroreductases, *Coord Chem Rev.* 421 (2020) 213460. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213460>.
- [70] I.M. Oliveira, D. Bonatto, J. Antonio, P. Henriques, R.F. Vargas, Nitroreductases: Enzymes with Environmental, Biotechnological and Clinical Importance, in: Mendez-Vilas A (Ed.), *Current Research, Technology and Education in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2010: pp. 1008–1019.
- [71] C.A. Haynes, R.L. Koder, A.F. Miller, D.W. Rodgers, Structures of Nitroreductase in Three States: Effects of inhibitor binding and reduction, *J Biol Chem.* 277 (2002) 11513–11520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111334200>.
- [72] S. Kizaka-Kondoh, H. Konse-Nagasawa, Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia, *Cancer Sci.* 100 (2009) 1366–1373. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01195.x>.
- [73] J. Qiao, M. Wang, M. Cui, Y. Fang, H. Li, C. Zheng, Z. Li, Y. Xu, H. Hua, D. Li, Small-molecule probes for fluorescent detection of cellular hypoxia-related nitroreductase, *J Pharm Biomed Anal.* 203 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114199>.
- [74] H. Guillén, J.A. Curiel, J.M. Landete, R. Muñoz, T. Herraiz, Characterization of a Nitroreductase with Selective Nitroreduction Properties in the Food and Intestinal Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *J Agric Food Chem.* 57 (2009) 10457–10465. <https://doi.org/10.1021/JF9024135>.
- [75] Y. Masaki, Y. Shimizu, T. Yoshioka, F. Feng, S. Zhao, K. Higashino, Y. Numata, Y. Kuge, Imaging Mass Spectrometry Revealed the Accumulation Characteristics of the 2-Nitroimidazole-Based Agent “Pimonidazole” in Hypoxia, *PLoS One.* 11 (2016) e0161639. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0161639>.
- [76] J.A. Raleigh, C.J. Koch, Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitroimidazoles to macromolecules, *Biochem Pharmacol.* 40 (1990) 2457–2464. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(90\)90086-Z](https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90086-Z).
- [77] S. Luo, R. Zou, J. Wu, M.P. Landry, A Probe for the Detection of Hypoxic Cancer Cells, *ACS Sens.* 2 (2017) 1139–1145. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00171>.
- [78] Y. Zhang, X.F. Zhang, Q. Chen, X.Q. Cao, S.L. Shen, A novel near-infrared fluorescence off-on probe for imaging hypoxia and nitroreductase in cells and in vivo, *Sens Actuators B Chem.* 353 (2022) 131–145. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2021.131145>.
- [79] Y. Li, Y. Sun, J. Li, Q. Su, W. Yuan, Y. Dai, C. Han, Q. Wang, W. Feng, F. Li, Ultrasensitive near-infrared fluorescence-enhanced probe for in vivo nitroreductase imaging, *J Am Chem Soc.* 137 (2015) 6407–6416. https://doi.org/10.1021/JACS.5B04097/SUPPL_FILE/JA5B04097_SI_003.AVI.
- [80] K.S. Hettie, J.L. Klockow, E.J. Moon, A.J. Giaccia, F.T. Chin, A NIR fluorescent smart probe for imaging tumor hypoxia, *Cancer Reports.* 4 (2021). <https://doi.org/10.1002/CNR2.1384>.
- [81] S. Pastorekova, R.J. Gillies, The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond, *Cancer and Metastasis Reviews* 2019 38:1. 38 (2019) 65–77. <https://doi.org/10.1007/S10555-019-09799-0>.
- [82] F.J. Huizing, B.A.W. Hoeben, J. Lok, O.C. Boerman, S. Heskamp, J. Bussink, Imaging carbonic anhydrase IX as a method for monitoring hypoxia-related radioresistance in preclinical head and neck cancer models, *Phys Imaging Radiat Oncol.* 19 (2021) 145–150. <https://doi.org/10.1016/J.PHRO.2021.08.004>.
- [83] K. Zhang, D. Chen, K. Ma, X. Wu, H. Hao, S. Jiang, NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) as a Therapeutic and Diagnostic Target in Cancer, *J Med Chem.* 61 (2018) 6983–7003. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.8B00124>.

- [84] S. Koyasu, M. Kobayashi, Y. Goto, M. Hiraoka, H. Harada, Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge, *Cancer Sci.* 109 (2018) 560–571. <https://doi.org/10.1111/CAS.13483>.
- [85] K. Kiyose, K. Hanaoka, D. Oushiki, T. Nakamura, M. Kajimura, M. Suematsu, H. Nishimatsu, T. Yamane, T. Terai, Y. Hirata, T. Nagano, Hypoxia-sensitive fluorescent probes for in vivo real-time fluorescence imaging of acute ischemia, *J Am Chem Soc.* 132 (2010) 15846–15848. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja105937q>.
- [86] J. Li, Y. Yuan, G. Zeng, X. Li, Z. Yang, X. Li, R. Jiang, W. Hu, P. Sun, Q. Wang, X. Lu, Q. Fan, W. Huang, A water-soluble conjugated polymer with azobenzol side chains based on “turn-on” effect for hypoxic cell imaging, *Polym Chem.* 7 (2016) 6890–6894. <https://doi.org/10.1039/C6PY01567K>.
- [87] D. Ma, C. Huang, J. Zheng, W. Zhou, J. Tang, W. Chen, J. Li, R. Yang, Azoreductase-Responsive Nanoprobe for Hypoxia-Induced Mitophagy Imaging, *Anal Chem.* 91 (2019) 1360–1367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03492>.
- [88] W. Piao, S. Tsuda, Y. Tanaka, S. Maeda, F. Liu, S. Takahashi, Y. Kushida, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Nakazawa, M. Uchiyama, K. Morokuma, T. Nagano, K. Hanaoka, Development of Azo-Based Fluorescent Probes to Detect Different Levels of Hypoxia, *Angewandte Chemie International Edition.* 52 (2013) 13028–13032. <https://doi.org/10.1002/anie.201305784>.
- [89] D. Ross, D. Siegel, NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1, DT-Diaphorase), Functions and Pharmacogenetics, *Methods Enzymol.* 382 (2004) 115–144. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)82008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)82008-1).
- [90] Y.J. Yang, M. Dai, Y.J. Reo, C.W. Song, S. Sarkar, K.H. Ahn, NAD(P)H Quinone Oxidoreductase-1 in Organ and Tumor Tissues: Distinct Activity Levels Observed with a Benzo-rosol-Based Dual-Excitation and Dual-Emission Probe, *Anal Chem.* 93 (2021) 7523–7531. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01178>.
- [91] S.R. Punganuru, H.R. Madala, V. Arutla, R. Zhang, K.S. Srivenugopal, Characterization of a highly specific NQO1-activated near-infrared fluorescent probe and its application for in vivo tumor imaging, *Sci Rep.* 9 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44111-8>.
- [92] P.J. O'Dwyer, K.-S. Yao, P. Ford, A.K. Godwin, M. Clayton, Effects of Hypoxia on Detoxifying Enzyme Activity and Expression in HT29 Colon Cells, *Cancer Reserch.* 54 (1994) 3082–3087. <https://doi.org/0.1007/s00280-001-0395-1>.
- [93] E. Manley, D.J. Waxman, Impact of tumor blood flow modulation on tumor sensitivity to the bioreductive drug banoxantrone, *J Pharmacol Exp Ther.* 344 (2013) 368–377. <https://doi.org/10.1124/JPET.112.200089>.
- [94] P. Workman, KEYNOTE ADDRESS: BIOREDUCTIVE MECHANISMS, *Oncology EmI PhrJ.* 22 (n.d.) 631–637.
- [95] A. V. Pandey, C.E. Flück, NADPH P450 oxidoreductase: Structure, function, and pathology of diseases, *Pharmacol Ther.* 138 (2013) 229–254. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2013.01.010>.
- [96] C.P. Guise, A.T. Wang, A. Theil, D.J. Bridewell, W.R. Wilson, A. V. Patterson, Identification of human reductases that activate the dinitrobenzamide mustard prodrug PR-104A: a role for NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase under hypoxia, *Biochem Pharmacol.* 74 (2007) 810–820. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2007.06.014>.
- [97] J. Butler, B.M. Hoey, The one-electron reduction potential of several substrates can be related to their reduction rates by cytochrome P-450 reductase, *Biochim Biophys Acta.* 1161 (1993) 73–78. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90198-Z](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90198-Z).
- [98] S.M. Bailey, A.D. Lewis, L.H. Patterson, G.R. Fisher, R.J. Knox, P. Workman, Involvement of NADPH: cytochrome P450 reductase in the activation of indoloquinone EO9 to free radical and DNA damaging species, *Biochem Pharmacol.* 62 (2001) 461–468. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00674-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00674-8).
- [99] N. Cenas, Z. Anusevicius, D. Bironaite, G.I. Bachmanova, A.I. Archakov, K. Ollinger, The electron transfer reactions of NADPH: cytochrome P450 reductase with nonphysiological oxidants, *Arch Biochem Biophys.* 315 (1994) 400–406. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1994.1517>.
- [100] A. V. Patterson, M.P. Saunders, E.C. Chinje, D.C. Talbot, A.L. Harris, I.J. Stratford, Overexpression of human NADPH:cytochrome c (P450) reductase confers enhanced sensitivity to both tirapazamine (SR 4233) and RSU 1069, *British Journal of Cancer.* 76 (1997) 1338–1347. <https://doi.org/10.1038/bjc.1997.558>.
- [101] M.P. Saunders, A. V. Patterson, E.C. Chinje, A.L. Harris, I.J. Stratford, NADPH:cytochrome c (P450) reductase activates tirapazamine (SR4233) to restore hypoxic and oxycytotoxicity in an aerobic resistant derivative of the A549 lung cancer cell line, *Br J Cancer.* 82 (2000) 651–656. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.0977>.

- [102] F.W. Hunter, R.J. Young, Z. Shalev, R.N. Vellanki, J. Wang, Y. Gu, N. Joshi, S. Sreebhavan, I. Weinreb, D.P. Goldstein, J. Moffat, T. Ketela, K.R. Brown, M. Koritzinsky, B. Solomon, D. Rischin, W.R. Wilson, B.G. Wouters, Identification of P450 Oxidoreductase as a Major Determinant of Sensitivity to Hypoxia-Activated Prodrugs, *Cancer Res.* 75 (2015) 4211–4223. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1107>.
- [103] K.J. Nytko, I. Grgic, S. Bender, J. Ott, M. Guckenberger, O. Riesterer, M. Pruschy, The hypoxia-activated prodrug evofosfamide in combination with multiple regimens of radiotherapy, *Oncotarget.* 8 (2017) 23702–23712. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15784>.
- [104] J. V. Jun, D.M. Chenoweth, E.J. Petersson, Rational Design of Small Molecule Fluorescent Probes for Biological Applications, *Org Biomol Chem.* 18 (2020) 5747. <https://doi.org/10.1039/D0OB01131B>.
- [105] Y.; Yang, F.; Gao, Y.; Wang, H.; Li, J.; Zhang, Z.; Sun, Y. Jiang, Y. Yang, F. Gao, Y. Wang, H. Li, J. Zhang, Z. Sun, Y. Jiang, Fluorescent Organic Small Molecule Probes for Bioimaging and Detection Applications, *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 8421. 27 (2022) 8421. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27238421>.
- [106] Y. Fu, N.S. Finney, Small-molecule fluorescent probes and their design, *RSC Adv.* 8 (2018) 29051–29061. <https://doi.org/10.1039/C8RA02297F>.
- [107] K. Namba, A. Osawa, S. Ishizaka, N. Kitamura, K. Tanino, Direct synthesis of fluorescent 1,3a,6a-triazapentalene derivatives via click-cyclization-aromatization cascade reaction, *J Am Chem Soc.* 133 (2011) 11466–11469. <https://doi.org/10.1021/JA203917R>.
- [108] D. Sirbu, J. Diharce, I. Martinić, N. Chopin, S. V. Eliseeva, G. Guillaumet, S. Petoud, P. Bonnet, F. Suzenet, An original class of small sized molecules as versatile fluorescent probes for cellular imaging, *Commun Chem.* 55 (2019) 7776–7779. <https://doi.org/10.1039/C9CC03765A>.
- [109] M. Daniel, M.A. Hiebel, G. Guillaumet, E. Pasquinet, F. Suzenet, Intramolecular Metal-Free N–N Bond Formation with Heteroaromatic Amines: Mild Access to Fused-Triazapentalene Derivatives, *Chem - Eur J.* 26 (2020) 1525–1529. <https://doi.org/10.1002/chem.201905558>.
- [110] D. Sirbu, N. Chopin, I. Martinić, M. Ndiaye, S. V. Eliseeva, M.A. Hiebel, S. Petoud, F. Suzenet, Pyridazino-1,3a,6a-triazapentalenes as versatile fluorescent probes: Impact of their post-functionalization and application for cellular imaging, *Int J Mol Sci.* 22 (2021) 6645. <https://doi.org/10.3390/IJMS22126645/S1>.
- [111] L. Dai, J. Liu, Z. Luo, M. Li, K. Cai, Tumor therapy: targeted drug delivery systems, *J Mater Chem B.* 4 (2016) 6758–6772. <https://doi.org/10.1039/C6TB01743F>.
- [112] M.F. Attia, N. Anton, J. Wallyn, Z. Omran, T.F. Vandamme, An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites, *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 71 (2019) 1185–1198. <https://doi.org/10.1111/JPHP.13098>.
- [113] W. Mu, Q. Chu, Y. Liu, N. Zhang, A Review on Nano-Based Drug Delivery System for Cancer Chemoimmunotherapy, *Nano-Micro Letters* 2020 12:1. 12 (2020) 1–24. <https://doi.org/10.1007/S40820-020-00482-6>.
- [114] D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, J.M. Karp, D. Peer, Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics, *Nature Communications* 2018 9:1. 9 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03705-y>.
- [115] P. Aisen, A. Leibman, J. Zweier, Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin, *J Biol Chem.* 253 (1978) 1930–1937. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)62337-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)62337-9).
- [116] H. Li, Z.M. Qian, Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery, *Med Res Rev.* 22 (2002) 225–250. <https://doi.org/10.1002/MED.10008>.
- [117] S. Tortorella, T.C. Karagiannis, S. Tortorella, T.C. Karagiannis, Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis: A Useful Target for Cancer Therapy, *J Membr Biol.* 247 (2014) 291–307. <https://doi.org/10.1007/S00232-014-9637-0>.
- [118] D.R. Richardson, P. Ponka, The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells, *Biochim Biophys Acta.* 1331 (1997) 1–40. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00014-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00014-7).
- [119] Y. Shen, X. Li, D. Dong, B. Zhang, Y. Xue, P. Shang, Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy, *Am J Cancer Res.* 8 (2018) 916. [/pmc/articles/PMC6048407/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30448407/) (accessed August 30, 2022).
- [120] P. V. Candelaria, L.S. Leoh, M.L. Penichet, T.R. Daniels-Wells, Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents, *Front Immunol.* 12 (2021) 583. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607692>.
- [121] J. Wang, S. Tian, R.A. Petros, M.E. Napier, J.M. Desimone, The complex role of multivalency in nanoparticles targeting the transferrin receptor for cancer therapies, *J Am Chem Soc.* 132 (2010) 11306–11313. <https://doi.org/10.1021/ja1043177>.

- [122] D. Abegg, G. Gasparini, D.G. Hoch, A. Shuster, E. Bartolami, S. Matile, A. Adibekian, Strained cyclic disulfides enable cellular uptake by reacting with the transferrin receptor, *J Am Chem Soc.* 139 (2017) 231–238. https://doi.org/10.1021/JACS.6B09643/ASSET/IMAGES/LARGE/JA-2016-09643M_0006.JPEG.
- [123] T.R. Daniels, E. Bernabeu, J.A. Rodríguez, S. Patel, M. Kozman, D.A. Chiappetta, E. Holler, J.Y. Ljubimova, G. Helguera, M.L. Penichet, The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer, *Biochim Biophys Acta.* 1820 (2012) 291–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.016>.
- [124] D.W. Laske, R.J. Youle, E.H. Oldfield, Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors, *Nat Med.* 3 (1997) 1362–1368. <https://doi.org/10.1038/NM1297-1362>.
- [125] M. Weaver, D.W. Laske, Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (TF-CRM107) for therapy of malignant gliomas, *J Neurooncol.* 65 (2003) 3–14. <https://doi.org/10.1023/A:1026246500788>.
- [126] M.J. Ramalho, J.A. Loureiro, M.A.N. Coelho, M.C. Pereira, Transferrin Receptor-Targeted Nanocarriers: Overcoming Barriers to Treat Glioblastoma, *Pharmaceutics.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14020279>.
- [127] P.S. Steeg, Targeting metastasis, *Nat Rev Cancer.* 16 (2016) 201–218. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.25>.
- [128] J. Araya, M. Maruyama, K. Sassa, T. Fujita, R. Hayashi, S. Matsui, T. Kashii, N. Yamashita, E. Sugiyama, M. Kobayashi, Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 production in human lung epithelial cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280 (2001). <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.2001.280.1.L30/ASSET/IMAGES/LARGE/H50110202008.JPEG>.
- [129] G.P. Gupta, J. Massagué, Cancer Metastasis: Building a Framework, *Cell.* 127 (2006) 679–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>.
- [130] P.S. Steeg, Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges, *Nat Med.* 12 (2006) 895–904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>.
- [131] E.B. Rankin, A.J. Giaccia, Hypoxic control of metastasis, *Science.* 352 (2016) 175. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF4405>.
- [132] G.L. Semenza, The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1863 (2016) 382–391. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2015.05.036>.
- [133] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, A.K. Azab, The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy, *Hypoxia.* 3 (2015) 83. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.
- [134] Z. Ma, L.Z. Wang, J.T. Cheng, W.S.T. Lam, X. Ma, X. Xiang, A.L.A. Wong, B.C. Goh, Q. Gong, G. Sethi, L. Wang, Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1-Mediated Metastasis for Cancer Therapy, [https://Home.Liebertpub.Com/Ars.34\(2021\)1484-1497](https://Home.Liebertpub.Com/Ars.34(2021)1484-1497). <https://doi.org/10.1089/ARS.2019.7935>.
- [135] E.B. Rankin, J.M. Nam, A.J. Giaccia, Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade, *Trends Cancer.* 2 (2016) 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.05.006>.
- [136] D.M. Gilkes, M.A. Desiderio, Implications of Hypoxia in Breast Cancer Metastasis to Bone, *International Journal of Molecular Sciences* 2016, Vol. 17, Page 1669. 17 (2016) 1669. <https://doi.org/10.3390/IJMS17101669>.
- [137] K. De Bock, M. Mazzone, P. Carmeliet, Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not?, *Nature Reviews Clinical Oncology* 2011 8:7. 8 (2011) 393–404. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.83>.
- [138] K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment, *Cell.* 141 (2010) 52–67. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.03.015>.
- [139] Y. Xu, L. Zhang, Y. Wei, X. Zhang, R. Xu, M. Han, B. Huang, A. Chen, W. Li, Q. Zhang, G. Li, J. Wang, P. Zhao, X. Li, Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 promotes hypoxia-induced glioma migration and invasion, *Oncotarget.* 8 (2017) 23401. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15581>.
- [140] H. Zhang, C.C.L. Wong, H. Wei, D.M. Gilkes, P. Korangath, P. Chaturvedi, L. Schito, J. Chen, B. Krishnamachary, P.T. Winnard, V. Raman, L. Zhen, W.A. Mitzner, S. Sukumar, G.L. Semenza, HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs, *Oncogene.* 31 (2012) 1757–1770. <https://doi.org/10.1038/ONC.2011.365>.
- [141] V. Plaks, N. Kong, Z. Werb, The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?, *Cell Stem Cell.* 16 (2015) 225–238.

- <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2015.02.015/ATTACHMENT/FBBC8DC1-5C31-4080-B5E7-C19AEEDCAEDC/MMC1.PDF>.
- [142] C.C.L. Wong, D.M. Gilkes, H. Zhang, J. Chen, H. Wei, P. Chaturvedi, S.I. Fraley, C.M. Wong, U.S. Khoo, I.O.L. Ng, D. Wirtz, G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108 (2011) 16369–16374. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1113483108/-DCSUPPLEMENTAL>.
- [143] New Insights into Individualized Antimetastatic Therapy, (n.d.). <https://www.longdom.org/open-access/new-insights-into-individualized-antimetastatic-therapy.pdf> (accessed April 4, 2023).
- [144] A.M. Shannon, D.J. Bouchier-Hayes, C.M. Condon, D. Toomey, Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies, *Cancer Treat Rev*. 29 (2003) 297–307. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(03\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(03)00003-3).
- [145] B.A. Teicher, Hypoxia and drug resistance, *Cancer and Metastasis Reviews*. 13 (1994) 139–168. <https://doi.org/10.1007/BF00689633/METRICS>.
- [146] V.L. Codony, M. Tavassoli, Hypoxia-induced therapy resistance: Available hypoxia-targeting strategies and current advances in head and neck cancer, *Transl Oncol*. 14 (2021) 101017. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2021.101017>.
- [147] L. Yong, S. Tang, H. Yu, H. Zhang, Y. Zhang, Y. Wan, F. Cai, The role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in multidrug-resistant breast cancer, *Front Oncol*. 12 (2022) 3787. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.964934/BIBTEX>.
- [148] S. V. Karakashev, M.J. Reginato, Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy, *Cancer Manag Res*. 7 (2015) 253–264. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S58285>.
- [149] M.R. Horsman, B.S. Sørensen, M. Busk, D.W. Siemann, Therapeutic Modification of Hypoxia, *Clin Oncol*. 33 (2021) e492–e509. <https://doi.org/10.1016/J.CLON.2021.08.014>.
- [150] T.J. Zhou, L. Xing, Y.T. Fan, P.F. Cui, H.L. Jiang, Light triggered oxygen-affording engines for repeated hypoxia-resistant photodynamic therapy, *Journal of Controlled Release*. 307 (2019) 44–54. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2019.06.016>.
- [151] M. Li, Y. Xu, X. Peng, J.S. Kim, From Low to No O₂-Dependent Hypoxia Photodynamic Therapy (hPDT): A New Perspective, *Acc Chem Res*. 55 (2022) 3253–3264. <https://doi.org/10.1021/ACS.ACCOUNTS.2C00531>.
- [152] A. Bergamo, G. Sava, Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases, *Chem Soc Rev*. 44 (2015) 8818–8835. <https://doi.org/10.1039/c5cs00134j>.
- [153] C. Sonkar, S. Sarkar, S. Mukhopadhyay, Ruthenium(II)–arene complexes as anti-metastatic agents, and related techniques, *RSC Med Chem*. 13 (2022) 22–38. <https://doi.org/10.1039/D1MD00220A>.
- [154] L. Gu, X. Li, Q. Ran, C. Kang, C. Lee, J. Shen, Antimetastatic activity of novel ruthenium (III) pyridine complexes, *Cancer Med*. 5 (2016) 2850–2860. <https://doi.org/10.1002/CAM4.826>.
- [155] K. Lin, Z.Z. Zhao, H. Ben Bo, X.J. Hao, J.Q. Wang, Applications of ruthenium complex in tumor diagnosis and therapy, *Front Pharmacol*. 9 (2018) 1323. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.01323/BIBTEX>.
- [156] S.Y. Lee, C.Y. Kim, T.G. Nam, Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives, *Drug Des Devel Ther*. 14 (2020) 5375. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S275007>.
- [157] E. Alessio, Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective, *Eur J Inorg Chem*. 2017 (2017) 1549–1560. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600986>.
- [158] B. Gava, S. Zorzet, P. Spessotto, M. Cocchietto, G. Sava, Inhibition of B16 Melanoma Metastases with the Ruthenium Complex Imidazolium trans-Imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and Down-Regulation of Tumor Cell Invasion, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 317 (2006) 284–291. <https://doi.org/10.1124/JPET.105.095141>.
- [159] S. Pacor, S. Zorzet, M. Cocchietto, M. Bacac, M. Vadori, C. Turrin, B. Gava, A. Castellarin, G. Sava, Intratumoral NAMI-A treatment triggers metastasis reduction, which correlates to CD44 regulation and tumor infiltrating lymphocyte recruitment, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 310 (2004) 737–744. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.066175>.
- [160] G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. Digiiovine, G. Pezzoni, L. Sartor, S. Garbisa, Dual Action of NAMI-A in Inhibition of Solid Tumor Metastasis: Selective Targeting of Metastatic Cells and Binding to Collagen 1, 2003.
- [161] S. Chamberlain, H.D. Cole, J. Roque, D. Bellnier, S.A. McFarland, G. Shafirstein, TLD1433-Mediated Photodynamic Therapy with an Optical Surface Applicator in the Treatment of Lung Cancer Cells In Vitro, *Pharmaceuticals* 2020, Vol. 13, Page 137. 13 (2020) 137. <https://doi.org/10.3390/PH13070137>.
- [162] J. Liu, C. Zhang, T.W. Rees, L. Ke, L. Ji, H. Chao, Harnessing ruthenium(II) as photodynamic agents: Encouraging advances in cancer therapy, *Coord Chem Rev*. 363 (2018) 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.002>.

- [163] S. Monro, K.L. Colón, H. Yin, J. Roque, P. Konda, S. Gujar, R.P. Thummel, L. Lilge, C.G. Cameron, S.A. McFarland, Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433, *Chem Rev.* 119 (2019) 797–828. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.8B00211/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2018-00211X_0024.GIF.
- [164] F.E. Poynton, S.A. Bright, S. Blasco, D.C. Williams, J.M. Kelly, T. Gunnlaugsson, The development of ruthenium(II) polypyridyl complexes and conjugates for in vitro cellular and in vivo applications, *Chem Soc Rev.* 46 (2017) 7706–7756. <https://doi.org/10.1039/C7CS00680B>.
- [165] J. Shum, P.K.K. Leung, K.K.W. Lo, Luminescent Ruthenium(II) Polypyridine Complexes for a Wide Variety of Biomolecular and Cellular Applications, *Inorg Chem.* 58 (2019) 2231–2247. https://doi.org/10.1021/ACS.INORGCHEM.8B02979/ASSET/IMAGES/LARGE/IC-2018-02979Z_0003.JPEG.
- [166] O. Mazuryk, M. Maciuszek, G. Stochel, F. Suzenet, M. Brindell, 2-Nitroimidazole-ruthenium polypyridyl complex as a new conjugate for cancer treatment and visualization, *J Inorg Biochem.* 134 (2014) 83–91. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2014.02.001>.
- [167] M. Jakubaszek, B. Goud, S. Ferrari, G. Gasser, Mechanisms of action of Ru(II) polypyridyl complexes in living cells upon light irradiation, *Chemical Communications.* 54 (2018) 13040–13059. <https://doi.org/10.1039/c8cc05928d>.
- [168] W. Cao, W. Zheng, T. Chen, Ruthenium polypyridyl complex inhibits growth and metastasis of breast cancer cells by suppressing FAK signaling with enhancement of TRAIL-induced apoptosis, *Sci Rep.* 5 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep09157>.
- [169] J.Q. Wang, J.F. Kou, Z.Z. Zhao, K.Q. Qiu, H. Chao, Anthraquinone-bridged diruthenium(II) complexes inhibit migration and invasion of human hepatocarcinoma MHCC97-H cells, *Inorg Chem Front.* 4 (2017) 1003–1012. <https://doi.org/10.1039/c7qi00149e>.
- [170] X. Zhao, L. Li, G. Yu, S. Zhang, Y. Li, Q. Wu, X. Huang, W. Mei, Nucleus-enriched Ruthenium Polypyridine Complex Acts as a Potent Inhibitor to Suppress Triple-negative Breast Cancer Metastasis In vivo, *Comput Struct Biotechnol J.* 17 (2019) 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.010>.
- [171] O. Mazuryk, E. Janczy-Cempa, J. Łagosz, D. Rutkowska-Zbik, A. Machnicka, A. Krasowska, P. Pietrzyk, G. Stochel, M. Brindell, Relevance of the electron transfer pathway in photodynamic activity of Ru(II) polypyridyl complexes containing 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ligands under normoxic and hypoxic conditions, *Dalton Transactions.* 51 (2022) 1888–1900. <https://doi.org/10.1039/D1DT02908H>.
- [172] H.A. Goodwin, F. Lions, Tridentate Chelate Compounds. II, *J Am Chem Soc.* 81 (1959) 6415–6422. https://doi.org/10.1021/JA01533A022/ASSET/JA01533A022.FP.PNG_V03.
- [173] O. Mazuryk, K. Magiera, B. Rys, F. Suzenet, C. Kieda, M. Brindell, Multifaceted interplay between lipophilicity, protein interaction and luminescence parameters of non-intercalative ruthenium(II) polypyridyl complexes controlling cellular imaging and cytotoxic properties, *J Biol Inorg Chem.* 19 (2014) 1305–1316. <https://doi.org/10.1007/S00775-014-1187-5>.
- [174] M. Łomzik, O. Mazuryk, D. Rutkowska-Zbik, G. Stochel, P. Gros, M. Brindell, New ruthenium compounds bearing semicarbazone 2-formylpyridine moiety: Playing with auxiliary ligands for tuning the mechanism of biological activity, (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.07.006i>.
- [175] H.A. Goodwin, F. Lions, Tridentate Chelate Compounds. II, *J Am Chem Soc.* 81 (1959) 6415–6422. https://doi.org/10.1021/JA01533A022/ASSET/JA01533A022.FP.PNG_V03.
- [176] R. Caspar, C. Cordier, J.B. Waern, C. Guyard-Duhayon, M. Gruselle, P. Le Floch, H. Amouri, A new family of mono- and dicarboxylic ruthenium complexes [Ru(DIP) 2(L2)]²⁺ (DIP = 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline): Synthesis, solution behavior, and X-ray molecular structure of trans-[Ru(DIP)2(MeOH)2][OTf]2, *Inorg Chem.* 45 (2006) 4071–4078. https://doi.org/10.1021/IC0601236/SUPPL_FILE/IC0601236SI20060314_061448.PDF.
- [177] J.B. Waern, C. Desmarests, L.M. Chamoreau, H. Amouri, A. Barbieri, C. Sabatini, B. Ventura, F. Barigelletti, Luminescent cyclometalated RhIII, IrIII, and (DIP)2RuII complexes with carboxylated bipyridyl ligands: Synthesis, x-ray molecular structure, and photophysical properties, *Inorg Chem.* 47 (2008) 3340–3348. https://doi.org/10.1021/IC702327Z/SUPPL_FILE/IC702327Z-FILE001.CIF.
- [178] J.R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* (2006) 1–954. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4/COVER>.
- [179] G. Glantzounis, E. Tsimoyiannis, A. Kappas, D. Galaris, Uric Acid and Oxidative Stress, *Curr Pharm Des.* 11 (2005) 4145–4151. <https://doi.org/10.2174/138161205774913255>.
- [180] H.P. Misra, I. Fridovich, A peroxide-dependent reduction of cytochrome c by NADH, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 292 (1973) 815–824. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(73\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(73)90028-5).

- [181] I. Fridovich, Quantitative Aspects of the Production Radical by Milk Xanthine Oxidase* of Superoxide Anion, *Journal of Biological Chemistry*. 245 (1970) 4053–4057. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62884-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62884-4).
- [182] Y. Ohara, T.E. Peterson, D.G. Harrison, Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production., *J Clin Invest*. 91 (1993) 2546–2551. <https://doi.org/10.1172/JCI116491>.
- [183] M.R. Eftink, Fluorescence techniques for studying protein structure, *Methods Biochem Anal*. 35 (1991) 127–205. <https://doi.org/10.1002/9780470110560.CH3>.
- [184] O. Mazuryk, F. Suzenet, C. Kieda, M. Brindell, The biological effect of the nitroimidazole derivative of a polypyridyl ruthenium complex on cancer and endothelial cells, *Metallomics*. 7 (2015) 553–566. <https://doi.org/10.1039/c5mt00037h>.
- [185] D. Sirbu, J. Diharce, I. Martinic', M. Martinic', N. Chopin, S. V Eliseeva, G. Rald Guillaumet, S. Phane Petoud, P. Bonnet, F. Suzenet, R. Li, / Chemcomm, C. Communication, An original class of small sized molecules as versatile fluorescent probes for cellular imaging †, 7776 | *Chem. Commun*. 55 (2019) 7776. <https://doi.org/10.1039/c9cc03765a>.
- [186] M. Daniel, M.-A. Hiebel, G. Guillaumet, E. Pasquinet, F. Suzenet, Intramolecular Metal-Free N^oNB^o Bond Formation with Heteroaromatic Amines: Mild Access to Fused-Triazapentalene Derivatives, (n.d.). <https://doi.org/10.1002/chem.201905558>.
- [187] K. Zhu, T. Qin, C. Zhao, Z. Luo, Y. Huang, B. Liu, L. Wang, A novel fluorescent turn-on probe for highly selective detection of nitroreductase in tumor cells, *Sens Actuators B Chem*. 276 (2018) 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.08.134>.
- [188] E. Janczy-Cempa, O. Mazuryk, A. Kania, M. Brindell, Significance of Specific Oxidoreductases in the Design of Hypoxia-Activated Prodrugs and Fluorescent Turn off-on Probes for Hypoxia Imaging, *Cancers (Basel)*. 14 (2022) 2686. <https://doi.org/10.3390/cancers14112686>.
- [189] J. Maillard, K. Klehs, C. Rumble, E. Vauthey, M. Heilemann, A. Fürstenberg, Universal quenching of common fluorescent probes by water and alcohols, *Chem Sci*. 12 (2021) 1352–1362. <https://doi.org/10.1039/D0SC05431C>.
- [190] G.E. Dobretsov, T.I. Syrejschikova, N. V. Smolina, On mechanisms of fluorescence quenching by water, *Biophysics* 2014 59:2. 59 (2014) 183–188. <https://doi.org/10.1134/S0006350914020079>.
- [191] Y. Zuo, X. Wang, Z. Gou, W. Lin, Enhancing photostability of the fluorescent probe using polysiloxane-based imidazolium ionic liquid prepared via poly-radziszewski reaction for the detection of SCN⁻, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128352>.
- [192] T. Bernas, J.P. Robinson, E.K. Asem, B. Rajwa, Loss of image quality in photobleaching during microscopic imaging of fluorescent probes bound to chromatin, *J Biomed Opt*. 10 (2005) 064015. <https://doi.org/10.1117/1.2136313>.
- [193] B.D. Palmer, P. van Zijl, W.A. Denny, W.R. Wilson, Reductive Chemistry of the Novel Hypoxia-Selective Cytotoxin 5-[N,N-Bis(2-chloroethyl)amino]-2,4-dinitrobenzamide, *J Med Chem*. 38 (1995) 1229–1241. https://doi.org/10.1021/JM00007A019/ASSET/JM00007A019.FP.PNG_V03.
- [194] H. Hosoya, L.C. Misal Castro, I. Sultan, Y. Nakajima, T. Ohmura, K. Sato, H. Tsurugi, M. Suginome, K. Mashima, 4,4'-Bipyridyl-Catalyzed Reduction of Nitroarenes by Bis(neopentylglycolato)diboron, *Org Lett*. 21 (2019) 9812–9817. https://doi.org/10.1021/ACS.ORGLETT.9B03419/SUPPL_FILE/OL9B03419_SI_001.PDF.
- [195] E. Johansson, G.N. Parkinson, W.A. Denny, S. Neidle, Studies on the nitroreductase prodrug-activating system. Crystal structures of complexes with the inhibitor dicoumarol and dinitrobenzamide prodrugs and of the enzyme active form, *J Med Chem*. 46 (2003) 4009–4020. <https://doi.org/10.1021/jm030843b>.
- [196] K. Tatsumi, A. Inoue, H. Yoshimura, Mode of reactions between xanthine oxidase and aromatic nitro compounds, *J Pharmacobiodyn*. 4 (1981) 101–108. <https://doi.org/10.1248/BPB1978.4.101>.
- [197] F. Elahian, Z. Sepehrizadeh, B. Moghimi, S.A. Mirzaei, Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications, *Crit Rev Biotechnol*. 34 (2014) 134–143. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.732031>.
- [198] A. Marín, A. López De Cerain, E. Hamilton, A.D. Lewis, J.M. Martínez-Peñuela, M.A. Idoate, J. Bello, DT-diaphorase and cytochrome B5 reductase in human lung and breast tumours, *Br J Cancer*. 76 (1997) 923–929. <https://doi.org/10.1038/BJC.1997.485>.
- [199] M. Lehr, J. Fabian, W. Hanekamp, Involvement of microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase in metabolic reduction of drug ketones, *Biopharm Drug Dispos*. 36 (2015) 398–404. <https://doi.org/10.1002/BDD.1946>.
- [200] M.I. Walton, C.R. Wolf, P. Workman, The role of cytochrome P450 and cytochrome P450 reductase in the reductive bioactivation of the novel benzotriazine di-N-oxide hypoxic cytotoxin 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-dioxide (SR 4233, WIN 59075) by mouse liver, *Biochem Pharmacol*. 44 (1992) 251–259. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90007-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90007-6).

- [201] F. Kratz, Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *Journal of Controlled Release*. 132 (2008) 171–183. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2008.05.010>.
- [202] G.E. Dobretsov, T.I. Syrejschikova, N. V. Smolina, On mechanisms of fluorescence quenching by water, *Biophysics* 2014 59:2. 59 (2014) 183–188. <https://doi.org/10.1134/S0006350914020079>.
- [203] L. Li, C. Li, Z. Zhang, E. Alexov, On the dielectric “constant” of proteins: Smooth dielectric function for macromolecular modeling and its implementation in DelPhi, *J Chem Theory Comput*. 9 (2013) 2126–2136. https://doi.org/10.1021/CT400065J/ASSET/IMAGES/CT-2013-00065J_M004.GIF.
- [204] G. Dobretsov, B. Polyak, N. Smolina, T. Babushkina, T. Syrejschikova, T. Klimova, V. Sverbil, A. Peregudov, Y. Gryzunov, O. Sarkisov, Interaction of a fluorescent probe, CAPIDAN, with human serum albumin, *J Photochem Photobiol A Chem*. 251 (2013) 134–140. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEM.2012.11.001>.
- [205] H. Hwang, S. Myong, Protein induced fluorescence enhancement (PIFE) for probing protein-nucleic acid interactions, *Chem Soc Rev*. 43 (2014) 1221–1229. <https://doi.org/10.1039/C3CS60201J>.
- [206] E.M.S. Stennett, M.A. Ciuba, S. Lin, M. Levitus, Demystifying PIFE: The Photophysics behind the Protein-Induced Fluorescence Enhancement Phenomenon in Cy3, *Journal of Physical Chemistry Letters*. 6 (2015) 1819–1823. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCLETT.5B00613/SUPPL_FILE/JZ5B00613_SI_001.PDF.
- [207] H. Hwang, S. Myong, S. Edu, Protein induced fluorescence enhancement (PIFE) for probing protein-nucleic acid interactions, (2014). <https://doi.org/10.1039/c3cs60201j>.
- [208] F. V. Almeida, S.M. Douglass, M.E. Fane, A.T. Weeraratna, Bad Company: Microenvironmentally Mediated Resistance to Targeted Therapy in Melanoma, *Pigment Cell Melanoma Res*. 32 (2019) 237. <https://doi.org/10.1111/PCMR.12736>.
- [209] Assay Guidance Manual | National Center for Advancing Translational Sciences, (n.d.). <https://ncats.nih.gov/expertise/preclinical/agm> (accessed November 24, 2022).
- [210] Z. Li, X. He, Z. Wang, R. Yang, W. Shi, H. Ma, in vivo imaging and detection of nitroreductase in zebrafish by a new near-infrared fluorescence off–on probe, *Biosens Bioelectron*. 63 (2015) 112–116. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2014.07.024>.
- [211] S.A. Anderson, C.P. Nizzi, Y.I. Chang, K.M. Deck, P.J. Schmidt, B. Galy, A. Damnerasawad, A.T. Broman, C. Kendzioriski, M.W. Hentze, M.D. Fleming, J. Zhang, R.S. Eisenstein, The IRP1-HIF-2 α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption, *Cell Metab*. 17 (2013) 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.007>.
- [212] J.G. Shewale, K. Brew, Effects of Fe³⁺ Binding on the Microenvironments of Individual Amino Groups in Human Serum Transferrin as Determined by Differential Kinetic Labeling*, 257 (1982) 9406–415.
- [213] L. Horonchik, M. Wessling-Resnick, The Small-Molecule Iron Transport Inhibitor Ferristatin/NSC306711 Promotes Degradation of the Transferrin Receptor, *Chem Biol*. 15 (2008) 647. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.011>.
- [214] S.L. Byrne, P.D. Buckett, J. Kim, F. Luo, J. Sanford, J. Chen, C. Enns, M. Wessling-Resnick, Ferristatin II promotes degradation of transferrin receptor-1 in vitro and in vivo, *PLoS One*. 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070199>.
- [215] C. Guo, L.-J. Hao, Z.-H. Yang, R. Chai, S. Zhang, Y. Gu, H.-L. Gao, M.-L. Zhong, T. Wang, J.-Y. Li, Z.-Y. Wang, Deferoxamine-mediated up-regulation of HIF-1 α prevents dopaminergic neuronal death via the activation of MAPK family proteins in MPTP-treated mice, *Exp Neurol*. 280 (2016) 13–23. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2016.03.016>.
- [216] K.J. Woo, T.J. Lee, J.W. Park, T.K. Kwon, Desferrioxamine, an iron chelator, enhances HIF-1 α accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway, *Biochem Biophys Res Commun*. 343 (2006) 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.02.116>.
- [217] J. Muñoz-Sánchez, M.E. Chánez-Cárdenas, The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model, *Journal of Applied Toxicology*. 39 (2019) 556–570. <https://doi.org/10.1002/JAT.3749>.
- [218] H. Rinderknecht, S. Ehnert, B. Braun, T. Histing, A.K. Nussler, C. Linnemann, The Art of Inducing Hypoxia, *Oxygen* 2021, Vol. 1, Pages 46-61. 1 (2021) 46–61. <https://doi.org/10.3390/OXYGEN1010006>.
- [219] C.P. Guise, M.R. Abbattista, S.R. Tipparaju, N.K. Lambie, J. Su, D. Li, W.R. Wilson, G.U. Dachs, A. V. Patterson, Diflavin oxidoreductases activate the bioreductive prodrug PR-104A under hypoxia, *Mol Pharmacol*. 81 (2012) 31–40. <https://doi.org/10.1124/MOL.111.073759>.
- [220] X. Jing, F. Yang, C. Shao, K. Wei, M. Xie, H. Shen, Y. Shu, Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment, *Molecular Cancer* 2019 18:1. 18 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12943-019-1089-9>.

- [221] L. Tahtamouni, M. Ahram, J. Koblinski, C. Rolfo, Molecular Regulation of Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis, *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/1356508>.
- [222] X.F. Li, S. Carlin, M. Urano, J. Russell, C.C. Ling, J.A. O'Donoghue, Visualization of hypoxia in microscopic tumors by immunofluorescent microscopy, *Cancer Res.* 67 (2007) 7646–7653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4353>.
- [223] I. Gurgul, O. Mazuryk, M. Łomzik, P.C. Gros, D. Rutkowska-Zbik, M. Brindell, Unexplored features of Ru(II) polypyridyl complexes-towards combined cytotoxic and antimetastatic activity, *Metallomics*. 12 (2020) 784–793. <https://doi.org/10.1039/d0mt00019a>.
- [224] P. Gajda-Morszewski, I. Gurgul, E. Janczy-Cempa, O. Mazuryk, M. Łomzik, M. Brindell, Inhibition of Matrix Metalloproteinases and Cancer Cell Detachment by Ru(II) Polypyridyl Complexes Containing 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthroline Ligands—New Candidates for Antimetastatic Agents, *Pharmaceuticals* 2021, Vol. 14, Page 1014. 14 (2021) 1014. <https://doi.org/10.3390/PH14101014>.
- [225] Y.J. Wu, M.A. Pagel, L.L. Muldoon, R. Fu, E.A. Neuwelt, High α v Integrin Level of Cancer Cells Is Associated with Development of Brain Metastasis in Athymic Rats, *Anticancer Res.* 37 (2017) 4029–4040. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.11788>.
- [226] V. Jenci, V. Sherwood, J. Howlin, R. Linnskog, A. Säfholm, L. Axelsson, T. Andersson, A t-butylloxycarbonyl-modified Wnt5a-derived hexapeptide functions as a potent antagonist of Wnt5a-dependent melanoma cell invasion, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (2009) 19473–19478. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0909409106>.
- [227] S. Merighi, K. Varani, S. Gessi, E. Cattabriga, V. Iannotta, C. Ulouglu, E. Leung, P.A. Borea, Pharmacological and biochemical characterization of adenosine receptors in the human malignant melanoma A375 cell line, *Br J Pharmacol.* 134 (2001) 1215–1226. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0704352>.
- [228] H.Y. Kim, H. Lee, S.H. Kim, H. Jin, J. Bae, H.K. Choi, Discovery of potential biomarkers in human melanoma cells with different metastatic potential by metabolic and lipidomic profiling, *Sci Rep.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-08433-9>.
- [229] Y. Liang, S. McDonnell, M. Clynes, Examining the relationship between cancer invasion/metastasis and drug resistance, *Curr Cancer Drug Targets.* 2 (2002) 257–277. <https://doi.org/10.2174/1568009023333872>.
- [230] L. Xu, Y.Y. Liu, L.M. Chen, Y.Y. Xie, J.X. Liang, H. Chao, Mitochondria-targeted ruthenium (II) polypyridyl complexes with benzofuran group for live cell imaging, *J Inorg Biochem.* 159 (2016) 82–88. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2016.02.028>.
- [231] C. Morata-Tarifa, G. Jiménez, M.A. García, J.M. Entrena, C. Griñán-Lisón, M. Aguilera, M. Picon-Ruiz, J.A. Marchal, Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells, *Sci Rep.* 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/SREP18772>.
- [232] J.A. Smart, J.E. Oleksak, E.J. Hartsough, Cell Adhesion Molecules in Plasticity and Metastasis, *Mol Cancer Res.* 19 (2021) 25–37. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0595>.
- [233] P. Friedl, E.B. Bröcker, The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix, *Cell Mol Life Sci.* 57 (2000) 41–64. <https://doi.org/10.1007/S000180050498>.
- [234] B. Muz, P. De La Puente, F. Azab, A.K. Azab, Hypoxia Dovepress The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy, (2015). <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.
- [235] J. Dang, H. He, D. Chen, L. Yin, Manipulating tumor hypoxia toward enhanced photodynamic therapy (PDT), *Biomater Sci.* 5 (2017) 1500–1511. <https://doi.org/10.1039/C7BM00392G>.
- [236] L. Hong, J. Li, Y. Luo, T. Guo, C. Zhang, S. Ou, Y. Long, Z. Hu, Recent Advances in Strategies for Addressing Hypoxia in Tumor Photodynamic Therapy, *Biomolecules.* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/BIOM12010081>.
- [237] B. Pucelik, A. Sulek, A. Barzowska, J.M. Dąbrowski, Recent advances in strategies for overcoming hypoxia in photodynamic therapy of cancer, *Cancer Lett.* 492 (2020) 116–135. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.07.007>.
- [238] J.M. Dąbrowski, B. Pucelik, A. Regiel-Futyra, M. Brindell, O. Mazuryk, A. Kyzioł, G. Stochel, W. Macyk, L.G. Amaut, Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metalotetrapyrrolic photosensitizers, *Coord Chem Rev.* 325 (2016) 67–101. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2016.06.007>.
- [239] M. Fujita, K. Imadome, T. Imai, Metabolic characterization of invaded cells of the pancreatic cancer cell line, PANC-1, *Cancer Sci.* 108 (2017) 961–971. <https://doi.org/10.1111/CAS.13220>.

- [240] M.-W. Lin, C.-H. Law, H.-C. Chou, Identifying the invasive nature of a distinct population from A549 adenocarcinomic lung cancer cell, *Biomarkers and Genomic Medicine*. 6 (2014) 159–162. <https://doi.org/10.1016/J.BGM.2014.07.002>.
 - [241] Z. Han, Y. Chen, Y. Wang, X. Shi, H. Yuan, Y. Bai, Z. Chen, H. Fang, W. He, Z. Guo, Photoinduced synergistic cytotoxicity towards cancer cells via Ru(II) complexes, *Dalton Transactions*. 49 (2020) 13954–13957. <https://doi.org/10.1039/D0DT02627A>.
 - [242] M.-F. Zuluaga, N. Lange, Combination of photodynamic therapy with anti-cancer agents, *Curr Med Chem*. 15 (2008) 1655–1673. <https://doi.org/10.2174/092986708784872401>.
-

Publikacje naukowe

- 1) **E. Janczy-Cempa**, O. Mazuryk, D. Sirbu, N. Chopin, M. Żarnik, M. Zastawna, C. Colas, M.A. Hiebel, F. Suzenet, M. Brindell "Nitro-pyrazinotriazapentalene scaffolds – nitroreductase quantification and in vitro fluorescence imaging of hypoxia" *Sensors & Actuators: B. Chemical* **2021**, 346, 925–4005, doi.org/10.1016/j.snb.2021.13054;
- 2) P. Gajda-Morszewski, I. Gurgul, **E. Janczy-Cempa**, O. Mazuryk, M. Łomzik, M. Brindell, "Inhibition of matrix metalloproteinases and cancer cell detachment by Ru(II) polypyridyl complexes containing 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ligands - new candidates for antimetastatic agents" *Pharmaceuticals* **2021**, 14, 1014. doi.org/10.3390/ph14101014;
- 3) M. Brindell, I. Gurgul, **E. Janczy-Cempa**, P. Gajda-Morszewski, O. Mazuryk "Moving Ru polypyridyl complexes beyond cytotoxic activity towards metastasis inhibition" *J. Inorg. Biochem.* **2022**, 1, 226, 111652. doi:10.1016/j.jinorgbio.2021.111652;
- 4) **E. Janczy-Cempa**, O. Mazuryk, A. Kania, M. Brindell "Significance of specific oxidoreductases in the design of hypoxia - activated prodrugs and fluorescent turn off–on probes for hypoxia imaging" *Cancers* **2022**, 14, 2686. doi.org/10.3390/cancers14112686;
- 5) I. Gurgul[#], **E. Janczy-Cempa**[#], O. Mazuryk, M. Lekka, M. Łomzik, F. Suzenet, P. C. Gros, M. Brindell "Inhibition of metastasis by polypyridyl Ru(II) complexes through modification of cancer cell adhesion – *in vitro* functional and molecular studies" *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 15, 10459–10470. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c00580;

[#]obaj autorzy w równym stopniu przyczynili się do powstania tej pracy

- 6) O. Mazuryk, **E. Janczy-Cempa**, J. Łagosz, D. Rutkowska-Zbik, A. Machnicka, A. Krasowska, P. Pietrzyk, G. Stochel, M. Brindell "Relevance of the electron transfer pathway in photodynamic activity of Ru(II) polypyridyl complexes containing 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ligands under normoxic and hypoxic conditions" Dalton Trans. **2022**, 51 1888–1900 doi: 10.1039/d1dt02908h;

Manuskrypty w przygotowaniu

- 1) **E. Janczy-Cempa**, A. Kwiatkowska, O. Mazuryk, N. Chopin, M-A. Hiebel, F. Suzenet, M. Brindell" Bioconjugation of holo-transferrin with hypoxia-enhanced fluorescent sensor for the selective imaging of cancer cells" -wysłana do Sensors and Actuators B: Chemical;

Udział w konferencjach naukowych

- 1) XIV International Symposium on Inorganic Biochemistry, Wrocław, 5-08.09.2018
Ewelina Janczy, Justyna Kuśnierz, Agata Machnicka, Olga Mazuryk, Małgorzata Brindell, “Physicochemical and biological studies of polypyridyl ruthenium complex as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer” (poster)
 - 2) 7th International Symposium on Metallomics, Warszawa, 30.06.2019-3.07.2019
Ewelina Janczy, Olga Mazuryk, Małgorzata Brindell, “Exploring the biological effects of ruthenium(II) polypyridyl complexes in cancer cells” (poster)
 - 3) FRENCH-POLISH WORKSHOP, Kraków, 15-16.11.2019 **Ewelina Janczy-Cempa**, Olga Mazuryk, Małgorzata Brindell, “Applications of ruthenium(II) polypyridyl complexes in chemotherapy and photodynamic therapy” (poster)
 - 4) Ogólnopolska Konferencja Naukowa “Wyzwania i problemy nauk biomedycznych” Lublin, 21.01.2021r, **Ewelina Janczy Cempa**, Olga Mazuryk, Magdalena Konieczny, Magdalena Maciuszek, Franck Suzenet, Małgorzata Brindell, „Selektywne sensory nitroreduktazy jako markery hipoksji” (komunikat)
 - 5) Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej, Toruń, 07-09.09.2021, **Ewelina Janczy Cempa**, Ilona Gurgul, Olga Mazuryk, Małgorzata Brindell, ”Wpływ polipirydylowych kompleksów Ru(II) na właściwości przeciwprzerzutowe w warunkach normoksji i hipoksji” (poster)
 - 6) II Ogólnopolska Studencka Konferencja Naukowa „Blżej Chemii”, Kraków, 08-09.01.2022, **Ewelina Janczy Cempa**, Ilona Gurgul, Olga Mazuryk, Małgorzata Brindell, „Połączenie właściwości cytostatycznych i antymetastatycznych polipirydylowych kompleksów Ru(II). Wpływ niedotlenienia na ich aktywność” (poster)
 - 7) International Symposium on Metal Complexes, Walencja, 5-8.06.2022, **Ewelina Janczy-Cempa**, Olga Mazuryk, Anna Kwiatkowska, Franck Suzenet, Małgorzata Brindell “Targeted delivery of hypoxia-sensitive probe by conjugation with iron-saturated transferrin to exploit the transferrin receptor pathway” (poster)
-

- 8) Chemistry towards Biology 10 – Instruct, Bratysława, 11-14.09.2022, **Ewelina Janczy-Cempa**, Olga Mazuryk, Franck Suzenet, Małgorzata Brindell “Bioconjugation of a fluorescent turn off-on probe to holo-transferrin for the selective delivery and imaging of hypoxic cancer cells” (poster)

Współautorstwo prezentacji konferencyjnych

- 1) 7th International Symposium on Metallomics, Warszawa, 30.06.2019-3.07.2019, Małgorzata Brindell, Olga Mazuryk, Ilona Gurgul, **Ewelina Janczy** “Biological response of lung cancer cells to the polypyridyl ruthenium complexes” (wykład)
- 2) 7th International Symposium on Metallomics, Warszawa, 30.06.2019-3.07.2019, Olga Mazuryk, **Ewelina Janczy**, Justyna Kuśnierz, Franck Suzenet, Grażyna Stochel, Małgorzata Brindell “Ru(II) polypyridyl complexes for photobiological applications” (poster)
- 3) Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej, Toruń, 07-09.09.2021, Małgorzata Brindell, Olga Mazuryk, Ilona Gurgul, **Ewelina Janczy-Cempa**, Przemysław Gajda-Morszewski „Polipirydylowe kompleksy Ru(II) jako związki hamujące tworzenie przerzutów” (wykład)
- 4) Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej, Toruń, 07-09.09.2021, Olga Mazuryk, **Ewelina Janczy-Cempa**, Justyna Kuśnierz, Dorota Rutkowska-Żbik, Grażyna Stochel, Małgorzata Brindell, „Fotobiologiczne właściwości polipirydylowych kompleksów rutenu zawierających 4,7-difenylo-1,10-fenantrolinę” (wykład)
- 5) 44th International Conference on Coordination Chemistry, Rimini, 28.08.2022-2.09.2022, Małgorzata Brindell, Olga Mazuryk, Ilona Gurgul, **Ewelina Janczy-Cempa**, Przemysław Gajda-Morszewski “Ru(II) polypyridyl complexes – potential inhibitors of metastasis development” (wykład)
-

- 6) 44th International Conference on Coordination Chemistry, Rimini, 28.08.2022-2.09.2022, Olga Mazuryk, **Ewelina Janczy-Cempa**, Ilona Gurgul, Dorota Rutkowska-Żbik, Grażyna Stochel, Małgorzata Brindell “Photophysical properties and photobiological activities of polypyridyl ruthenium(II) complexes bearing 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ligands” (poster)
- 7) Chemistry towards Biology 10 – Instruct, Bratysława, 11-14.09.2022, Małgorzata Brindell **Ewelina Janczy-Cempa**, Olga Mazuryk, Franck Suzenet “Design new fluorescent turn off-on probes for hypoxia imaging” (wykład)
- 8) Chemistry towards Biology 10 – Instruct, Bratysława, 11-14.09.2022, Olga Mazuryk, Ilona Gurgul, **Ewelina Janczy-Cempa**, Przemysław Gajda-Morszewski, Małgorzata Brindell “Antimetastatic activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes – in vitro functional and molecular studies” (wykład)

Organizacja konferencji naukowych

- 1) Konferencja międzynarodowa, „French-Polish Workshop ”In Science and Law: Innovation Therapies/Diagnostic Tools – Perspectives and Problems, Hopes and Hypes” Kraków, 15-16.11.2019 , członek komitetu organizacyjnego
 - 2) Konferencja międzynarodowa, „Horyzonty Nauki” Forum Prac Dyplomowych, Kraków, 07-08.06.2021 , członek komitetu organizacyjnego
 - 3) Konferencja krajowa, II Ogólnopolska Studencka Konferencja Naukowa „Blżej Chemii”, Kraków, 08-09.01.2022, członek komitetu organizacyjnego
-