

**STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**  
**pt. „Badania przemian in vitro cytotoksycznych kompleksów złota i rutenu za pomocą**  
**cząsteczkowej spektrometrii mas”**

promotor: dr hab. Inż. Katarzyna Pawlak  
promotor pomocniczy: dr hab. Inż. Magdalena Matczuk

Nowotwór to choroba spowodowana nieprawidłowym wzrostem komórek, która charakteryzuje się największą śmiertelnością na całym świecie. Najczęściej stosowanymi metodami klinicznymi w leczeniu nowotworów są: chemioterapia, radioterapia, chirurgia, hormonoterapia oraz terapia celowana z użyciem leków przeciwnowotworowych. Najczęściej stosowanym cytostatykiem do zwalczania wielu rodzajów raka jest kompleks platyny(II) znany jako cis-platyna. Jednak leczenie nim jest nadal ograniczone przez niepożądane efekty uboczne, takie jak ogólnoustrojowa toksyczność oraz lekooporność. Dlatego poszukuje się nowych, skutecznych i bezpiecznych leków, także w postaci kompleksów różnych metali przejściowych. Obiecujące właściwości cytostatyczne wykryto w przypadku związków miedzi, platyny, rutenu i złota.

Celem pracy było zbadanie przemian wybranych kompleksów złota(I/III) oraz rutenu(III) w roztworze wodnym naśladującym warunki fizjologiczne oraz ich oddziaływań ze składnikami serum krwi i cytozolu komórkowego. Badania realizowano w ramach projektu "Opracowanie metod badania zaburzeń równowagi jonomicznej i ich genezy w komórkach rakowych poddawanych działaniu cytostatyków" finansowanego przez NCN numer 2013/09/B/ST4/00961.

Kompleksy metali przejściowych należą do proleków, które w warunkach fizjologicznych ulegają przemianom prowadzącym do uzyskania aktywnej formy związku. Do badań wybrano kompleksy złota: (1) tetraAtgS-Au<sup>I</sup>-tEP znany jako auranofina, (2) Bipy-Au<sup>III</sup>-ipB (AuBipyC), (3) Bipy-Au<sup>III</sup>-(OH)<sub>2</sub> (AuBipy(OH)<sub>2</sub>), (4) [(2,9-diMe-biPy-Au<sup>III</sup>-O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (AuOXO<sub>6</sub>) i (5) [(2,9-diMe-Phen-Au<sup>III</sup>-O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (Au<sub>2</sub>Phen), gdzie tetraAtgS – tio-2,3,4,6-tetraacetyloglukoza, tEP–trietylofosfina, Bipy – bipyridyny,

ipB – izopropylobenzen, Me – metylo, Phen - fenantrolina. Badano ich trwałość i powinowactwo do glutationu oraz białek transportujących w warunkach naśladujących środowisko krwi i w roztworze serum krwi. Badanie realizowano za pomocą tandemowej spektrometrii mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI-MS/MS) oraz za pomocą chromatografii wykluczania połączonej ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (SEC-ICP-MS). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że kompleksy złota ulegają hydrolizie w stopniu znaczącym w ciągu pierwszych 5 godzin inkubacji. Szybkość hydrolizy zależna jest od struktury związku i zachodzi w kolejności: AuBipyC > Au<sub>2</sub>Phen > AuOXO<sub>6</sub> > AuBipy(OH)<sub>2</sub> > auranofina. Dla każdego z kompleksów zaproponowano także struktury najbardziej prawdopodobnych produktów hydrolizy. Badanie powinowactwa kompleksów złota do białek w serum krwi za pomocą SEC-ICP-MS pokazało, że addukty metalokompleks-białko powstawały z szybkością odwrotną do ich hydrolizy. Zmiany na chromatogramach wskazywały jednak na powinowactwo produktów hydrolizy do białek. Różnice te mogą wskazywać, że oprócz hydrolizy kompleksy złota ulegają także innym przemianom.

Organizm, zarówno w środowisku krwi jak i cytozolu „broni się” przed działaniem silnych utleniaczy odpowiedzialnych za występowanie stresu oksydacyjnego. Dlatego reakcja redukcji jest często wskazywana jako prowadząca do aktywacji metalokompleksu (np. w przypadku kompleksu KP1019 ((HInd)[trans-Ru<sup>III</sup>Cl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>]) - związek, w którym Ru(III) tworzy kompleks z czterema jonami chlorkowymi, a także dwoma indazolowymi i ulega redukcji do Ru(II)). Jest to istotne, ze względu na fakt, że w komórce nowotworowej panują inne warunki utleniająco-redukujące niż w komórce zdrowej. Wpływ środowiska redukującego na trwałość kompleksu zbadano dla auranofiny, Au<sup>III</sup>BipyC oraz KP1019 (w celu zweryfikowania metody) w symulowanych warunkach fizjologicznych i przy zmiennym potencjale utleniania i redukcji. Do tego celu zastosowano elektrochemiczną komorę reakcyjną Roxy (ECR) w połączeniu z detekcją ESI-MS, w porównaniu do woltamperometrii fali prostokątnej (było to pierwsze zastosowanie tej techniki w przypadku kompleksów metali). Stwierdzono, że kompleksy takie jak auranofina i KP1019 ulegają nieodwracalnemu utlenianiu. W przypadku redukcji dochodziło do zmiany stopnia utlenienia metalu z Au(III) i Ru(III) na Au(I) i Ru(II). Zmianie stopnia utlenienia towarzyszyła utrata lub wymiana ligandu. Potencjał redukujący wspierał także proces odłączania i wymiany ligandu w przypadku auranofiny i powstawania Au(tEP)<sub>2</sub> oraz tetraAtgS-Au-L, gdzie L to ligand będący



składnikiem krwi czy cytozolu komórkowego. Połączenie komory elektrochemicznej z ESI-MS/MS pozwoliło na potwierdzenie redukcji rutenu w kompleksie KP1019 i wskazać podobną zmianę aktywującą w przypadku kompleksu złota(III), a także wskazać  $\text{Au}(\text{tEP})_2$  jako najbardziej prawdopodobną aktywną pochodną auranofiny.

Zbadano powinowactwo kompleksu KP1019 do składników cytozolu komórek raka jelita grubego (HT-29) oraz wpływ auranofiny na skład proteomu i metabolomu komórek raka płuc (A-549) w porównaniu do komórek prawidłowych (MRC-5). W przypadku auranofiny zakłada się aktywację szlaku mitochondrialnego prowadzącego do apoptozy komórkowej. W celu zbadania tej hipotezy przeprowadzono badania oddzielonych poprzez ultrafiltrację związków wielkocząsteczkowych i małowcząsteczkowych za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz oraz elektroforezy kapilarnej, sprzężonych ze spektrometrią mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie RPLC-ESI-MS/MS i CE-ESI-MS/MS.

Stwierdzono, że skład metabolomu komórek rakowych (A-549) jest mniej zróżnicowany i zawiera zwiększone ilości kwasów organicznych. W przypadku obu rodzajów komórek obecność auranofiny w komórce zmniejsza zawartości metabolitów (na skutek odpowiedzi komórkowej i/lub powstawania adduktów). Wskazano związki wykazujące powinowactwo do auranofiny jak allantoina, dihydrouacyl i asymetryczna dimetyloarginina.

We frakcji zawierającej związki wielkocząsteczkowe, poprzez analizę LC-MS peptydów trypsynowych, wykryto 12 różnych białek w komórkach HT-29 wykazujących powinowactwo do kompleksu KP1019. Były to białka odnowy DNA i hamowania apoptozy. W przypadku komórek płuc, znaczące zmiany zawartości, na skutek obecności auranofiny, zaobserwowano dla białek związanych z organizacją cytoszkieletu komórkowego oraz z programowaną śmiercią komórki.

Otrzymane wyniki potwierdziły, że auranofina jak i KP1019 ulegają aktywacji w organizmie ludzkim poprzez hydrolizę lub redukcję oraz indukują apoptozę komórek poprzez szlak mitochondrialny.

Techniki rozdzielania oraz komora elektrochemiczna połączone z atomową i cząsteczkową spektrometrią mas stanowią skuteczny zestaw narzędzi do badania przemian metalokompleksów, o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych, w serum i cytozolu komórkowym.

Kupiec Monika