



**WYDZIAŁ  
BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**



Uniwersytet  
**ŁÓDZKI**

**UNIwersytet ŁÓDZKI**

**WYDZIAŁ BIOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA**

**STACJONARNE STUDIA DOKTORANCKIE BIOCHEMICZNO-  
BIOFIZYCZNE**

**PAWEŁ HIKISZ**

**MOLEKULARNE MECHANIZMY  
AKTYWNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ  
NOWYCH POCHODNYCH  
METALOORGANICZNYCH**

**PRACA DOKTORSKA**

**WYKONANA POD KIERUNKIEM**

**PROF. DR HAB. ANETY KOCEVA-CHYŁY**

**W KATEDRZE BIOFIZYKI MEDYCZNEJ**

**UNIwersytetu ŁÓDZKIEGO**

**Łódź, 2016**

*Składam serdeczne podziękowania*

*Promotorowi niniejszej rozprawy*

***Pani Prof. dr hab. Anecie Kocevie-Chyle,***

*za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki,*

*poświęcony czas i wyrozumiałość*

*w trakcie realizacji niniejszej pracy.*

*Dziękuję Pracownikom i Doktorantom Katedry Biofizyki Medycznej  
Uniwersytetu Łódzkiego za pomoc, życzliwość i przyjazną atmosferę pracy.*

*Specjalne podziękowania składam również:*

***dr hab. Konradowi Kowalskiemu, prof. nadzw. UŁ z Katedry Chemii  
Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego***

*za udostępnienie pochodnych metaloorganicznych, co i umożliwiło mi  
wykonania niniejszej pracy doktorskiej.*

*oraz*

*Moim Najbliższym*

*za wiarę we mnie, wsparcie, wyrozumiałość, pomoc*

*i uśmiech w trudnych chwilach.*

# SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów i symboli	7
<b>WPROWADZENIE</b>	10
<b>I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA</b>	
1. Historia odkrycia ferrocenów	14
2. Struktura chemiczna i właściwości ferrocenu	15
3. Właściwości biologiczne ferrocenylowych pochodnych i ich zastosowanie	18
4. Ferrocenylove pochodne jako czynniki cytotoksyczne	19
4.1. Ferrocenylove pochodne organicznych chemioterapeutyków	20
4.2. Ferrocenylove pochodne fenoli	22
4.3. Ferrocenylove pochodne flawonoidów	23
4.4. Ferrocenylove pochodne związków naturalnych	23
4.5. Ferrocenylove pochodne peptydów	24
4.6. Ferrocenylove pochodne zasad azotowych	25
4.7. Supermolekularne systemy transportu leków	26
4.7.1. Cyklodekstryna	26
4.7.2. Poliaspartamid	27
4.7.3. Polimery micelarne	27
5. Kompleksy heterobimetaliczne: ferrocen jako ligand	28
5.1. Kompleksy rutenu zawierające grupy ferrocenylove	28
5.2. Kompleksy złota zawierające ferrocen	29
6. Ferrocenylove pochodne w leczeniu malarii	30
6.1. Struktura cząsteczki FQ	31
6.2. Mechanizm aktywności FQ	32
7. Antybakteryjne właściwości ferrocenylowych pochodnych	34
<b>II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA</b>	
8. <b>CEL PRACY</b>	39
9. <b>MATERIAŁY</b>	
9.1. Odczynniki chemiczne	39
9.1.1. Odczynniki do hodowli komórek:	39
9.1.2. Komercyjne zestawy odczynników:	39
9.1.3. Barwniki i sondy fluorescencyjne:	39
9.1.4. Pozostałe odczynniki:	40
9.2. Sprzęt	40
9.3. Aparatura	41
9.4. Badane związki metaloorganiczne	41
9.5. Linie komórkowe	42
9.5.1. Charakterystyka linii MCF-7 (ATCC® HTB-22™)	44

9.5.2. Charakterystyka linii MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)	45
9.5.3. Charakterystyka linii HepG2 (ATCC® HB-8065™)	45
9.5.4. Charakterystyka linii A549 (ATCC® CCL-185™) komórek nabłonkopodobnych ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca	45
9.5.5. Charakterystyka linii CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™)	46
<b>10. METODY</b>	<b>46</b>
10.1. Hodowla komórkowa	46
10.2. Pasażowanie komórek	46
10.2.1. Pasażowanie komórek adherentnych	46
10.2.2. Pasażowanie komórek zawieszinowych	46
10.3. Ocena żywotności komórek	47
10.4. Inkubacja komórek z badanymi związkami	47
10.5. OCENA WŁAŚCIWOŚCI CYTOTOKSYCZNYCH	47
10.5.1. Oznaczenie żywotności komórek metabolicznym mikroplótkowym testem spektrofotometrycznym z MTT	47
10.6. OCENA WŁAŚCIWOŚCI ANTYPROLIFERACYJNYCH	49
10.6.1. Właściwości cytostatyczne	49
10.6.2. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometryczną	49
10.7. OCENA WŁAŚCIWOŚCI PROOKSYDACYJNYCH	50
10.7.1. Określenie poziomu reaktywnych form tlenu (metoda z H <sub>2</sub> DCFDA)	50
10.7.2. Określenie poziomu reaktywnych form tlenu (metoda z dihydroetydyną)	50
10.7.3. Ocena udziału reaktywnych form tlenu w cytotoksyczności badanych związków metaloorganicznych	51
10.8. OCENA WŁAŚCIWOŚCI PRO-APOPTOTYCZNYCH	51
10.8.1. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej (podwójne barwienie komórek fluorescencyjnymi barwnikami Hoechst 33258 i jodkiem propidyny)	51
10.8.2. Analiza zmian transbłonowego potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi_m$ ) (metoda z JC-1)	52
10.8.3. Ocena aktywności kaspazy -8, -9, -3	53
10.9. ANALIZA ZDOLNOŚCI BADANYCH ZWIĄZKÓW METALOORGANICZNYCH DO INDUKOWANIA PROCESU AUTOFAGII	55
10.10. OCENA WŁAŚCIWOŚCI GENOTOKSYCZNYCH	55

10.10.1. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową (elektroforeza pojedynczej komórki)	55
10.11. OCENA WŁAŚCIWOŚCI BŁONY KOMÓRKOWEJ	56
10.11.1. Zmiany płynności błony plazmatycznej (pomiar anizotropii fluorescencji TMA-DPH i DAUDA)	56
10.12. ANALIZA AKTYWNOŚCI REDUKTAZY TIOREDOKSYNY (TEST KOLORYMETRYCZNY)	57
10.13. ANALIZA STATYSTYCZNA	58
<b>11. WYNIKI</b>	59
11.1. AKRYLOILOFERROCENY (POCHODNE KWASU AKROLEINOWEGO) ORAZ AZAFERROCENY	59
11.1.1. Cytotoksyczność pochodnych ferrocenyłowych	59
11.1.2. Udział reaktywnych form tlenu (RFT) w aktywności cytotoksycznej pochodnych ferrocenyłowych	62
11.1.3. Cytostatyczna aktywność pochodnych ferrocenyłowych	62
11.1.4. Poziom reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych eksponowanych na działanie badanych metaloorganicznych pochodnych	65
11.1.5. Wpływ metaloorganicznych pochodnych na potencjał mitochondrialny	74
11.1.6. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową	79
11.1.7. Zmiany płynności błony plazmatycznej wywołane przez metaloorganiczne pochodne	81
11.2. FLAWONOIDOWE POCHODNE FERROCENYŁOWE	83
11.2.1. Cytotoksyczność pochodnych ferrocenyłowych	83
11.2.2. Analiza morfologiczna; identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem podwójnego barwienia komórek barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst 33258 i jodkiem propidyny (PI)	86
11.3. POCHODNE FERROCENYŁOWE ZAWIERAJĄCE KOBALT	88
11.3.1. Cytotoksyczność pochodnych ferrocenyłowych	88
11.3.2. Udział reaktywnych form tlenu (ROS) w aktywności cytotoksycznej pochodnych ferrocenyłowych	91
11.3.3. Cytostatyczność pochodnych ferrocenyłowych	92
11.3.4. Poziom reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych eksponowanych na działanie badanych metaloorganicznych pochodnych	95
12.3.5. Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą mikroskopii	98

	fluorescencyjnej z zastosowaniem podwójnego barwienia komórek barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst 33258 i jodkiem propidyny (PI)	
11.3.6.	Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej	104
12.3.7.	Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową	108
11.4.	<b>METALOORGANICZNE POCHODNE ALKILOWE ZAWIERAJĄCE PIERŚCIEŃ CHROMONOWY ORAZ ATOM ZŁOTA</b>	110
11.4.1.	Cytotoksyczność pochodnych ferrocenylowych	110
11.4.2.	Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową	113
11.4.3.	Analiza aktywności reduktazy tioredoksyny (TrxR)	116
11.4.4.	Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej	117
11.4.5.	Zmiany aktywności kaspaz 8, 9 i 3	122
11.5.	<b>POCHODNA DIRUTENU-1 (DIRU-1)</b>	125
11.5.1.	Cytotoksyczność pochodnej dirutenu-1	125
11.5.2.	Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem podwójnego barwienia komórek barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst 33258 i jodkiem propidyny (PI)	127
11.5.3.	Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej	133
11.5.4.	Wpływ metaloorganicznej pochodnej na potencjał mitochondrialny	135
11.5.5.	Zmiany aktywności kaspaz 8, 9 i 3	137
11.5.6.	Poziom reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych eksponowanych na działanie badanej metaloorganicznej pochodnej DiRu-1	139
11.5.7.	Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową	147
12.	<b>DYSKUSJA</b>	150
13.	<b>WNIOSKI</b>	176
14.	<b>STRESZCZENIE</b>	177
15.	<b>SUMMARY</b>	179
17.	<b>LITERATURA</b>	181

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI:

<b>A549</b>	linia komórkowa gruczolakoraka płuc ( <i>ang. lung adenocarcinoma</i> )
<b>ACT</b>	artemizyna ( <i>ang. artemisin</i> )
<b>Agaroza LMP</b>	agaroza o niskim punkcie topnienia ( <i>ang. low melting point agarose</i> )
<b>Agaroza NMP</b>	agaroza o normalnym punkcie topnienia ( <i>ang. normal melting point agarose</i> )
<b>ATP</b>	adenozynotrifosforan ( <i>ang. Adenosine triphosphate</i> )
<b>Bak</b>	białko proapoptotyczne należące do rodziny białek Bcl-2 ( <i>ang. Bcl-2 homologous antagonist killer</i> )
<b>Bax</b>	białko proapoptotyczne należące do rodziny białek Bcl-2 ( <i>ang. Bcl-2-associated X protein</i> )
<b>Bcl-2</b>	produkt protoonkogenu Bcl-2, wykryty w białaczkach i chłoniakach wywodzących się z limfocytów B; rodzina białek Bcl-2 ( <i>ang. B-Cell Leukemia/lymphoma-2</i> )
<b>CCCP</b>	karbonylo-cyjano-m-chlorofenylohydrazon ( <i>ang. carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone</i> )
<b>CCRF-CEM</b>	linia komórkowa ostrej białaczki limfoblastycznej ( <i>ang. acute lymphoblastic leukaemia A</i> )
<b>CD</b>	cyklodekstryna ( <i>ang. cyclodextrin</i> )
<b>Cp</b>	pierścień cyklopentadienylowe
<b>CQ</b>	chlorochina ( <i>ang. chloroquine</i> )
<b>DAPI</b>	dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenyloindolu ( <i>ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i> )
<b>DAUDA</b>	sonda fluorescencyjna do pomiaru płynności błon ( <i>ang. 11-(Dansylamino) undecanoic acid</i> ,
<b>DHE</b>	dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny ( <i>ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i> ,
<b>DiRu-1</b>	pochodna metaloorganiczna diruten-1 ( <i>ang. diruthenium-1</i> )
<b>DMEM</b>	medium wzrostowe ( <i>ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ,
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek ( <i>ang. dimethylsulfoxide</i> )
<b>DNA</b>	kwas deoksyrybonukleinowy ( <i>ang. deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DNTB</b>	kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy ( <i>ang. 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid</i> )
<b>EAT</b>	rak wysiękowy Ehrlicha ( <i>ang. Ehrlich ascites tumor</i> )
<b>EDTA</b>	kwas etylenodiaminotetraoctowy ( <i>ang. Ethylenediamine-tetraacetic acid</i> )
<b>ER<math>\alpha</math></b>	receptor dla estrogenu ( <i>ang. Estrogen Receptor</i> )
<b>Fc</b>	ferrocen
<b>Fe</b>	Żelazo ( <i>ang. iron</i> )
<b>FQ</b>	ferrochina ( <i>ang. ferroquine</i> )

<b>H<sub>2</sub>DCF-DA</b>	diocjan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny ( <i>ang. 2',7'-dichloro-dihydro fluorescein diacetate</i> )
<b>HBSS</b>	zbuforowany roztwór Hanksa ( <i>ang. <b>H</b>ank's <b>B</b>uffered <b>S</b>alt <b>S</b>olution</i> )
<b>HepG2</b>	linia komórkowa nowotworu wątrobowo-komórkowego ( <i>ang. hepatocellular carcinoma</i> )
<b>HIV</b>	ludzki wirus niedoboru odporności ( <i>ang. <b>H</b>uman <b>I</b>mmunodeficiency <b>V</b>irus</i> )
<b>Hoechst 33258</b>	hydrat dichlorowodoru 2'-(4-hydroksyfenylo)-5-(4-metylo-1-piperazylo)-2,5'-bi-1 H-benzimidazolu ( <i>ang. 2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride hydrate, bisBenzimide</i> )
<b>IC<sub>50</sub></b>	stężenie związku, powodujące spadek odsetka żywych komórek w hodowli in vitro o 50% w porównaniu z kontrolą tzw. miara cytotoksyczności ( <i>ang. half maximal inhibitory concentration</i> )
<b>IC<sub>90</sub></b>	stężenie związku, powodujące spadek odsetka żywych komórek w hodowli in vitro o 90% w porównaniu z kontrolą tzw. miara cytotoksyczności ( <i>ang. 90% of maximal inhibitory concentration</i> )
<b>IG<sub>50</sub></b>	stężenie związku, inhibujące proliferację komórek in vitro o 50% w porównaniu z kontrolą tzw. miara cytostatyczności ( <i>ang. 50% of maximal inhibition of cell proliferation</i> )
<b>IGFBP</b>	białko wiążące insulino podobny czynnik wzrostu ( <i>ang. <b>I</b>nsulin-like <b>G</b>rowth <b>F</b>actor-<b>B</b>inding <b>P</b>rotein,</i>
<b>JC-1</b>	jodek 5, 5',6, 6'-tetrachloro-1,1',3, 3'-tetraetylobenzimidazokarbocyjaniny ( <i>ang. 5, 5',6, 6'-tetrachloro - 1,1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolcarbo- cyanine iodide</i> )
<b>MCF-7</b>	linia komórkowa estrogenozależnego gruczolakoraka piersi ( <i>ang. adenocarcinoma estrogen-responsive</i> )
<b>MDA-MB-231</b>	linia komórkowa potrójnie ujemnego gruczolakoraka piersi ( <i>ang. triple negative breast adenocarcinoma</i> )
<b>MIC</b>	minimalne stężenie hamujące ( <i>ang. minimal inhibitory concentration</i> )
<b>MTT</b>	Bromek 3-(4,5-dimetylotriazo-2-yl)-2,5-difenylotetrazolu ( <i>ang. methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i> )
<b>NAC</b>	N-acetylocysteina ( <i>ang. n-acetylcysteine</i> )
<b>NADPH</b>	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy ( <i>ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide <b>P</b>hosphate,</i>
<b>p53</b>	białko kodowane przez gen supresorowy TP53 ( <i>ang. tumor protein p53</i> )
<b>PBS</b>	zbuforowany roztwór soli fizjologicznej ( <i>ang. <b>P</b>hosphate <b>B</b>uffered <b>S</b>aline,</i>
<b>PCD</b>	programowana śmierć komórki ( <i>ang. programmed cell death</i> )



<b>PI</b>	jodek propidyny ( <i>ang. propidium iodide</i> )
<b>RFT</b>	reaktywne formy tlenu
<b>RPMI</b>	medium wzrostowe ( <i>ang. Roswell Park Memorial Institute medium</i> )
<b>SAR</b>	zależność struktura-aktywność związków chemicznych ( <i>ang. structure–activity relationship</i> )
<b>SCGE</b>	elektroforeza pojedynczej komórki ( <i>ang. single cell gel electrophoresis</i> )
<b>SERM</b>	selektywny modulator receptora estrogenowego ( <i>ang. Selective estrogen receptor modulator</i> )
<b>TMA-DPH</b>	sonda fluorescencyjna do pomiaru płynności błon ( <i>ang. 1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatriene p-Toluenesulfonate</i> )
<b>TNB</b>	kwask tionitrobenzoesowy ( <i>ang. thio-nitro-benzoic-acid</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	czynnik martwicy nowotworów ( <i>ang. tumor necrosis factor</i> )
<b>Trolox</b>	rozpuszczalna w wodzie pochodna witaminy E
<b>TrxR</b>	reduktaza tioredoksyny ( <i>ang. thioredoxin reductase</i> )
<b>WHO</b>	Światowa Organizacja Zdrowia ( <i>ang. World Health Organization</i> )
<b>Wit. C</b>	witamina C ( <i>ang. vitamin C</i> )
<b>Z-FA-FMK</b>	inhibitor proteaz cysteinowych ( <i>ang. benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-alanyl-fluoromethyl ketone</i> ),
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	transbłonowy potencjał błony mitochondrialnej ( <i>ang. transmembrane mitochondria potential</i> )

## WPROWADZENIE

Nowotwory, po chorobach układu krążenia stanowią drugą najczęstszą przyczynę zgonów w krajach rozwiniętych na świecie. Miano niechlubnego i niezwykle efektywnego „zabójcy” nieodłącznie przypisywane jest chorobom nowotworowym, pomimo niezwykle dużej ilości badań prowadzonych w zakresie onkoterapii oraz dynamicznego rozwoju nowatorskich metod diagnostycznych i terapeutycznych. Liczba zgonów z powodu nowotworów wzrasta głównie na skutek rosnącej tendencji starzenia się społeczeństw, niskiej jakości środowiska, związanej z dużym jego zanieczyszczeniem, jak również niezdrowego trybu życia, wynikającego m.in. ze złej jakości pokarmów dostarczanych w codziennej diecie czy też z dużą ilością stresu i związanych z nim zaburzeniami zdrowia psychicznego (Jemal i wsp., 2011; Siegel i wsp., 2015).

Problematyka chorób nowotworowych zajmuje więc istotne miejsce w codziennej medycynie doświadczalnej, jak i w wielu pracach naukowych (Anisomov i wsp., 2009; Hajdu i wsp., 2011; Cancer Facts & Figures 2015). Liczne dane literaturowe oraz szeroko dostępna wiedza w zakresie prewencji i diagnostyki chorób nowotworowych wskazują, iż głównymi czynnikami ryzyka są określone czynniki środowiskowe oraz predyspozycje genetyczne. Nowotwory określane są jako choroby genów, gdyż bardzo często powiązane są z mutacjami genów kodujących kluczowe dla zachowania homeostazy ustrojowej białka. Dysfunkcja genów prowadzi do zaburzeń funkcjonowania niezwykle skomplikowanych procesów molekularnych, na skutek czego dochodzi do inicjacji procesu nowotworzenia. Niezwykle istotną rolę odgrywa również genetyczne dziedziczenie predyspozycji do zachorowania na nowotwory. Związane ono jest z mutacjami genetycznymi, np. zaburzenia w funkcjonowaniu genów *BRCA1* i *BRCA2* korespondują z wysokim ryzykiem zachorowania na raka gruczołu sutkowego. Dietetycy oraz lekarze zwracają uwagę na nowotwory układu pokarmowego (jelita grubego, żołądka czy wątroby), które związane są ze złą jakością codziennej diety i niezdrowym trybem życia, utożsamianym ze stresem, paleniem papierosów oraz nadużywaniem alkoholu. Istotnym czynnikiem związanym z ryzykiem rozwoju nowotworów jest również wiek. Chociaż możliwe jest, aby choroba nowotworowa pojawiła się w dowolnym okresie życia, statystyki jednoznacznie wskazują, iż znaczna większość pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem jest w wieku powyżej 65 lat.

W Polsce, jak również w wielu innych krajach, wysoki odsetek zachorowalności na nowotwory złośliwe połączony jest z wysoką śmiertelnością. Choroby nowotworowe stanowią drugą, po chorobach układu krążenia, przyczynę śmiertelności, powodując w Polsce średnio ok. 96 tyś. zgonów (25% całkowitej śmiertelności w Polsce). W ostatnich raportach Światowej Organizacji Zdrowia prognozuje się, że całkowita liczba zachorowań i zgonów na nowotwory złośliwe będzie systematycznie rosła zarówno wśród kobiet, jak i mężczyzn. Uważa się, że nowotwory w nadchodzących latach, staną się pierwszą przyczyną śmiertelności osób poniżej 65 roku życia. Zwraca się również uwagę na niską efektywność leczenia, którą odzwierciedla wskaźnik 5-letniego przeżycia oraz na zbyt późną wykrywalność w Polsce, który w porównaniu ze średnimi wartościami krajów Unii Europejskiej jest niższy o ok. 15%. Dane literaturowe z 2011 roku wskazują, że województwo łódzkie plasowało się na jednym z pierwszych miejsc w Polsce, zarówno pod

względem współczynnika zachorowań na nowotwory złośliwe w przeliczeniu na 100 tys. mieszkańców, jak i współczynnika zgonów.

W skali kraju, dla płci męskiej największy odsetek zachorowalności na nowotwory złośliwe odnotowano dla raka płuc (20%), raka gruczołu krokowego (14%) oraz raka jelita grubego (12%). W dalszej kolejności występowały nowotwory pęcherza moczowego (7%) i żołądka (5%). U kobiet najczęściej stwierdzano nowotwór złośliwy piersi (23%), jelita grubego (10%), płuca (9%). Zarówno u mężczyzn, jak i kobiet największy odsetek zgonów obserwowano w przypadku nowotworu płuc, stanowiący odpowiednio 30% i 15% (Potrykowska i wsp., 2014; Obecny stan zwalczania nowotworów w Polsce, 2014; Jędrzejewski i wsp., 2015).

Mimo zauważalnego postępu w leczeniu nowotworów oraz wprowadzania do klinik nowych chemioterapeutyków, współczesna medycyna ciągle boryka się z problemem w pełni skutecznej chemioterapii. Istnieje więc silna potrzeba lepszego wykorzystania posiadanej wiedzy w zakresie opracowania i syntezy nowych, potencjalnych chemioterapeutyków, które charakteryzować się będą odpowiednią skutecznością oraz selektywnością i specyficznością działania na komórki nowotworowe.

Problemy dużej cytotoksyczności ogólnoustrojowej stosowanych dotychczas leków przeciwnowotworowych oraz rozwój oporności wielolekowej przez komórki rakowe stanowią niezwykle istotne czynniki limitujące pełne wykorzystanie dostępnej chemioterapii. W rezultacie pacjenci często otrzymują zbyt niskie dawki chemioterapeutyku, aby uzyskać pożądaną odpowiedź komórek nowotworowych na jego działanie (Okon i Zou, 2015; Holohan i wsp., 2013).

Konieczność poszukiwania nowych związków o efektywnym przeciwnowotworowym działaniu i wysokiej selektywności względem komórek rakowych oraz niskiej toksyczności wobec komórek prawidłowych, sprzyja testowaniu wielu różnorodnych chemicznie i strukturalnie związków. W ostatnim czasie znacznie wzrosło zainteresowanie związkami metaloorganicznymi jako potencjalnymi farmaceutykami, które z powodzeniem mogłyby znaleźć zastosowanie zarówno w diagnostyce jak i w chemioterapii, a nowatorska dziedzina nauki zajmująca się tymi związkami, jaką jest chemia biometaloorganiczna, staje się atrakcyjną gałęzią medycyny (Rafique i wsp., 2010; Gasser i Metzler-Nolte, 2012; Gasser i wsp., 2011; Fouda i wsp., 2007). Bez wątpienia, punktem zwrotnym dla rozwoju badań nad metaloorganicznymi kompleksami było odkrycie cisplatyny w XX wieku, która stosowana jest w leczeniu szeregu typów nowotworów – płuc, jajnika, szyi czy głowy (Galluzzi i wsp., 2012). Jej efektywna, biologiczna aktywność przeciwnowotworowa połączona jest niestety z wysoką cytotoksycznością ogólnoustrojową, objawiającą się przede wszystkim mielosupresją oraz nefro- i hepatotoksycznością, co stanowi poważny czynnik limitujący szerokie stosowania tego leku (Yang i wsp., 2014; Zhu i wsp., 2015).

Ciągle nierozwiązany problem niskiej specyficzności działania cisplatyny, oraz jej pochodnych, stał się silnym impulsem dla zwiększenia ilości i zakresu badań nad nowymi metaloorganicznymi pochodnymi o atrakcyjnych właściwościach przeciwnowotworowych oraz względnie niskiej toksyczności ogólnoustrojowej. Liczne publikacje, pojawiające się w ostatnich latach, wskazują, że synteza nowych kompleksów metaloorganicznych, wykazujących różnorodne molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej

(i nie tylko) jest możliwa do przeprowadzenia, a jej efekty wydają się mocno obiecujące (Ott i Gust, 2007; Ornelas, 2011; Braga i Silva, 2013).

Wiele różnorodnych związków metaloorganicznych zostało zbadanych pod kątem aktywności przeciwnowotworowych oraz potencjalnego zastosowania, jako chemioterapeutyków, dotychczas jednak tylko niewielka ich część trafiła do badań klinicznych. Warto jednak wspomnieć, iż w niedalekiej przyszłości badania te mogą przyczynić się do pojawienia nowych leków, stosowanych z powodzeniem w nowoczesnej chemioterapii. Duże nadzieje pokłada się w związkach metaloorganicznych zawierających w swej strukturze ruten, złoto oraz gal (Abu-Surrah i Kettunen, 2006; Jungwirth i wsp., 2011).

Poszukiwanie nowych związków o szerokiej aktywności przeciwnowotworowej, przy jednocześnie niskiej cytotoksyczności względem komórek prawidłowych pozostaje ciągle największym priorytetem i wyzwaniem w obszarze walki z nowotworami. Mimo dynamicznie rozwijającej się chemii biometaloorganicznej, licznych syntez nowych związków, w dostępnym piśmiennictwie naukowym ciągle niewiele jest informacji na temat molekularnych mechanizmów ich biologicznej aktywności. Zagadnienie to stało się przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej, której głównym celem badawczym, była analiza właściwości przeciwnowotworowych nowych pochodnych metaloorganicznych, określanych jako kompleksy kanapkowe – ferrocenów oraz ich pochodnych. W badaniach skupiono się głównie na właściwościach cytotoksycznych, cytostatycznych, apoptogennych, prooksydacyjnych i genotoksycznych tych związków.

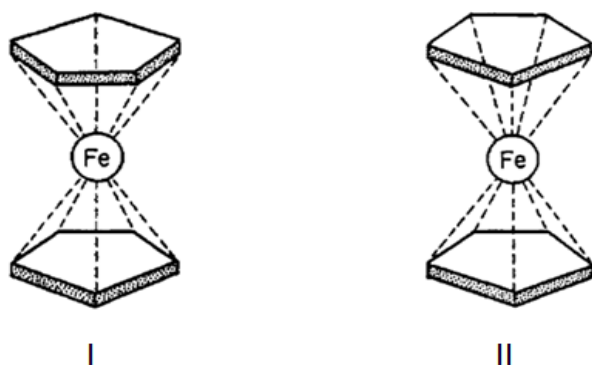
## **I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA**

## 1. Historia odkrycia ferrocenów

Czy nie jest ironią fakt, że ten sam pierwiastek chemiczny jest jednocześnie wykorzystywany jako główny składnik i materiał budulcowy sprzętu militarnego oraz jako substancja o atrakcyjnych właściwościach biologicznych, realizowanych na wielu płaszczyznach aktywności molekularnej? Taki dualizm funkcjonalny charakterystyczny jest dla cząsteczki di( $\eta^5$ -cyklopentadienyl) żelaza (II), określanej zwyczajowo, jako ferrocen. Pomimo, iż od odkrycia struktury ferrocenu minęło ponad pół wieku (65 lat) cieszy się on wciąż dużą popularnością wśród naukowców – zarówno inżynierów, jak i biologów, a jego atrakcyjność koreluje m.in. z niezwyklejmi właściwościami chemicznymi oraz nietypową strukturą elektronową. Odkrycie struktury ferrocenu okazało się krokiem kluczowym dla rozwoju chemii i spowodowało powstanie nowej dziedziny nauki określanej jako chemia metaloorganiczna, której przedmiotem badań stanowią związki metali. W literaturze naukowej substancje o takiej strukturze określane są jako związki sandwichowe (kanapkowe) lub inaczej – metalloceny. Dla uporządkowania nomenklatury warto zaznaczyć, iż terminy te stosowane są nie tylko dla pochodnych ferrocenyłowych ale i dla wszystkich związków metaloorganicznych (Astruc 2007; Ornelas, 2011; Neuse, 2005).

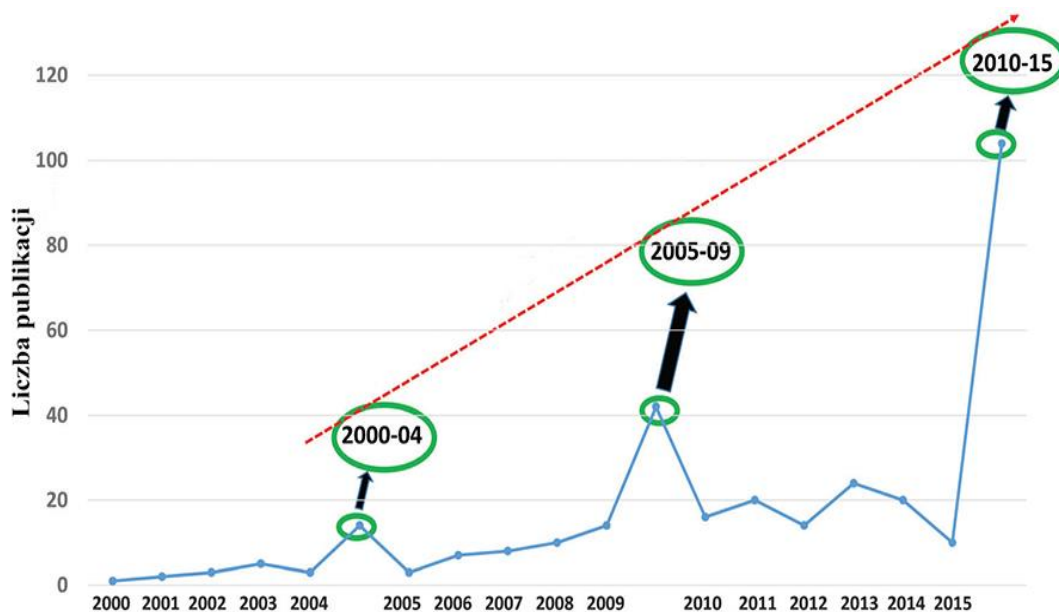
Ferrocen [di( $\eta^5$ -cyklopentadienyl) żelaza (II)] został odkryty w roku 1951 przez dwa niezależne zespoły badawcze (Kealy i Pauso, 1951; Miller i wsp., 1952). Wynalezienie związku – jak to często ma miejsce w nauce – było dziełem mocno przypadkowym. Kealy i Pauson próbowali otrzymać aromatyczne związki określane, jako fulwaleny. Jedną z kluczowych reakcji na szlaku ich syntezy jest oksydacyjne przekształcenie aromatycznego pierścienia cyklopentadienylowego do rodnika  $C_5H_5^{\cdot}$ . W wyniku reakcji  $C_5H_5^{\cdot}$  z  $FeCl_3$  otrzymano ferrocen. W tym samym okresie, w laboratorium profesora S. Millera otrzymano cząsteczkę ferrocenu w wyniku reakcji, prowadzących do uzyskania amin z nasyconych i nienasyconych węglowodorów oraz azotu. Otrzymanie metaloorganicznej cząsteczki żelaza było dla naukowców obu zespołów dużym zaskoczeniem.

Mimo uzyskania kryształów ferrocenów i znajomości reakcji jego syntezy, dużym problemem okazało się odkrycie prawidłowej struktury cząsteczki. Zarówno Kealy i Pauson (1951) jak i Miller i wsp. (1952) nie potrafili określić budowy przestrzennej ferrocenu. W 1952 roku Wilkinson i wsp. (1952) w swoich rozważaniach na łamach *Journal of the American Chemical Society* zaproponowali układ chemiczny, występujący pomiędzy atomem żelaza oraz dwoma pierścieniami cyklopentadienylowymi (Rys. 1). W dalszych badaniach, przy zastosowaniu krystalografii rentgenowskiej, udało się określić charakterystyczne równoległe ułożenie pięciowęglowych pierścieni aromatycznych, które otaczają centralnie położony atom żelaza. Ostatecznie, w 1973 roku, Fischer i Wilkinson zostali uhonorowani nagrodą Nobla w dziedzinie chemii za swoje pionierskie badania nad metallocenami. Ich prace doświadczałne, związane ze związkami metaloorganicznymi, zrewolucjonizowały podejście naukowe zarówno do chemii metaloorganicznej, jak i chemii nieorganicznej. (Werner, 2015).



**Rysunek 1.** Struktura przestrzenna ferrocenu zaproponowany przez Wilkinson'a, i wsp. (1952). Konformacja D5d (I) oraz D5h (II).

Od chwili odkrycia ferrocenów i pierwszych publikacji poświęconych tematyce metaloocenów, zainteresowanie ferrocenyłowymi koniugatami stale rośnie ze względu na interesujące i obiecujące właściwości chemiczne, fizyczne i biologiczne. Związki żelaza znajdują coraz większe zastosowanie w chemii przemysłowej, materiałowej i medycznej. Z roku na rok pojawia się coraz większa liczba publikacji na temat ferrocenów, ich właściwości, zastosowania oraz potencjalnych molekularnych mechanizmów ich aktywności biologicznej (Rys. 2).



**Rysunek 2.** Liczba publikacji, dotycząca żelaza i pochodnych ferrocenyłowych w latach 2000-2015 (Wani i wsp., 2016; zmodyfikowano).

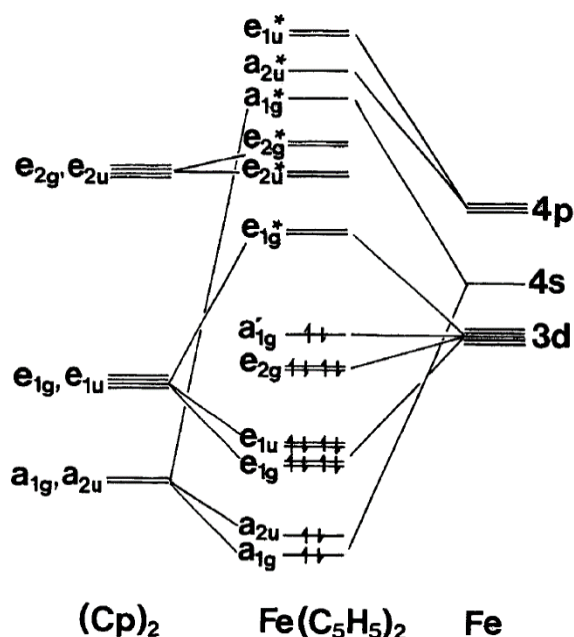
## 2. Struktura chemiczna i właściwości ferrocenu

Jak wspomniano wcześniej, burzliwy i dynamiczny rozwój chemii metaloorganicznej przypada na początek drugiej połowy XX wieku, kiedy to udało się w syntezach chemicznych otrzymać ferrocen oraz opisać jego strukturę chemiczną. Odkrycie tej cząsteczki okazało się milowym krokiem dla rozwoju chemii, a sam ferrocen

uważany jest za głównego przedstawiciela całej, złożonej grupy metalocenów. Aby więc omówić budowę strukturalną ferrocenów warto przybliżyć nieco definicję metalocenów. Są to metaloorganiczne substancje, należące do związków koordynacyjnych, które w swej strukturze zawierają centralnie ułożony atom metalu, połączony wiązaniami  $\pi$  z każdym atomem węgla dwóch pierścieni cyklopentadienylowych (Cp). Charakterystyczne, równoległe ułożenie w przestrzeni wspomnianych dwóch pięciowęglowych pierścieni oraz znajdującego się pomiędzy nimi atomu metalu przejściowego nadają całości cząsteczki strukturę symetryczną, która określana jest również jako kanapkowa (ang. *sandwich*) [MCp<sub>2</sub>].

Ferrocen może występować w dwóch izoenergetycznych konformacjach: naprzeciwległą (symetria D<sub>5h</sub>) oraz naprzemianległą (symetria D<sub>5d</sub>), których występowanie skorelowane jest ze stanem skupienia metaloorganicznej cząsteczki. W stanie stałym, ferrocen przyjmuje konformację D<sub>5d</sub>, natomiast w gazowym D<sub>5h</sub> (Rys. 3).

Podstawnik ferrocenylowy zbudowany jest z dwóch pierścieni cyklopentadienylowych, stanowiących 5 węglowe ligandy dla położonego centralnie atomu żelaza, znajdującego się na +2 stopniu utlenienia. Wszystkie atomy węgla oddalone są o taką samą odległość od atomu żelaza. Aby szczegółowo omówić strukturę przestrzenną ferrocenu należy odnieść się do schematu półilościowego diagramu orbitali molekularnych tej cząsteczki (Ryc. 3).



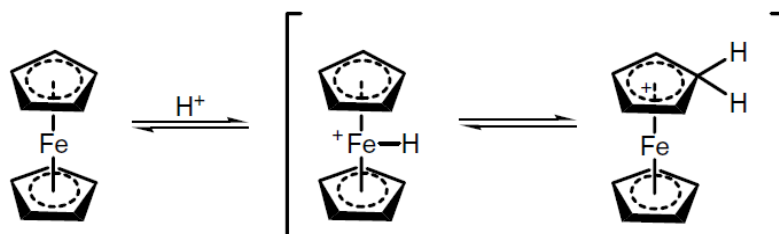
**Rysunek 3.** Półilościowy diagram orbitali molekularnych ferrocenu w konformacji D<sub>5d</sub> (Neuse, 2005).

Na diagramie po lewej stronie przedstawiono stany energetyczne dla pary wolnych pierścieni cyklopentadienylowych, a po prawej – stany energetyczne dla centralnie umieszczonego atomu żelaza (występującego również w stanie wolnym). Pośrodku umieszczone zostały natomiast stany energetyczne dla cząsteczki ferrocenu. Z analizy przedstawionego wyżej schematu wynika, iż:

- a) wszystkie elektrony walencyjne są sparowane, dlatego ferrocen przejawia właściwości diamagnetyczne,



- b) ze wszystkich 18 elektronów dostępnych dla utworzenia wiązania chemicznego, 12 znajduje się w silnych orbitalach wiążących. Są to elektrony na orbitalach  $e_{1u}$ ,  $e_{1g}$ ,  $a_{2u}$  i  $a_{1g}$ . Pozostałe 6 elektronów umieszczone są na orbitalach niewiążących  $a'_{1g}$  oraz  $e_{2g}$ . Jest to szczególnie ważne, gdyż właśnie te elektrony znajdują się na orbitalach wysokoenergetycznych i determinują właściwości redoks cząsteczki oraz szereg innych cech chemicznych. Ponadto, elektrony mogą z łatwością zostać usunięte z tych orbitali, co prowadzi do powstania różnego rodzaju kationów ferrocenylowych,
- c) gęstość elektronowa lokalizuje się przede wszystkim w obrębie centralnie położonego atomu żelaza, dlatego też cały związek w środowisku kwasowym ulega protonacji. Niespotykana konfiguracja niesie za sobą jednocześnie konsekwencje samorzutnego przesunięcia protonacji w stronę pierścienia cyklopentadienylowego. To stosunkowo nietrwałe chemiczne połączenie protonów z pierścieniem, przyjmującym ładunek dodatni, jest łatwo eliminowane, prowadząc do zniszczenia kompleksu w obecności silnych kwasów, co z kolei, jest niezwykle istotne z punktu widzenia potencjalnych eksperymentów prowadzonych z wykorzystaniem ferrocenylowych pochodnych (Rys. 4),
- d) różnice w stanach energetycznych orbitali  $a_1$  oraz  $e_1$  pierścieni oraz atomu żelaza, generują ładunek elektronowy który przenoszony jest na pierścienie. Przekłada się to na obserwowalne zagęszczenie elektronów  $\pi$  i nadaje aromatyczny charakter pierścieniom Cp, ułatwiając tym samym reakcję elektrofilowej substytucji katalizowaną kwasami Lewisa (reakcja Friedla-Craftsa). Niezwykle istotną konsekwencją, wynikającą z pojawienia się struktury aromatycznej, jest m.in. wysoka trwałość ferrocenu.



**Rysunek 4.** Protonacja ferrocenu (Neuse, 2005).

Sama cząsteczka ferrocenu nie jest toksyczna dla organizmu. W przeprowadzonych doświadczeniach, przez okres 3-6 miesięcy podawano zwierzętom różne dawki ferrocenu i wykazano, iż nie powoduje on istotnych zaburzeń funkcjonowania organizmu, toksyczności ogólnoustrojowej ani śmierci. Obserwowano jedynie znaczne zwiększenie stężenia żelaza we krwi, które ulegało redukcji po odstawieniu związku. Usuwanie ferrocenu z organizmu, jak w przypadku większości ksenobiotyków, odbywa się w wątrobie przy udziale sprawnie funkcjonującego enzymatycznego układu detoksykacji (Gasser i wsp., 2011).

Wysoka stabilność ferrocenów w środowisku wodnym, niska toksyczność ogólnoustrojowa, charakterystyczne właściwości fizyko-chemiczne, które warunkują funkcjonowanie całej cząsteczki oraz niezwykle duży potencjał modyfikacji chemicznych, wynikający z łatwości syntez nowych pochodnych, sprawiają, że ferroceny stanowią

niezwykle atrakcyjną grupę związków dla wielu naukowców. Chociaż sama cząsteczka ferrocenu nie wykazuje aktywności biologicznej oraz jest nierozpuszczalna w wodzie, jego odpowiednio zaprojektowane koniugaty wykazują szereg interesujących aktywności biologicznych, które badane są w wielu obszarach nauki.

Jedną z ważniejszych właściwości ferrocenyłowych pochodnych jest ich potencjalna aktywność przeciwnowotworowa. Obecnie syntetyzowanych jest coraz więcej ferrocenyłowych koniugatów, a do cząsteczki metaloorganicznej przyłączane są zarówno dostępne komercyjnie leki, jak i substancje pochodzenia naturalnego lub syntetycznego. Liczba powstających związków i prowadzonych badań wciąż jednak nie jest adekwatna i skorelowana z poziomem wiedzy na temat komórkowych mechanizmów aktywności tych związków. Uważa się, że ich cytotoksyczność i aktywność przeciwnowotworowa wynikać mogą przede wszystkim z niezwykle interesujących właściwości redoks cząsteczki ferrocenyłowej i jej zdolności generowania wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego  $\cdot\text{OH}$ . Nie jest to jednak jedyny szlak molekularnych aktywności tych związków (Mojziso *et al.*, 2014; Braga i Silva, 2013).

### **3. Właściwości biologiczne ferrocenyłowych pochodnych i ich zastosowanie**

Bazując na przełomowych odkryciach z zakresu chemii metaloorganicznej (synteza i prawidłowe opisanie struktury ferrocenu) oraz opierając się na współczesnej wiedzy i nowatorskich technikach laboratoryjno-przemysłowych, żelazo, wchodzące w skład licznie syntetyzowanych pochodnych ferrocenyłowych i determinujące ich właściwości biologiczne, chemiczne oraz fizyczne znajduje dziś szerokie zastosowanie w różnorodnych dziedzinach nauki. Pierwiastek ten po raz kolejny został uznany przez naukowców za istotne centrum rozwoju społeczeństwa. Wiele pochodnych ferrocenyłowych stosowanych jest dziś z powodzeniem w elektrochemii, jako biosensory, składniki paliw i nawozów, elektroczynne materiały (półprzewodniki) oraz składniki budulcowe materiałów, wykorzystywanych w przemyśle lotniczym (Neuse, 2005; Ornelas, 2011; Hildebrandt *et al.*, 2016; Mojžišová *et al.*, 2014).

Odkrycie cytotoksycznych właściwości kationu ferrocenyłowego spowodowało znaczny wzrost zainteresowania wielu ośrodków naukowych potencjalnym zastosowaniem ferrocenów w terapii przeciwnowotworowej oraz innych chorób. Niezwykle atrakcyjne właściwości redoks opisywanych cząsteczek, łatwość modyfikacji chemicznych i projektowania związków o określonych właściwościach biologicznych, jak również wysoka stabilność w środowisku wodnym, przyczyniły się do powstania szeregu różnorodnych pochodnych metaloorganicznych, zawierających w swej strukturze ferrocenyłowy podstawnik oraz do ich testowania w badaniach biologicznych i medycznych. Znaczna część badań nad ferrocenami poświęcona jest poszukiwaniom pochodnej metaloorganicznej o efektywnym działaniu przeciwnowotworowym i niskiej toksyczności ogólnoustrojowej. Powstają liczne pochodne ferrocenyłowe dostępnych już chemioterapeutyków (np. Ferrocifen), związków występujących naturalnie, które przejawiają aktywność przeciwnowotworową (np. flawonoidy) lub złożonych koniugatów np. dendrymerów. Nie jest to jedyny obszar medycyny, w jakim pokłada się duże nadzieje z funkcjonowaniem ferrocenów. Dostępna literatura naukowa wskazuje na obiecujące wyniki w zakresie aktywności *in vitro* i *in vivo* pochodnych ferrocenyłowych

przeciwko szeregu chorób bakteryjnych, grzybiczych, a przede wszystkim przeciwko pasożytów zarodźca malarii (Wani i wsp., 2015; Salas i wsp., 2013; Held i wsp., 2015; Biot i wsp., 2011; Braga i wsp., 2013; Ornelas, 2011). Dlatego też ferrocenyłowe związki żelaza coraz częściej rozpatrywane są jako nowa grupa potencjalnych związków terapeutycznych, mogących odegrać dużą rolę w rozwoju współczesnej medycyny. Znaczący wzrost zainteresowania świata nauki potencjalnym zastosowaniem ferrocenów w medycynie określany jest okresem nowej epoki żelaza (Braga i Silva, 2013).

Ze względu na znaczne ilości syntetyzowanych pochodnych ferrocenyłowych oraz ich różnorodne efekty biologiczne, w części teoretycznej niniejszej rozprawy doktorskiej opisano jedynie grupy metaloorganicznych koniugatów żelaza, charakteryzujących się najefektywniejszymi właściwościami przecinowotworowymi oraz najbardziej obiecującymi właściwościami biologicznymi. Dodatkowym aspektem poruszonym w pracy jest aktywność anty-malaryczna oraz anty-bakteryjna pochodnych ferrocenyłowych.

#### **4. Ferrocenyłowe pochodne jako czynniki cytotoksyczne**

Do powyższej grupy pochodnych ferrocenyłowych należą zarówno proste koniugaty metaloorganiczne, w przypadku których do podstawnika ferrocenyłowego dołączana jest strukturalnie nieskomplikowana cząsteczka związku o właściwościach cytotoksycznych, jak również złożone chemicznie związki, będące połączeniem ferrocenu i chemioterapeutyku. W pierwszym przypadku, oczekuje się, iż dołączenie ferrocenu do określonej struktury chemicznej będzie wzmacniać jej działanie cytotoksyczne. Celem połączenia metaloorganicznej cząsteczki z dostępnymi lekami, jest naśladowanie funkcjonowania biologicznego organicznego leku macierzystego, które zostanie udoskonalone poprzez właściwości fragmentu metaloorganicznego np. właściwości redoks metalocenu (Braga i Silva, 2013; Wani i wsp., 2015; Babin i wsp., 2014).

Badania nad właściwościami cytotoksycznymi pochodnych ferrocenyłowych zostały rozpoczęte wraz z odkryciem aktywności przeciwnowotworowej innych metalocenów o wzorze ogólnym  $Cp_2MCl_2$  (gdzie  $M=Ti, V, Nb, Mo$ ). Pierwsze doświadczenia, przeprowadzone w 1984 roku przez Köpf-Maier i wsp. (1984), dotyczyły trzech pochodnych soli ferrocenyłowych, zawierających w swej strukturze różne aniony, przyłączone do węgla pierścieni Cp. Badania prowadzone były na myszach z rakiem wysiękowym Ehrlicha (ang. *Ehrlich ascites tumor; EAT*). Wykazano, iż niemodyfikowana chemicznie cząsteczka ferrocenu nie przejawia aktywności antyproliferacyjnej względem komórek nowotworowych. Zastosowanie pochodnych soli ferrocenyłowych powodowało natomiast zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych i przeżycie 83% chorych zwierząt, których długość życia wzrosła aż o 380% w porównaniu z myszami, które nie otrzymywały tych związków. W późniejszych eksperymentach, Popova i wsp. (1993) wykazali w warunkach *in vivo*, iż aktywność przeciwnowotworowa pochodnych soli ferrocenyłowych jest ściśle skorelowana z rodzajem anionu, przyłączonego do pierścienia Cp oraz rodzajem nowotworu, na którym testowano związek. Wyniki prac, mających na celu zbadanie molekularnych mechanizmów aktywności opisanych wyżej pochodnych ferrocenyłowych, wykazały, iż kluczowe dla aktywności biologicznej tych związków jest generowanie reaktywnych form tlenu, głównie rodnika hydroksyłowego, powstającego w reakcji Fentona.

Konsekwencją powstawania RFT w komórkach nowotworowych, eksponowanych na działanie pochodnych soli ferrocenyowych, były uszkodzenia DNA (Ossela i wsp., 2000).

Jedną z głównych strategii stosowaną przez naukowców w syntezie nowych pochodnych ferrocenyowych jest takie zaprojektowanie koniugatów, które pozwoli nowej cząsteczce nabyć większą aktywność biologiczną niż poszczególne jej składniki lub nowe mechanizmy funkcjonowania. Pionierskie badania, przeprowadzone w tym zakresie, dotyczą ferrocenyowych pochodnych, przejawiających zdolności interkalacji do DNA. W zależności od rodzaju grupy funkcyjnej, przyłączonej do węgla pierścienia Cp, metaloorganiczne koniugaty charakteryzowały się różną cytotoksycznością. Najbardziej efektywne okazały się pochodne ferrocenyowe, zawierające przy węglu C6 2-metoksyakrydyne. Wyliczone stężenie  $IC_{50}$  dla wspomnianego związku wynosiło 2  $\mu\text{mol/L}$  dla trzech linii komórek nowotworowych – CoLo 205 (rak jelita grubego), HeLa i KB (rak nabłonkowy szyjki macicy) oraz 4,5  $\mu\text{mol/L}$  dla HepG2 (rak wątroby) (Ong i wsp., 1992). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż, wysoka cytotoksyczna aktywność metaloorganicznych pochodnych wynikała z połączenia cytotoksycznych właściwości podstawnika ferrocenyowego oraz zdolności akrydyny do interkalacji do DNA.

#### **4.1. Ferrocenyowe pochodne organicznych chemioterapeutyków**

Kluczową strategią dla otrzymania nowych, aktywnych biologicznie farmaceutyków o zwiększonej efektywności biologicznej, jest modyfikacja organicznego, komercyjnie stosowanego leku, którego funkcja, mechanizm działania i struktura są dobrze poznane. Część takiej cząsteczki zastępowana jest na drodze syntez chemicznych fragmentem metaloorganicznym, w celu uzyskania bioaktywnego koniugatu metaloorganicznego. Zastosowanie ferrocenów pozwoliło na uzyskanie wielu obiecujących, potencjalnych chemioterapeutyków. Najbardziej znanym przykładem wciąż pozostaje jednak Ferrocifen, z którym wiązane są duże nadzieje w zakresie leczenia nowotworów piersi. Otrzymany w wyniku substytucji fenyłowego pierścienia tamoxifenu cząsteczką ferrocenu związek metaloorganiczny, charakteryzuje się większą skutecznością przeciwnowotworowej aktywności w porównaniu z cząsteczką macierzystą.

W 1996 roku Jaouen i wsp. (Top i wsp., 1996), połączyli po raz pierwszy cząsteczkę ferrocenu z aktywnym biologicznie chemioterapeutykiem, stosowanym w leczeniu nowotworów piersi – tamoksifenem, należącym do selektywnych modulatorów receptora estrogenowego (ang. *Selective Estrogen Receptor Modulator; SERM*). Spodziewano się, iż otrzymany w wyniku takiej chemicznej substytucji koniugat będzie przejawiał nowe cechy terapeutyczne, jak np. efektywniejsze hamowanie proliferacji komórek nowotworowych raka piersi. Zgodnie z przyjętą hipotezą, zakładano, iż metaloorganiczna pochodna funkcjonować będzie na zasadzie fuzji aktywności biologicznej obu elementów składowych – przeciwnowotworowych właściwości organicznego chemioterapeutyku oraz aromatycznej struktury ferrocenu, przyczyniającej się do lokalizowania się jego cząsteczki w obrębie receptora estrogenowego, a w konsekwencji oddziaływania na DNA (Top i wsp., 1996; Top i wsp., 2003).

Badania, przeprowadzone na liniach komórkowych wywodzących się z estrogenozależnego (MCF-7) oraz estrogenoniezależnego (MDA-MB-231) raka piersi wykazały, iż ferrocifen charakteryzuje się niezwykle efektywnym antyproliferacyjnym

działaniem. W przypadku linii MCF-7 jego aktywność cytotoksyczna zbliżona była do niezmodyfikowanej cząsteczki hydroksytamoksifenu. Uważa się, że mechanizm działania metaloorganicznego koniugatu jest analogiczny do komercyjnie dostępnego chemioterapeutyku i realizowany poprzez oddziaływanie związku z receptorem estrogenowym (ER $\alpha$ ), obecnym na komórkach MCF-7, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania transkrypcji DNA, zależnej od działania estrogenów w tkance nowotworowej. Niezwykle istotne wyniki uzyskano natomiast dla linii MDA-MB-231, która pozostaje całkowicie niewrażliwa na działanie niezmodyfikowanej cząsteczki tamoksifenu na skutek braku receptorów estrogenowych. W przypadku zastosowania ferrocenylovej pochodnej ferrocifenu, obserwowano znaczny spadek przeżywalności komórek nowotworowych tej linii, a wyliczone stężenie IC<sub>50</sub> wynosiło 0,5  $\mu\text{mol/L}$ , co wskazuje na wysoką przeciwnowotworową aktywność tej pochodnej wobec komórek niewrażliwych na estrogeny. Uważa się, że u podstaw działania metaloorganicznej pochodnej znajdują się nowe mechanizmy molekularnych szlaków aktywności za które odpowiada część ferrocenylova (Hillard i wsp., 2005; Vessieres i wsp., 2010). Przeprowadzone w 2014 roku (Lu i wsp., 2014) badania wykazały, iż antyproliferacyjna aktywność ferrocifenu skorelowana jest ze zwiększoną produkcją RFT w komórkach nowotworowych. Z drugiej strony, udowodniono jednak, że taka aktywność opisywanego koniugatu metaloorganicznego może być realizowana bez udziału RFT, jak miało to miejsce w przypadku komórek czerniaka, których proliferacja również ulegała zahamowaniu po ekspozycji na ferrocifen (Michard i wsp., 2008). Uzyskane wyniki wskazują na szerokie spektrum możliwych dróg molekularnych mechanizmów działania cząsteczki metaloorganicznej, które wciąż pozostają niezbadane. Zbiór informacji z zakresu możliwych szlaków biologicznej aktywności ferrocifenu oraz wpływu struktury związku na efektywność funkcjonowania cząsteczki w komórkach nowotworowych (SAR) dostarcza artykuł przeglądowy profesora Gerarda Jaouen'a (Jaouen i wsp., 2015).

Niewątpliwy sukces koniugatu ferrocenu z tamoksifenem spowodował wzrost zainteresowania naukowców tym obszarem nauki, co przełożyło się na poszukiwania i syntezy nowych metaloorganicznych pochodnych dostępnych leków organicznych. Kolejnym związkiem, należącym do grupy SERM, który został połączony z podstawnikiem ferrocenylovym jest Raloksyfen. Ferreira i wsp. (2009) dokonali syntezy szeregu pochodnych Raloksyfenu, zastępując jeden z pierścieni fenolowych podstawnikiem ferrocenylovym. Analiza cytotoksyczności wykazała, iż wszystkie pochodne hamowały proliferację komórek nowotworowych różnych linii. Wartym podkreślenia jest fakt, iż najbardziej aktywna pochodna charakteryzowała się wysoką aktywnością biologiczną już przy niskich mikromolowych stężeniach, a wyliczone stężenie IC<sub>50</sub> było niższe niż od IC<sub>50</sub> związku referencyjnego – cisplatyny. Ponadto, jak wykazały doświadczenia, głównym mechanizmem śmierci komórek była apoptoza, realizowana przy udziale aktywnych kaspaz.

Dane literaturowe wskazują, iż leki z grupy SERM, zmodyfikowane o cząsteczkę ferrocenu, stanowić mogą atrakcyjną alternatywę dla dostępnych obecnie chemioterapeutyków. Obiecujące wyniki, uzyskiwane w kolejnych doświadczeniach, stanowią doskonały punkt wyjścia do syntezy jeszcze efektywniejszych biologicznie związków o szerszym spektrum działania i większej synergii mechanizmów

przeciwnowotworowych, występujących pomiędzy fragmentem metaloorganicznego ferrocenu a lekiem.

#### 4.2. Ferrocenyłowe pochodne fenoli

Ferrocenyłowe pochodne fenoli stanowią kolejną, atrakcyjną biologicznie grupę związków, które przykuwają uwagę naukowców. Inspiracją dla uzyskania takich koniugatów był naturalnie występujący antyoksydant – resweratrol, którego działanie wykorzystywane jest m.in. w leczeniu cukrzycy, redukcji nadwagi ale również zmniejszeniu ryzyka występowania chorób nowotworowych. Poszukiwanie najbardziej aktywnych metaloorganicznych pochodnych fenoli wymusza syntezę znacznej ilości różnorodnych koniugatów. Dotychczas uzyskano zarówno pochodne monofenolowe, jak i cząsteczki zbudowane z podstawnika ferrocenyłowego oraz kilku pierścieni aromatycznych fenolu. Dostępna literatura naukowa wskazuje, iż najbardziej efektywne właściwości przeciwnowotworowe wykazuje jak dotąd ferrocifenol (Hillard i wsp., 2006; Hillard i wsp., 2007). Przeprowadzone testy cytotoksyczności wykazały, że związek ten w niskich stężeniach skutecznie hamuje proliferację komórek nowotworów piersi linii MCF-7 oraz MDA-MB-231, a wyliczone stężenia  $IC_{50}$  dla obu typów komórek były zbliżone i wynosiły odpowiednio 0,7  $\mu\text{mol/L}$  i 0,6  $\mu\text{mol/L}$ . Dobrą aktywnością biologiczną charakteryzują się również analogi *orto* i *meta* ferrocifenolu. Uważa się, iż u podstaw molekularnych mechanizmów aktywności przeciwnowotworowej powyższych metaloorganicznych pochodnych leży podobieństwo strukturalne do estrogenów, przez co zdolne są one do oddziaływania z receptorami  $ER\alpha$  i modulowania transkrypcji DNA.

Bazując na strukturze chemicznej ferrocifenolu, próbowano w licznych syntezach otrzymać związki o jeszcze wyższej aktywności przeciwnowotworowej. Zarówno modyfikacja części fenolowej związku, jak i pierścieni Cp ferrocenyłowego podstawnika zakończyła się niepowodzeniem (Tan i wsp., 2009; Hillard i wsp., 2007). Badania te pozwoliły wyciągnąć kluczowe wnioski dla przyszłych syntez metaloorganicznych pochodnych fenolowych. Zauważono iż wszelkie modyfikacje ferrocenyłowego podstawnika, jak również zmiana położenia grup hydroksylowych w obrębie pierścieni fenolowych, powodują obniżenie właściwości cytotoksycznych całej cząsteczki. Istotnym aspektem dla wysokiej aktywności antyproliferacyjnej koniugatów okazało się również zachowanie odpowiedniego ogólnego schematu strukturalnego całej cząsteczki – [ferrocen]-[łącznik organiczny]-[pierścienie fenolowe] (Hillard i wsp., 2006).

Druga generacja ferrocenyłowych pochodnych fenoli charakteryzuje się występowaniem wiązania pomiędzy atomami węgla w układzie cyklicznym dwóch pierścieni Cp podstawnika metaloorganicznego. Jak wskazują wyniki badań, taka strukturalna koniugacja pomiędzy fenolową częścią koniugatu, a jego resztą ferrocenyłową powoduje zwiększenie aktywności antyproliferacyjnej całej cząsteczki w stosunku do estrogeno-niezależnego nowotworu piersi (MDA-MB-231) (Gormen i wsp., 2010; Gormen i wsp., 2009; Plažuk i wsp., 2009).

Atrakcyjność powyższych koniugatów przekłada się na liczbę syntez nowych pochodnych oraz badań z zakresu ich cytotoksycznych i przeciwnowotworowych właściwości. W najnowszych badaniach zespół profesora Jaouen'a przeprowadził analizę aktywności biologicznej 28 ferrocenyłowych pochodnych (de Oliveira i wsp., 2011),

potwierdzając równocześnie ich biologiczną aktywność wobec różnych typów komórek nowotworowych.

### 4.3. Ferrocenyłowe pochodne flawonoidów

Nowoczesna chemia biometaloorganiczna wykorzystuje również przeciwnowotworowe właściwości flawonoidów (głównie auronów oraz flawonów) w połączeniu z ferrocenyłowymi podstawnikami. Nowatorskie podejście do opracowania alternatywnych chemioterapeutyków najprawdopodobniej przyczynia się do powstania licznych ferrocenyłowych pochodnych flawonoidów w celu uzyskania cząsteczki o najefektywniejszym działaniu przeciwnowotworowym, będącej wynikiem połączenia właściwości elementów składowych – flawonoidu oraz ferrocenu. Flawonoidowe pochodne metaloorganiczne, jako innowacyjne podejście do chemioterapii, cieszy się w ostatnich latach dużym zainteresowaniem badaczy (Monserrat i wsp. 2011; Monserrat i wsp., 2013; Tiwari i wsp., 2011). Zaskakująco dobre wyniki uzyskano dla ferrocenyłowych pochodnych chalkonów, stanowiących związki prekursorowe w biosyntezie flawonoidów. Metaloorganiczne koniugaty wykazywały wysoką cytotoksyczność względem komórek linii MDA-MB-231 (stężenie  $IC_{50}$  mieściło się w granicach 1-4  $\mu\text{mol/L}$ ). Ponadto związki te, hamowały wzrost kolonii bakteryjnych niektórych szczepów (*Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* oraz *S.epidermidis*) przy minimalnym stężeniu hamującym (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*; MIC) 4-32 mg/mL. Dużym problemem pozostaje jednak wciąż niska selektywność działania pochodnych ferrocenyłowych chalkonów. Przeprowadzone na komórkach prawidłowych fibroblastów linii MRC-5 płuc badania cytotoksyczności wykazały, że związki te powodowały zahamowanie proliferacji tych komórek z wydajnością zbliżoną do obserwowanej dla komórek nowotworowych (porównywalne stężenia  $IC_{50}$  związków). W celu zastosowania ferrocenyłowych pochodnych chalkonów jako potencjalnych chemioterapeutyków, konieczne jest poszukiwanie nowych rozwiązań strukturalnych, zwiększających selektywność ich działania względem komórek objętych karcynogenezą, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej aktywności biologicznej. W przyszłości mogą one znaleźć zastosowanie również jako środki dezynfekujące (Tiwari i wsp., 2011).

W kolejnych syntezach ferrocenyłowych pochodnych chalkonów nie udało się jednak uzyskać nowych związków o tak wysokiej efektywności przeciwnowotworowej. Warty podkreślenia jest fakt, iż niektóre z nich zdolne były do blokady oddziaływania wirusa HIV z DNA poprzez inhibicję enzymu HIV-1, należącego do proteaz aspartyłowych. Białko to odgrywa istotną funkcję w cyklu replikacyjnym wirusa HIV (Monserrat i wsp., 2011; Muller i wsp., 2012).

### 4.4. Ferrocenyłowe pochodne związków naturalnych

Chemiczne przyłączenie cząsteczki ferrocenu do biologicznie aktywnej substancji naturalnej, występującej w naszym organizmie, ma dwojakie skutki. Z jednej strony powoduje to, iż cały metaloorganiczny koniugat będzie charakteryzował się odpowiednią biozgodnością, zapewniającą brak odpowiedzi immunologicznej, co zwiększa szanse jego farmakologicznego zastosowania. Z drugiej strony oczekuje się, iż takie połączenie będzie

zwiększać cytotoksyczność całej pochodnej (Braga i Silva., 2013). Pionierskie badania w zakresie syntezy nowych ferrocenyowych pochodnych z wykorzystaniem zjawiska biomimikry, prowadzone były już pod koniec lat 70 XX wieku (Fiorina i wsp., 1978). Podstawnik ferrocenu łączono z poliaminami – putrescyną, sperminą lub spermidyną. Przeprowadzone badania wykazały, iż wspomniane metaloorganiczne koniugaty charakteryzowały się jednak niską cytotoksycznością względem mysich komórek białaczki limfoblastycznej.

Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się ferrocenyowe pochodne nukleotydów, oligopeptydów oraz cukrowców. Niezwykle obiecujące wydają się również połączenia podstawnika metaloorganicznego żelaza z mikroelementami.

#### **4.5. Ferrocenyowe pochodne peptydów**

Ferrocenyowe pochodne peptydów stanowią jedną z najliczniejszych grup pochodnych metaloorganicznych. Ich atrakcyjność wynika z możliwości ich szerokiego zastosowania zarówno w układach biologicznych, jak i w innych dziedzinach. Metaloorganiczne koniugaty peptydów charakteryzują się m.in. wysoką stabilnością chemiczną oraz dobrze poznanymi właściwościami redoks. Klasyfikacja ferrocenyowych pochodnych peptydów opiera się na ilości grup aminokwasowych dołączonych do pierścieni Cp metaloorganicznego podstawnika. Spora część uwagi naukowców poświęcona jest dipeptydowym koniugatam ze względu na ich wysoką aktywność biologiczną względem komórek nowotworowych. Podczas syntezy tej grupy związków, przestrzeganych jest kilka kluczowych dla ich prawidłowego funkcjonowania zasad. Niezbędne jest aby cząsteczka posiadała: 1) aktywny elektrochemicznie rdzeń; 2) łącznik chemiczny, który będzie pełnił rolę chromofora, obniżającego potencjał oksydacyjny części ferrocenyowej oraz 3) resztę aminokwasową, zdolną do interakcji z innymi biomolekułami obecnymi w komórkach np. poprzez wiązania wodorowe (Lal i wsp., 2011).

Wykazano, że ferrocenyowe pochodne peptydów wykazują cytotoksyczne działanie względem komórek nowotworowych raka płuc (linia H1299) (Corry i wsp., 2007; 2009; Goel i wsp., 2007). W szeregu przeprowadzonych badań testowano różnorodne chemicznie koniugaty, dla których wyliczone stężenie  $IC_{50}$ , odzwierciedlające aktywność cytotoksyczną związku, mieściło się w granicach stężeń mikromolowych. Najlepsze wyniki uzyskano dla ferrocenyowych pochodnych dipeptydów, otrzymanych w laboratorium profesora Kenny'ego (Monney i wsp., 2009), które charakteryzowały się wysoką aktywnością antyproliferacyjną wobec komórek H1299, a wartości ich stężeń  $IC_{50}$  znajdowały się poniżej 10  $\mu\text{mol/L}$ . Co warto podkreślić, pochodna wykazująca najlepsze przeciwnowotworowe działanie, była tak samo aktywna jak referencyjny lek cisplatyna.

Sugeruje się, iż u podstaw molekularnych mechanizmów działania opisywanych ferrocenyowych koniugatów leży ich zdolność do generowania RFT, które powodują uszkodzenia wielu struktur komórkowych, w tym również DNA. Jednym z następstw zaburzenia prawidłowej struktury materiału genetycznego, jest zahamowanie cyklu podziałowego komórek nowotworowych w punkcie kontrolnym G2/M (Corry i wsp., 2009). Ponadto, ze względu na swój lipofilowy charakter, cząsteczki te zdolne są do zakotwiczenia się w obrębie błon lipidowych, gdzie reszta peptydowa wchodzi w interakcje z elementami



strukturalnymi błony powoduje m.in. zaburzenie funkcjonowania kanałów błonowych i śmierć komórki (Corry i wsp., 2007; Goel i wsp., 2007).

W najnowszych badaniach Cooper i wsp. (2011) udało się uzyskać ferrocenyłowe pochodne peptydów, wykazujące aktywność biologiczną w środowisku o kwaśnym pH. Związki, w wyniku generowania RFT, powodowały uszkodzenia plazmidowego DNA. Ze względu na to, że komórki nowotworowe, na skutek efektu Warburga, wykazują niższe pH niż komórki prawidłowe, ta klasa koniugatów ferrocenyłowych może w przyszłości stanowić niezwykle atrakcyjną grupę związków wyjściowych do syntezy kolejnych metaloorganicznych pochodnych o jeszcze lepszej biologicznej aktywności, szczególnie względem nowotworów.

#### **4.6. Ferrocenyłowe pochodne zasad azotowych**

Dużym zainteresowaniem współczesnej chemii biometaloorganicznej cieszą się koniugaty ferrocenu z zasadami azotowymi. Bazując na dobrze poznanych właściwościach biologicznych nukleotydów, naukowcy starają się stworzyć związki o nowych właściwościach chemioterapeutycznych (Ornelas, 2011) poprzez kowalencyjne połączenie nukleotydów z ugrupowaniem metaloorganicznym, zawierającym żelazo.

Istotnych informacji na temat przeciwnowotworowej aktywności ferrocenyłowych pochodnych zasad azotowych dostarczyły badania Simenel'a i wsp. (2009), którzy dokonali syntezy 14 nowych związków. Ich cytotoksyczne działanie zostało przetestowane w na 3 różnych liniach komórek nowotworowych: gruczolakoraka sutka (C755), płuc (LCC) oraz czerniaka B16. Jedną spośród testowanych pochodnych charakteryzowała się szczególnie wysoką aktywnością antyproliferacyjną wobec komórek C755, powodując supresję nowotworu w 70% przypadków w porównaniu z kontrolą. Co więcej, badania wskazują, iż związek ten wykazuje synergizm działania z klinicznie stosowanym cyklofosfamidem. Warto podkreślić, iż w kolejnych badaniach, przeprowadzonych również przez Simenel'a (2010), udało się zsyntetyzować i wyselekcjonować ferrocenyłową pochodną pirymidyny wykazującą jeszcze silniejsze działanie przeciwnowotworowe. W przeprowadzonych na myszach doświadczeniach, metaloorganiczny koniugat powodował hamowanie proliferacji komórek C755 w 95% (po 14 dniach stosowania) oraz 65% komórek LCC (po 22 dniach stosowania).

W jednych z najnowszych badań nad metaloorganicznymi pochodnymi zasad azotowych, Nguyen i wsp. (2014) zsyntetyzowali nukleotydowe analogi ferrocenyłowe, zawierające w swej strukturze grupy hydroksyalkilowe. Koniugaty te charakteryzowały się wysoką aktywnością antyproliferacyjną względem komórek nowotworowych różnych typów. Najbardziej efektywny związek w swym działaniu cytostatycznym dorównywał cisplatynie. Jak sugerują autorzy, w osiągnięciu wysokiej aktywności przeciwnowotworowej kluczowy udział miała zarówno część ferrocenyłowa, jak i podstawniki hydroksyalkilowe.

## 4.7. Supermolekularne systemy transportu leków

W ostatnim okresie oprócz poszukiwań i syntez nowych, efektywniejszych leków przeciwnowotworowych dużo uwagi poświęca się opracowaniu skutecznych metod ich bezpośredniego dostarczenia do komórek nowotworowych. Nowoczesne systemy transportu leków stają się obiecującą strategią w walce z nowotworami. Przyczyniają się one do zwiększenia rozpuszczalności chemioterapeutyków w środowisku wodnym jak również selektywności ich działania i trwałości chemicznej w ustroju chorego. Ponadto, efektywny transport leku i jego lokalizacja w obrębie nowotworu może korespondować z utratą jego aktywności *in vivo* np. na skutek interakcji ze związkami chelatującymi. Następstwem tego jest obniżenie dawki terapeutycznej leku, koniecznej do uzyskania pożądanego efektu (Ornelas, 2011; Braga i Silva, 2013).

Pomimo wysokiej aktywności przeciwnowotworowej niektórych pochodnych ferrocenyłowych oraz obiecujących wyników, w dostępnej literaturze naukowej znaleźć można jedynie kilka publikacji, dotyczących systemów transportu chemioterapeutyków z wykorzystaniem opisywanych związków metaloorganicznych. Związki te łączone są z cyklodekstrynami, polimerami poliaspartamidu oraz polimerami micelarnymi.

### 4.7.1. Cyklodekstryna

Kompleksy cyklodekstryny (ang. *cyclodextrin*; *CD*) ze względu na swoją wysoką stabilność oraz dobrą rozpuszczalność w H<sub>2</sub>O traktowane są jako atrakcyjne cząsteczki o charakterze nośników leków przeciwnowotworowych. Badania wskazują, iż zastosowanie CD jako nośnika leków w chemioterapii skutkuje zwiększeniem jego aktywności oraz spadkiem niepożądanych toksycznych efektów ubocznych. CD wykorzystywane są preferencyjnie jako nosniki leków hydrofobowych, w celu zwiększenia ich rozpuszczalności. Ponadto, nośniki te powodują wzrost aktywności leków poprzez redukcję ich interakcji z białkami surowicy lub innymi niespecyficznymi substratami, ułatwiając tym samym odpowiednią lokalizację chemioterapeutyków w komórkach docelowych (Ornelas, 2011; Braga i Silva, 2013).

Przeprowadzone przez różne zespoły badawcze doświadczenia wskazują, iż CD może być wykorzystywana z dużą efektywnością jako nośnik cytotoksycznych pochodnych ferrocenyłowych (Buriez i wsp., 2008; Bruno i wsp., 2011). Jaouen i wsp., badali połączenie  $\beta$ -CD z ferrocifenem. Wyniki wykazały, iż połączenie obu związków skutkuje znaczącym zwiększeniem rozpuszczalności w H<sub>2</sub>O, przy jednoczesnym braku wpływu na jego cytotoksyczność względem komórek nowotworowych. Analogiczne wyniki dla ferrocenyłowych pochodnych i  $\beta$ -CD uzyskał również Petrovski i wsp., (Petrovski i wsp., 2008). Co więcej, naukowcy wykazali, iż zastosowanie pochodnych CD (TRIMEB lub HP $\beta$ CD) jako nośniki ferrocenów powodowało istotny statystycznie wzrost (nawet 2,5 krotny) ich aktywności biologicznej.

Ze względu na to, że zastosowanie CD zwiększa rozpuszczalność metaloorganicznych koniugatów żelaza przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu na ich cytotoksyczność, związek ten wydaje się być niezwykle atrakcyjnym kandydatem do pełnienia roli nośnika leków, który przyczyniać się będzie do wzrostu biologicznej aktywności ferrocenów.

#### 4.7.2. Poliaspartamid

Zastosowanie poliaspartamidu jako nośnika ferrocenyłowych pochodnych powoduje wzrost ich rozpuszczalności, co ułatwia ich przenikanie przez błonę komórek nowotworowych i ich bezpośrednio działanie w miejscach docelowych. W ostatnich latach naukowcy starają się również wykorzystywać również związki poliaspartamidu jako systemy nośnikowe w terapii wielolekowej. Ich odpowiednia budowa chemiczna, charakteryzująca się występowaniem dużej ilości łańcuchów bocznych, umożliwia interakcję i transport kilku cząsteczek jednocześnie. Jedne z pierwszych badań przeprowadzonych w tym zakresie dotyczą terapii skojarzeniowej ferrocenyłowej pochodnej z aminochinoliną, kwasem foliowym oraz metotreksatem (Aderibigbe i wsp., 2011; Mufula i wsp., 2012).

Neuse i wsp. (Caldwell i wsp., 1998; Neuse, 1998, Neuse, 2001; Johnson i wsp., 2003) w szeregu przeprowadzonych badań analizowali cytotoksyczne właściwości połączonych z poliaspartamidem pochodnych ferrocenyłowych względem komórek HeLa oraz Colo 320DM, znanej jako linia wysoce oporna na konwencjonalną chemioterapie. W syntezach zastosowano szereg modyfikacji: różnorodne chemicznie łączniki, występujące pomiędzy fragmentem metaloorganicznym, a poliaspartamidem, oraz boczne grupy funkcyjne. Przeprowadzone w warunkach *in vitro* badania wskazują, iż tak przygotowane pochodne w większości przypadków wykazywały wysoką aktywność cytotoksyczną przy niższym stężeniu  $IC_{50}$  niż referencyjny związek cisplatyna. Za wysoką aktywność biologiczną związków odpowiedzialne były boczne łańcuchy aminowe koniugatów, które w warunkach fizjologicznego pH umożliwiały ich konwersję ze stanu neutralnego do znacznie bardziej toksycznej formy kationowej. Badania *in vivo*, przeprowadzone na zdrowych myszach wskazują, iż zastosowanie ferrocenyłowych koniugatów połączonych z poliaspartamidem, umożliwia zwiększenie stosowanej dawki leku nawet powyżej limitującej wartości toksycznej dla cisplatyny (Johnson i wsp., 2003; Schechter i wsp., 2000).

#### 4.7.3. Polimery micelarne

Wielowarstwowe systemy micelarne, zbudowane z amfifilowych łańcuchów polimerowych, stają się coraz bardziej popularne jako nośniki leków przeciwnowotworowych. Ze względu na swoją wysoką stabilność chemiczną, związki te w środowisku komórkowym nie ulegają dysocjacji na pojedyncze łańcuchy polimerowe. Jednakże, pomimo niewątpliwie atrakcyjnych właściwości fizyko-chemicznych, zastosowanie micelarnych polimerów jako nośników ferrocenyłowych pochodnych jest wciąż wykorzystywane w niewielkim zakresie. Niedawno przeprowadzone badania *in vitro* (Wei i wsp., 2010) wskazują, iż enkapsulacja ferrocenyłowej pochodnej we wnętrzu miceli polimerowej, powoduje uruchomienie aktywności cytotoksycznej związku wobec komórek nowotworowych linii HeLa ( $IC_{50}=0,2$  g/L). Zastosowanie zwiększonej dawki (0,8 g/L) skutkowało dalszym spadkiem przeżywalności komórek, aż do 10% względem komórek nietraktowanych.

## 5. Kompleksy heterobimetaliczne: ferrocen jako ligand

Odkrycie cisplatyny było niewątpliwie jednym z najważniejszych wydarzeń XX wieku dla rozwoju chemioterapii. Jej wysoka aktywność antyproliferacyjna i cytotoksyczna względem szeregu różnorodnych nowotworów połączona jest niestety z niską selektywnością działania i wysoką toksycznością ogólnoustrojową (Galluzi i wsp., 2012). Pomimo wielu czynników limitujących szerokie zastosowanie tego związku, jego budowa oraz sposób działania stał się dla naukowców istotnym impulsem do opracowania kolejnych związków, których podstawę strukturalną stanowią metale przejściowe.

Ze względu na swoją specyficzną geometrię, właściwości redoks oraz aktywności cytotoksyczne i proapoptotyczne, ferroceny stanowią atrakcyjne ligandy dla innych kompleksów koordynacyjnych metali przejściowych. W dostępnej literaturze naukowej można znaleźć coraz więcej informacji na temat połączeń ferrocenów z metalami takimi jak: platyna, pallad, aluminium, srebro, cynk, gal. Duże nadzieje wiąże się jednak, przede wszystkim, z połączeniami żelaza, występującego jako ferrocenyłowy podstawnik, z rutenem oraz złotem (Braga i Silva, 2013).

### 5.1. Kompleksy rutenu zawierające grupy ferrocenyłowe

Kompleksy rutenu z powodu korzystnych właściwości chemicznych rozpatrywane są jako alternatywa dla platyny. W warunkach fizjologicznych metal ten występować może wewnątrz komórek w trzech różnych stanach utlenienia (II, III oraz IV), co wskazuje na szeroki zakres jego potencjalnego prooksydacyjnego działania. Ponadto, cytotoksyczność kompleksów rutenowych względem komórek prawidłowych jest mniejsza, niż w przypadku związków platyny. Zjawisko to tłumaczone jest faktem specyficznej, preferencyjnej akumulacji rutenu w komórkach szybko dzielących się – jak ma to miejsce m.in. w komórkach nowotworowych. Mechanizm akumulacji rutenu w guzach nowotworowych spowodowany jest zdolnością metalu do jego oddziaływania z transferryną (na zasadzie podobieństwa działania do żelaza), której receptory ulegają nadekspresji w komórkach nowotworowych (Timerbaev i wsp., 2006).

Uważa się, iż wysoka, cytotoksyczna aktywność rutenowych kompleksów z ferrocenyłowymi może zostać osiągnięta poprzez odpowiednie zaprojektowanie chemiczne związku, tak aby miało miejsce synergistyczne współdziałanie obu metali przejściowych – rutenu oraz żelaza. Postuluje się, iż wówczas, na całkowitą zdolność prooksydacyjną oraz cytotoksyczną związku metaloorganicznego składać się będą właściwości poszczególnych jego pierwiastków metali.

Jedne z pierwszych badań nad potencjalnym zastosowaniem przeciwnowotworowym kompleksów rutenu-żelaza zostały przeprowadzone przez Poelhsitz i wsp., (Poelhsitz i wsp., 2007), którzy wykazali, że pochodne te charakteryzują się wysoką efektywnością działania względem komórek nowotworowych MDA-MB-231, a wyliczone stężenie  $IC_{50}$  było zaskakująco niskie i wynosiło 10  $\mu\text{mol/L}$ . Warty podkreślenia jest również fakt, iż metaloorganiczna pochodna wykazywała znacznie lepszą biologiczną aktywność niż cisplatyna ( $IC_{50}=63 \mu\text{mol/L}$ ).

Kolejne syntezy nowych pochodnych rutenu, zawierające grupy ferrocenyłowe, nie przyniosły już tak dobrych wyników. Otrzymywane związki wykazywały cytotoksyczne

działanie względem komórek nowotworowych w zakresie stężeń mikromolarnych, ale ich aktywność biologiczna w porównaniu z cisplatyną była przynajmniej 2-krotnie niższa (Ott i wsp., 2010; Auzias i wsp., 2008). Kluczowym dla wysokiej przeciwnowotworowej aktywności związków rutenu i żelaza okazała się ich struktura chemiczna. W jednych z najnowszych badań Kemp i wsp.(2012) podkreślają problem nieprawidłowej koniugacji obu metali, prowadzącej do redukcji gęstości elektronowej i całkowitego potencjału oksydacyjnego rdzenia rutenu, co ostatecznie powoduje obniżenie cytotoksyczności koniugatu wobec komórek nowotworowych.

## 5.2. Kompleksy złota zawierające ferrocen

Związki złota znane są przede wszystkim z ich zastosowania jako leki przeciwko zapaleniu stawów. Rozwój chemii biometaloorganicznej przyczynił się do badania aktywności tych związków także i w innych dziedzinach medycyny, w tym w onkologii klinicznej. W dostępnej literaturze naukowej można znaleźć szereg prac opisujących obiecujące właściwości przeciwnowotworowe substancji zawierających złoto (Ott i wsp., 2009; Liu i wsp., 2013; Hackenberg i Tacke, 2014; Cisnetti i wsp., 2013). Niektóre spośród nich hamują proliferację komórek nowotworowych, opornych na działanie cisplatyny, co najprawdopodobniej jest wynikiem różnych mechanizmów molekularnych, warunkujących ich aktywność przeciwnowotworową w porównaniu z pochodnymi platyny. Przeważająca część biologicznych badań, prowadzonych z wykorzystaniem związków złota, dotyczy koniugatów tego metalu na +I/+III stopniu utlenienia z tiolanami, N-heterocyklicznymi karbenami (NHC) czy ligandami alkinowymi (Hikisz i wsp., 2015; Cheng i wsp., 2014; Bertrand i wsp., 2015; Serebryanskaya i wsp., 2015).

Podobnie, jak w przypadku rutenowych kompleksów ferrocenyłowych, w połączeniu złota i żelaza upatruje się możliwości zwiększenia cytotoksycznej i antyproliferacyjnej aktywności całej cząsteczki poprzez wzajemną kooperację obu pierwiastków. Wzrost skuteczności działania metaloorganicznego koniugatu miałby więc być pewną wypadkową właściwości biologicznych złota i żelaza oraz wynikających z ich obecności molekularnych mechanizmów funkcjonowania w komórce.

Pomimo, iż pierwsze badania nad aktywnością biologiczną ferrocenyłowych kompleksów złota zostały przeprowadzone ponad 20 lat temu (rok 1995; Viotte i wsp., 1995), a zsyntetyzowane związki charakteryzowały się wysoką aktywnością antyproliferacyjną względem komórek nowotworowych linii SW-60 (rak jelita grubego) oraz HT-1376 (rak pęcherza), dostępne publikacje naukowe oferują ciągle niewiele informacji na temat możliwych szlaków działania tych związków w komórce. Co więcej, kolejne próby syntezy nowych koniugatów złota i żelaza o jeszcze lepszych właściwościach cytotoksycznych wobec komórek nowotworowych kończyły się w znacznej części przypadków niepowodzeniem. Co prawda uzyskiwane metaloorganiczne cząsteczki charakteryzowały się zdolnością hamowania proliferacji komórek nowotworowych w niskich, mikromolowych stężeniach, wyliczone stężenie  $IC_{50}$  było jednak wyższe niż dla cisplatyny, co dyskwalifikowało nowe pochodne jako potencjalne i atrakcyjne chemioterapeutyki (Gimeno i wsp., 2011).

Ostatnie badania przeprowadzone w tym zakresie przez dwa niezależne zespoły naukowe, wnoszą nieco więcej optymizmu. Horvath i wsp., (2008) wykazali wysoką

aktywność karbenowych kompleksów złota (I), połączonych z ugrupowaniem ferrocenyłowym. Związki te charakteryzowały się wysoką zdolnością hamowania proliferacji komórek nowotworowych linii HeLa (rak szyjki macicy), CoLo 320 DM (gruczolakorak jelita grubego) oraz Jurkat (białaczką T limfoblastyczna), przewyższając aktywność cisplatyny. Kolejna grupa badawcza (Goitia i wsp., 2011) dokonała syntezy kilkunastu koniugatów złota z fosfinami ferrocenylo-amidowymi. Przeprowadzony w warunkach *in vitro* test cytotoksyczności MTT na 4 liniach komórek nowotworowych (NIH-3T3, PC-12, A549 oraz HepG2) wykazał, iż część spośród analizowanych pochodnych, wykazywała większą aktywność antyproliferacyjną niż cisplatyna.

## 6. Ferrocenyłowe pochodne w leczeniu malarii

Pomimo licznych badań prowadzonych w ostatniej dekadzie w zakresie prewencji i leczenia malarii, choroba ta nieustannie charakteryzuje się bardzo wysokim odsetkiem zachorowalności połączonym z równie wysoką śmiertelnością. Jej występowanie zanotowano już w ponad 100 krajach, a problem dużej zachorowalności (szczególnie w krajach rozwijających się), oraz wysoka śmiertelność wśród chorych, stanowi sprawę priorytetową dla Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*; WHO). Jak podkreślają raporty WHO na przestrzeni ostatnich 15 lat obserwowano 18% spadek nowych zachorowań, jednak całkowita liczba osób dotkniętych malarią jest ciągle bardzo duża. Tylko w 2015 roku na malarię zachorowało około 214 milionów ludzi. Regionami najbardziej narażonymi na jej występowanie jest Afryka (88% przypadków), Azja (10%) oraz wschodni region śródziemnomorski (2%) (World Malaria Report, 2015).

Istotnym aspektem w walce przeciwko malarii jest skuteczność stosowanych leków. Brak skutecznej szczepionki przeciwko malarii oraz całkowita niemożność kontroli nad wektorem choroby jakim są komary, stanowią fundamentalny problem.

Pierwszym lekiem stosowanym w malarii była chinina oraz jej syntetyczna pochodna – chlorochina (CQ). Jednak, jak wykazały badania, już w latach 50 XIX wieku okazało się, że pierwotniaki *P. falciparum*, powodujące malarię, wykształciły odporność na te leki. Kolejną strategią była synteza nowych związków o działaniu zbliżonym do CQ, ale o odmiennej strukturze chemicznej. Również i ta terapia nie przyniosła spodziewanych efektów. Obecnie, zgodnie z zaleceniami WHO, w leczeniu malarii stosuje się terapię skojarzoną (politerapię), składającą się przynajmniej z dwóch różnych leków. Najbardziej efektywna jest terapia skojarzona artemizyny (ACT) (lub jej pochodnych) z innymi związkami. Taka kombinacja chemioterapeutyków przyczynia się do zwiększenia skuteczności leczenia oraz opóźnia czas wykształcenia odporności pasożytów (Wani i wsp., 2015; Salas i wsp., 2013; Held i wsp., 2015; Biot i wsp., 2011). Niepokojące dane z ostatnich lat wskazują jednak, iż w niektórych rejonach Azji pojawiły się gatunki odporne również i na ten rodzaj leczenia (Noedl i wsp., 2008; Hawkes i wsp., 2014).

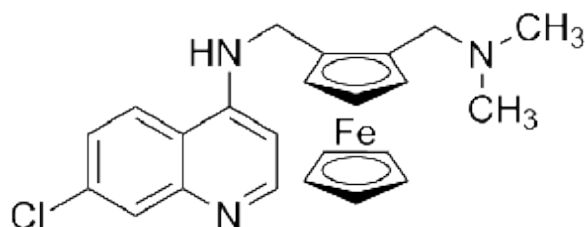
Duży sukces stosowania cisplatyny w terapii przeciwnowotworowej oraz wzrost zainteresowania związkami metaloorganicznymi, skierowały uwagę naukowców w stronę wykorzystania tych związków w leczeniu malarii (Biot i Dive, 2010). W pierwszych syntezach, cząsteczkę CQ koniugowano z podstawnikami zawierającymi różnorodne metale jak ruten, złoto czy żelazo. Strategia przyłączenia podstawnika ferrocenyłowego do struktury dobrze poznanego i zbadanego leku antymalarycznego została po raz pierwszy

zastosowana w połowie lat 90. Pierwsze uzyskane wyniki były jednak rozczarowujące. Skuteczność zwalczania pasożytów malarii była bowiem zbliżona lub nawet niższa niż w przypadku macierzystej chlorochininy. Przyczyn niepowodzenia upatrywano w niskiej stabilności nowych koniugatów w warunkach niskiego pH (Wani i wsp., 2015). Przełomowym okazał się rok 1994, kiedy to Biot i wsp. (1997) zaprojektowali oraz zsyntetyzowali ferrocenyłową pochodną CQ, określaną jako ferroquine (FQ). Przeprowadzone badania wykazały, iż cząsteczka FQ charakteryzuje się bardzo dobrą efektywnością działania *in vivo* względem CQ-opornego gatunku *P.falciparum*, przy jednoczesnym braku ubocznych efektów immunotoksycznych (Pierrot i wsp., 2005). Lepsza aktywność biologiczna FQ, połączona z interesującymi właściwościami antymalarycznymi oraz nowym mechanizmem molekularnej aktywności, stały się podstawą do dalszych badań nad wykorzystaniem opisywanego związku w leczeniu choroby pasożytniczej, jak również poszukiwania i syntezy nowych koniugatów, których podstawę strukturalną stanowi FQ (Wani i wsp., 2015).

Warto zaznaczyć, że skuteczność funkcjonowania cząsteczki FQ idzie w parze również z aspektem ekonomicznym. Synteza FQ z punktu chemicznego jest procesem nieskomplikowanym i tanim, co niewątpliwie zwiększa atrakcyjność zastosowania tego związku jako leku antymalarycznego – szczególnie w krajach o niskich dochodach (Biot i Dive 2010).

### 6.1. Struktura cząsteczki FQ

Punktem wyjścia do opracowania odpowiednio skutecznej cząsteczki FQ były jego dwa elementy składowe struktury – podstawnik ferrocenyłowy oraz 4-aminochinolina, będąca pochodną chininy. Poszukiwania efektywnie działającego koniugatu wymagało przeprowadzenia wielu badań oraz syntez, dzięki którym udało się ustalić najlepsze połączenie wszystkich struktur chemicznych. W licznych eksperymentach ustalono, iż kluczowym czynnikiem determinującym aktywność całego związku jest wzajemne usytuowanie ferrocenu, 4-aminochinoliny oraz łańcucha alkiloaminowego. Wykazano, iż ferrocenyłowy podstawnik znajdować się musi pomiędzy pierścieniami aromatycznymi 4-aminochinoliny, a bocznym łańcuchem alkiloaminowym (Rys. 5). Wartym podkreślenia jest fakt, iż cząsteczka tylko o takiej strukturze wykazuje wysoką efektywność antymalarycznego działania na szczepy *P.falciparum*, zarówno wrażliwe jak i odporne na CQ (Biot i wsp., 1997; Biot i wsp., 2005; Salas i wsp., 2013).



Rysunek 5. Struktura cząsteczki FQ.

## 6.2. Mechanizm aktywności FQ

Bazując na strukturze i właściwościach biologicznych komercyjnie dostępnego związku CQ, próbowano zsyntetyzować wiele jego pochodnych ferrocenylowych, odznaczających się jeszcze lepszym antymalarycznym działaniem. Szybko jednak okazało się, iż FQ jest najbardziej efektywną pochodną, charakteryzującą się wysoką aktywnością *in vivo* względem *P.falciparum*. Do dziś traktowany jest on jako związek prekursorowy dla dalszych poszukiwań i syntez metaloorganicznych pochodnych o właściwościach antymalarycznych (Wani i wsp., 2015).

Pomimo pewnego podobieństwa strukturalnego pomiędzy cząsteczkami CQ oraz FQ, ich zdolność hamowania rozwoju zarodźca malarii jest bardzo różna (Biot i wsp., 2009). Jak wykazały liczne badania, kluczowa dla funkcjonowania całej cząsteczki okazała się obecność metaloorganicznego podstawnika ferrocenyłowego oraz jej odpowiednia lokalizacja w obrębie struktury chemicznej całego koniugatu. Odpowiednim kierunkiem badań było więc porównanie poszczególnych szlaków aktywności biologicznej CQ oraz FQ. Niezwykle interesującą właściwością metaloorganicznej pochodnej jest jej zdolność do skutecznego oddziaływania również na CQ-oporne *P.falciparum*. O wysokiej biologicznej atrakcyjności związku świadczy fakt, iż przetestowanie FQ w warunkach *in vitro* na 16 różnych szczepach laboratoryjnych pasożytów, pozyskanych i wyizolowanych z różnych regionów geograficznych, dało zadowalające wyniki (Biot i Dive, 2010; Wani i wsp., 2015).

Uważa się, że mechanizmy biologicznej aktywności antymalarycznej CQ i FQ są podobne. Głównym celem działania tych związków jest hamowanie powstawania hemozoiny. Istotne różnice w efektywności działania obu związków wynikają z ich właściwości fizyko-chemicznych, takich jak lipofilność, zasadowość, budowa geometryczna i elektronowa. Biologiczna aktywność FQ realizowana jest na wielu szlakach molekularnych, głównie w obrębie wakuoli pokarmowej zarodźca malarii, i opiera się na zdolności cząsteczki do oddziaływania na błony lipidowe pasożytów poprzez peroksydację lipidów, hamowania powstawania hemozoiny oraz generowania reaktywnych form tlenu (głównie rodnika hydroksylowego na drodze reakcji Fentona), co ostatecznie prowadzi do śmierci pasożytów.

Wynikiem działania pasożytów *Plasmodia sp.* jest przebiegający w ich wakuoli trawiennej rozkład enzymatyczny hemoglobiny erytrocytów człowieka. Do cytosolu uwalniany jest zawierający żelazo wolny hem, który w takiej formie jest cytotoksyczny. Kolejnym etapem działania pasożytów jest jego konwersja do formy krystalicznej – hemozoiny, która jest niezbędna do ich przeżycia. Właściwości te sprawiają, że staje się ona jednym z głównych celów działania leków antymalarycznych oraz potencjalnych chemioterapeutyków, a inhibicja powstawania hemozoiny jednym z najbardziej pożądaných działań skutecznego terapeutyku.

Biot i wsp. (2005) w swoich badaniach wykazali, że FQ przejawia duże powinowactwo do hematyny (pochodna hemu, zawierająca trójwartościowy atom żelaza  $Fe^{3+}$ ), będącej jednym z substratów na szlaku powstawania hemozoiny. Opisywany związek metaloorganiczny tworzy z nią trwałe kompleksy, łącząc się z pochodną hemu w stosunku stechiometrycznym 1:1. Pomimo że, wyniki badań wykazały, iż mechanizm



oddziaływania CQ i FQ z hematyną był taki sam dla obu związków, zaobserwowano istotne różnice w ich efektywności inhibowania hematyny. FQ powodowała zależne od stężenia hamowanie konwersji hematyny do  $\beta$ -hematyny, a wyliczone dla CQ i FQ stężenie  $IC_{50}$  wynosiło odpowiednio 1,9 oraz 0,78 nmol/L. Wartości te wskazują na ponad dwukrotnie większą aktywność metaloorganicznej pochodnej (Dubar i wsp., 2010; Biot i wsp., 2005).

Zarówno CQ, jak i jego metaloorganiczna pochodna FQ, w zależności od pH środowiska, charakteryzują się swoistą litofilnością, która jak wykazały badania, implikuje ich sposób działania względem pasożytów zarodźca malarii. Porównując molekularne aktywności CQ i FQ, wykazano, iż metaloorganiczna pochodna w warunkach cytosolowego pH, lokalizuje się w obrębie dwuwarstwy lipidowej ponad 100-krotnie silniej niż niezmodyfikowana chemicznie chlorochina. Właściwości te, powodują, iż FQ preferencyjnie lokuje się w obszarze wakuoli trawiennej pasożytów, gdzie pełni swoje antymalaryczne funkcje. Uważa się, iż różnice w funkcjonowaniu FQ i CQ w obrębie błony biologicznej stanowią podstawę znacznie wyższej aktywności pochodnej metaloorganicznej (Biot i wsp., 2010; Wani i wsp., 2015).

Obecność w strukturze chemicznej FQ silnych wiązań wodorowych również koresponduje z działaniem antymalarycznym cząsteczki. Biot i wsp. (2009) wykazali, iż biorą one bezpośredni udział w odpowiedniej lokalizacji koniugatu w dwuwarstwie lipidowej komórek pasożytów *Plasmodia sp.*

W odpowiednich warunkach środowiska, cząsteczka FQ, w przeciwieństwie do CQ, zdolna jest do generowania reaktywnych form tlenu w komórkach pasożyta. Za indukcję stresu oksydacyjnego odpowiedzialny jest podstawnik ferrocenyłowy, obecny w metaloorganicznej pochodnej FQ. Przeprowadzone badania wykazały, iż w wyniku lokalizacji FQ w obrębie błony lipidowej wakuoli trawiennej pasożytów zarodźca malarii, następuje jednoelektronowa, odwracalna reakcja redoks, przebiegająca z udziałem atomu żelaza. Jest to klasyczna reakcja Fentona, w której produktem jest wysoce reaktywny rodnik hydroksyłowy  $\cdot OH$ :



Stężenie RFT, generowanych przez FQ, jest stosunkowo niskie i mieści się w granicach mikromolowych, skutkiem czego nie wpływają one na stabilność metaloorganicznej pochodnej w komórkach. Z drugiej strony poziom rodnika hydroksyłowego jest na tyle wystarczający, aby spowodować liczne uszkodzenia (jak np. peroksydację lipidów) w komórce pasożytniczej, prowadzące do zaburzenia funkcjonowania wakuoli trawiennej i w konsekwencji śmierci parazytów (Chavain i wsp., 2008; Biot i Dive 2010; Dubar i wsp., 2008; Dubar i wsp., 2013; Salas i wsp., 2013).

Uważa się iż brak zdolności cząsteczki CQ do generowania RFT w krwinkach czerwonych, które możliwe jest tylko w komórkach jądrzastych przy udziale czynnika NF- $\kappa$ B, osłabia jej aktywność przeciwmalaryczną (Dubar i wsp., 2008; Chavain i wsp., 2008). Z drugiej strony, doskonale właściwości antymalaryczne FQ, wynikają z wieloczynnikowej aktywności – odpowiedniej lokalizacji, hamowania powstawania hemozoiny i generowania RFT (Dubar i wsp., 2008; Chavain i wsp., 2008; Biot i wsp., 2011).

Aktywność antymalaryczna FQ realizowana jest więc na kilku szlakach molekularnych. Ze względu na swoje fizyko-chemiczne właściwości głównym obszarem działania metaloorganicznej cząsteczki są lipidy wakuoli trawiennej parazytów, inhibicja powstawania hemozoiny oraz uszkodzenia *Plasmodium sp.* przez RFT, generowane przez żelazo FQ.

FQ jest obecnie w drugiej fazie badań klinicznych i uważany jest za jeden z najbardziej atrakcyjnych medycznie potencjalnych leków antymalarycznych. Duże nadzieje, jakie pokładane są w tą cząsteczką, związane są nie tylko ze skutecznym leczeniem malarii, ale również z niezwykle istotnym poszerzeniem wiedzy w zakresie projektowania nowych, efektywnych koniugatów metaloorganicznych (Biot i Dive 2010). Warto również zaznaczyć, iż prowadzone są także badania nad terapią skojarzeniową ACT, gdzie partnerem dla komercyjnie stosowanej artemizyny jest pochodna FQ. Atrakcyjne wyniki, które uzyskano, wskazują, iż metaloorganiczny koniugat może w przyszłości być jednym z głównych leków antymalarycznych. Naukowcy sugerują ponadto badania nad kombinacją FQ z innymi lekami w celu opracowania nowej generacji terapii skojarzeniowej (Held i wsp., 2015).

Należy również podkreślić, że FQ, nie jest jedyną metaloorganiczną cząsteczką o właściwościach przeciwmalarycznych. Prowadzone są syntezy kolejnych pochodnych ferrocenyłowych o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu tej groźnej choroby, jednak żaden z dotychczas zsyntetyzowanych związków nie wykazuje tak doskonałej aktywności przeciwko zarodźcom malarii jak FQ (Wani i wsp., 2015; Biot i Dive 2010; Biot i wsp., 2012).

## **7. Antybakteryjne właściwości ferrocenyłowych pochodnych**

W ostatnich latach obserwuje się niepokojący wzrost lekooporności wśród mikroorganizmów. Niewrażliwość drobnoustrojów na stosowane powszechnie antybiotyki osiąga alarmujący poziom i stanowi poważne wyzwanie dla przemysłu farmaceutycznego na całym świecie. Konieczne jest więc opracowanie leków o szerszym spektrum działania. Obiecujące wyniki, uzyskiwane w przypadku zastosowania ferrocenyłowych pochodnych do zwalczania infekcji bakteryjnych lub grzybiczych, stanowią solidny punkt wyjścia do dalszych eksperymentów nad metaloorganicznymi pochodnymi. Stają się one atrakcyjną alternatywą dla obecnie stosowanych leków i dobrze rokującym rozwiązaniem problemu lekooporności wśród drobnoustrojów. Obecność metalu w zmodyfikowanej cząsteczce antybiotyku nadaje jej nowe właściwości, wynikające ze swoistych cech fragmentu metaloorganicznego. Uważa się, że zwiększenie aktywności metaloorganicznych pochodnych dostępnych leków (w tym również antybiotyków) i nowych związków, jest sumą podstawowej cytotoksyczności farmaceutyku oraz specyficznych właściwości jonu metalu (Eke i Abubakar 2015; Patra i wsp., 2012).

Na podstawie wyników dotychczasowych prac eksperymentalnych można stwierdzić, iż w badaniach nad syntezą i potencjalnym zastosowaniem ferrocenów jako antybiotyków naukowcy przyjmują następujące główne strategie:

- synteza pochodnych ferrocenyłowych dostępnych komercyjnie antybiotyków, których struktura chemiczna bazuje na farmaceutykach; lek wzbogacony jest o fragment

ferrocenu (Edwards i wsp., 1976; Patra i wsp., 2009; Patra i wsp., 2010; Patra i wsp. 2012; Patra i wsp., 2011; Skiba i wsp., 2012),

- poszukiwanie zupełnie nowych związków metaloorganicznych, zawierających podstawnik ferrocenyłowy, który połączony jest z powszechnie dostępnym związkiem nie pełniącym funkcji antybiotyku (El Arbi i wsp., 2011; Ali i wsp., 2013; Eke i Abubakar, 2015; Bandow i Metzler-Nolte, 2009).

Pionierskie badania w zakresie łączenia ferrocenów z farmaceutykami przypadają na lata 70. Edwards i wsp. (1976) przeprowadzili serię syntez ferrocenyłowych pochodnych penicyliny oraz cefalosporyny, w których jeden z pierścieni benzenowych antybiotyków został zastąpiony cząsteczką ferrocenu. Wyniki wskazują, że niektóre z chemicznie zmodyfikowanych związków charakteryzują się efektywniejszymi właściwościami antibakteryjnymi, a mechanizm ich funkcjonowania skorelowany jest prawdopodobnie z inhibicją enzymu  $\beta$ -laktamazy. Molekularne szlaki aktywności metaloorganicznych pochodnych antybiotyków są jednak słabo poznane (Patra i wsp., 2010, Patra i wsp., 2011; Patra i wsp., 2012). Sugeruje się iż fragment metaloorganiczny, zawierający atom żelaza, może być odpowiedzialny za generowanie wolnych rodników, uszkadzających komórki bakteryjne – analogicznie jak w przypadku aktywności antymalarycznej. Ponadto, w komórkach bakteryjnych, eksponowanych na działanie ferrocenyłowych koniugatów, obserwowano również uszkodzenia bakteryjnego DNA, co powodowało zahamowanie ich replikacji i tym samym namnażania się w organizmie gospodarza (El Arbi i wsp., 2011; Ali i wsp., 2013).

Niemiecki profesor Nils Metzler-Nolte wraz z zespołem badawczym przeprowadzili szereg badań nad syntezą nowych, ferrocenyłowych pochodnych antybiotyku platensymycyny (Patra i wsp., 2009; Patra i wsp., 2010; Patra i wsp., 2011; Patra i wsp., 2012). Związek ten, odkryty i wyizolowany w 2006 roku (Wang i wsp., 2006), jest metabolitem *Streptomyces platensis*. Charakteryzuje się on wysoką aktywnością przeciwbakteryjną wobec gram-dodatnich szczepów *Staphylococcus aureus* oraz *Enterococcus faecalis*, blokując enzymy kluczowe dla szlaku biosyntezy kwasów tłuszczowych. Ze względu na słabą farmakokinetykę, nie jest on komercyjnie rozpowszechniony jako antybiotyk, stanowi jednak doskonały punkt wyjścia do modyfikacji chemicznych i otrzymania nowych, skuteczniejszych farmaceutyków.

Mimo licznych syntez metaloorganicznych pochodnych platensymycyny oraz badań nad molekularnymi mechanizmami ich aktywności przeciwbakteryjnej, do tej pory nie udało się opracować związku o większej efektywności bakteriobójczego działania niż związek macierzysty. Naukowcy zwracają uwagę na problem wieloetapowej syntezy, która powodować może obniżenie aktywności biologicznej całego koniugatu. Koniecznym wydaje się więc opracowanie nowych procesów chemicznych, które nie będą wpływać na zaburzenie struktur chemicznych pochodnych. Kolejnym istotnym czynnikiem, limitującym zastosowanie pochodnych metaloorganicznych platensymycyny, jest niska kinetyka ich wnikania do komórek bakteryjnych, co związane jest prawdopodobnie z niską przepuszczalnością błony bakterii dla tych związków (Patra i wsp., 2009; 2010; 2011; 2012).

Również w przypadku chemicznego łączenia podstawnika ferrocenyłowego z dostępnymi związkami, niepełniącymi funkcji antybiotyków jak np. związki fenyłowe (El Arbi i wsp., 2011), anilina (Ali i wsp., 2013), zasady Schiffa (Farooq i Lokande, 2015), nie

uzyskano zadowalających wyników. Większość badanych pochodnych wykazywała niewielką aktywność antybakteryjną. Należy więc podkreślić, że w tym obszarze nauki ferrocenyłowe pochodne jak dotąd nie osiągają tak dobrych i zadowalających wyników jak ma to miejsce w przypadku leczenia malarii (FQ) czy nowotworów (Ferrocifen). Biorąc jednak pod uwagę duży potencjał biologiczny ferrocenyłowych pochodnych, zasadnym wydaje się poszukiwanie nowych koniugatów żelaza, które skutecznie hamowałyby m.in. wzrost bakterii czy grzybów.

## **II. CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA**

## 8. CEL PRACY

Głównym celem badań, przeprowadzonych w niniejszej pracy, była ocena w warunkach *in vitro* profilu aktywności przeciwnowotworowej nowosyntetyzowanych i niebadanych dotychczas pochodnych metaloorganicznych oraz wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych związków – potencjalnych chemioterapeutyków do dalszej szczegółowej analizy w badaniach podstawowych, przedklinicznych i klinicznych.

Podstawą hipotezy badawczej i oczekiwanych rezultatów było założenie, że spełniające określone wymagania strukturalne i funkcjonalne pochodne metaloorganiczne będą:

1) hamować proliferację wrażliwych i opornych na konwencjonalne chemioterapeutyki komórek białaczkowych oraz komórek pochodzących z najczęściej występujących obecnie nowotworów litych – raka piersi (estrogenozależnego i potrójnie ujemnego), raka płuc i raka wątroby, poprzez indukcję uszkodzeń DNA oraz zahamowanie jego replikacji i cyklu podziałowego komórek

2) indukować śmierć komórek nowotworowych na drodze apoptozy, jako najbardziej pożądany sposób ich niszczenia, bez wywoływania niekorzystnego dla pacjentów procesu zapalnego, towarzyszącego np. nekrozy

3) generować stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych, którego udział w proapoptotycznym i genotoksycznym działaniu badanych pochodnych będzie znaczący.

Oczekiwano, że wybrane do badań metaloorganiczne pochodne charakteryzować się będą wysokim potencjałem przeciwnowotworowym.

Szczegółowe badania, wykonane w warunkach *in vitro*, miały na celu:

- 1) ocenę właściwości cytotoksycznych i cytostatycznych analizowanych pochodnych wobec wybranych linii ludzkich komórek nowotworowych
- 2) określenie rodzaju uszkodzeń komórek, eksponowanych na działanie badanych biokoniugatów (zmiany morfologii, błony komórkowej, jądra komórkowego, mitochondriów, chromatyny, DNA)
- 3) poznanie głównych mechanizmów molekularnych, odpowiedzialnych za cytotoksyczne, antyproliferacyjne, pro-oksydacyjnej, pro-apoptotyczne i genotoksyczne działanie najbardziej aktywnych związków, wyselekcjonowanych na podstawie testów cytotoksyczności i cytostatyczności.

Zakładano, że uzyskane w badaniach wyniki będą stanowić solidny fundament dla dalszych, bardziej szczegółowych i wszechstronnych badań podstawowych, przedklinicznych i klinicznych w celu potencjalnego zastosowania najbardziej aktywnych i obiecujących pochodnych, o najkorzystniejszych właściwościach biologicznych, jako nowych efektywnych chemioterapeutyków w leczeniu nowotworów. Badania te wymagają również równoległej, szczegółowej analizy toksyczności wobec komórek prawidłowych.

## 9. MATERIAŁY

### 9.1. Odczynniki chemiczne

Odczynniki posiadały najwyższy z dostępnych stopni czystości, a do sporządzania ich roztworów stosowano wodę dejonizowaną, oczyszczoną w układzie odwróconej osmozy, o przewodności około 0,06  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Elix3/Mili-Q firmy Millipore).

#### 9.1.1. Odczynniki do hodowli komórek

- Medium wzrostowe DMEM (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*), Lonza, Verviers, Belgia)
- Medium wzrostowe RPMI (*ang. Roswell Park Memorial Institute medium*), PAA Laboratories GmbH, Niemcy)
- Roztwór trypsyny – 0,25% trypsyna, 1 mM EDTA (Lonza, Verviers, Belgia)
- Bydłęca surowica płodowa (PAA Laboratories GmbH, Niemcy)
- Mieszanka antybiotyków penicylina/streptomycyna – 10 000 jednostek/ml penicyliny, 10 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycyny (Lonza, Verviers, Belgia)
- Mieszanka aminokwasów – 10 mM (Lonza, Verviers, Belgia)

#### 9.1.2. Komercyjne zestawy odczynników

- ThioRedoxin Reductase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, Milpita Boulevard, Milpitas, CA, USA)
- EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1 (Molecular Probes, Minneapolis, Willow Creek Rd., USA)
- Caspase-8/Caspase-9 Colorimetric Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)

#### 9.1.3. Barwniki i sondy fluorescencyjne

- Oranż akrydynowy (*ang. Acridine Orange*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- DAPI (4',6-diamidynodihydrochloran-2-fenylindolu, *ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- DAUDA (*ang. 11-[5-(Dimethylamino)-1-naphthalenesulfonylamino] undecanoic acid*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- DAF-FM (*ang. diamino fluorescein-FM*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- DHE, Dihydroetydyna (*ang. hydroethidine; 3,8-Diamino-5,6-dihydro-5-ethyl-6-phenylphenanthridine; 5,6-Dihydro-3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridine; Reduced ethidium; 5-Ethyl-5,6-dihydro-6-phenyl-3,8-phenanthridinediamine*), Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
- H<sub>2</sub>DCFDA (*ang. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

- Hoechst 33258 (ang. *2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride hydrate, bisBenzimide*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- JC-1 (jodek 5, 5',6, 6'-tetrachloro-1,1',3, 3'-tetraetylobenzimidazokarbocyaniny, ang. *5, 5',6, 6'-tetrachloro-1,1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolcarbo- cyanine iodide*), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
- Jodek propidyny (ang. *propidium iodide*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- TMA-DPH (ang. *N,N,N-Trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl) phenylammonium p-toluenesulfonate*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

#### 9.1.4. Pozostałe odczynniki

- Agarozą LMP typ I-A (ang. *Low Melting Point*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Agarozą NMP typ VII (ang. *Normal Melting Point*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Auranofina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Błękit trypanu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- CCCP (karbonylo-cyjano-m-chlorofenylohydrazon (ang. *carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DMSO (dimetylsulfotlenek, ang. *dimethyl sulfoxide*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- HBSS (*Hanks' Balanced Salt solution*), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Kwas askorbinowy (ang. *Ascorbic acid*), Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
- MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotriazo-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu, (ang. *Methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide*), Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- NAC (ang. *N-Acetyl-L-cysteine*), Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
- Triton® X-100 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Trizma® hydrochloride Tris-HCl, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
- Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
- Roztwór RNazy, 50 U/mg, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Odczynniki firmy Poch S.A, Gliwice, Polska – wszystkie odczynniki stosowane do sporządzenia roztworów, zawierających kwasy, zasady i sole (NaOH, HCl, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>-EDTA, CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, etanol 96%,

#### 9.2. Sprzęt

Hodowlę komórek prowadzono z wykorzystaniem jałowego sprzętu jednorazowego użytku firmy PAA Laboratories GmbH, Niemcy:

- naczynia o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> i 75 cm<sup>2</sup>
- szalki o średnicy 35 i 60 mm
- przezroczyste i czarne płytki 96-dółkowe
- probówki o pojemności 15 ml i 50 ml.



W badaniach wykorzystywano również drobny sprzęt jednorazowego użytku:

- probówki typu Eppendorf
- końcówki do pipet automatycznych
- pipety Pasteura (plastikowe i szklane).

### 9.3. Aparatura

- mikroskop fluorescencyjny z odwróconym obiektywem Olympus IX70 (Tokyo, Japonia) – obserwacje mikroskopowe, badania morfologii komórek, ilościowa analiza komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych (barwniki fluorescencyjne Hoechst 33258 i jodek propidyny)
- mikroskop fluorescencyjny Nikon Eclipse E600W (Tokyo, Japonia) – obserwacja i analiza komórek DNA (barwnik fluorescencyjny DAPI)
- spektrofotometr Cary 1 firmy Varian (Varian Inc., Palo Alto, USA) – pomiary spektrofotometryczne
- czytnik mikroplamki 96-dołkowych Biotek PowerWave HT (Biotek Instruments, Winooski, USA) – pomiary spektrofotometryczne (test MTT żywotności komórek), kaspazy-8 i -9, TrxR
- spektrofluorymetr Perkin-Elmer (Massachusetts, USA) z przystawką do pomiaru anizotropii fluorescencji – płynność błony komórkowej (sondy TMA-DPH i DAUDA)
- czytnik mikroplamki Fluoroscanner Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finlandia) – pomiary spektrofluorymetryczne: poziom RFT (sondy fluorescencyjne H<sub>2</sub>DCFDA, kaspaza-3, potencjał mitochondrialny (sonda fluorescencyjna JC-1)
- cytometr przepływowy BDUS LSR II (Beckton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) – analiza cyklu komórkowego

### 9.4. Badane związki metaloorganiczne

Analiza molekularnych szlaków aktywności biologicznej badanych związków metaloorganicznych możliwa była dzięki współpracy pomiędzy zespołami badawczymi Katedry Termobiologii (obecnie Katedra Biofizyki Medycznej), kierowanej przez prof. dr. hab. Anetę Koceva-Chyłę a Katedry Chemii Organicznej, Wydziału Chemii UŁ; Instytutu Chemii, Uniwersytetu Neuchatel, Neuchatel, Szwajcaria; Katedry Chemii i Biochemii Uniwersytetu Bern, Bern, Szwajcaria oraz Instytutu Chemii Medycznej i Farmaceutycznej Politechniki Braunschweig, Braunschweig, Niemcy.

**Związki metaloorganiczne, badane w niniejszej pracy, zostały zaprojektowane, zsyntetyzowane i zanalizowane pod względem chemicznym przez:**

- Dr. hab. Konrada Kowalskiego, prof. nadzw. UŁ – Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź (Polska)
- Mgr. Łukasza Szczupaka – Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska

- Prof. Georg Süss-Fink – Institut de Chimie Université de Neuchâtel, Neuchatel, Szwajcaria
- Dr Bruno Therrien – Institut de Chimie, University of Neuchatel, Neuchatel, Szwajcaria
- Prof. Julien Furrer – Departement für Chemie und Biochemie, Universität Bern, Bern, Szwajcaria
- Dr Luciano Oehninger – Institute of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Niemcy
- Dr Ingo Ott – Institute of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Niemcy

W pracy oceniano aktywność biologiczną (głównie przeciwnowotworowe właściwości) **17** pochodnych metaloorganicznych o różnej strukturze. Były to:

- pochodne akryloilferrocenów (związki **15** i **15Cl**)
- pochodne azaferrocenów (związki **12** i **12a**)
- flawonoidowe pochodne ferrocenylowe (związki **4-7**)
- pochodne ferrocenylowe zawierające atom kobaltu (związki **7-11**)
- metaloorganiczne kompleksy alkilowe, zawierające pierścień chromonowy i atom złota (związki **4-6**)
- pochodna rutenu (**DiRu-1**)

### 9.5. Linie komórkowe

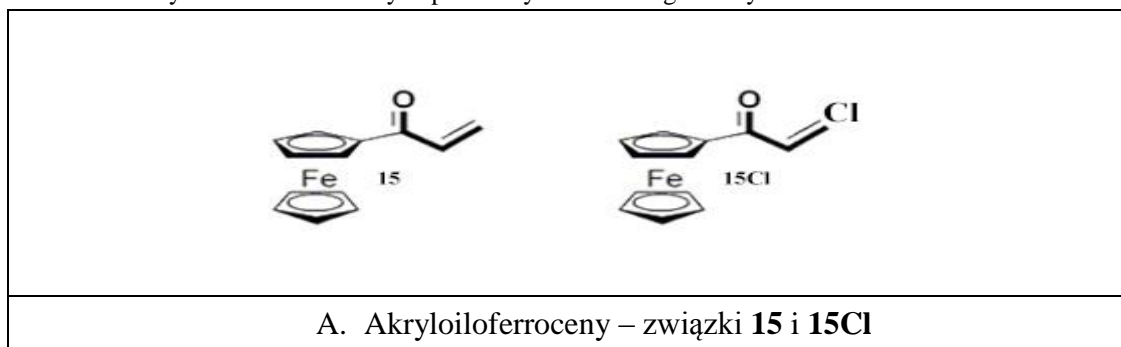
Badania aktywności biologicznej związków wykonano na czterech liniach komórkowych, wywodzących się z tych nowotworów ludzkich:

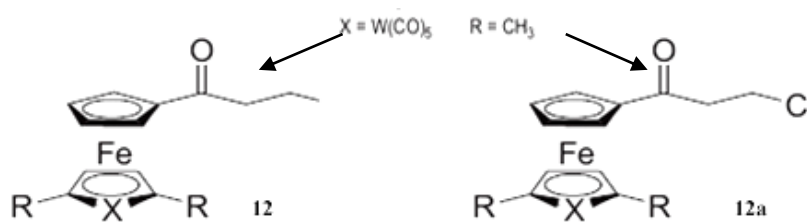
- MCF-7 (hormonozależny gruczolakorak (adenocarcinoma) piersi) – komórki rosnące w monowarstwie
- MDA-MB-231 (potrójnie negatywny gruczolakorak (adenocarcinoma) piersi) – komórki rosnące w monowarstwie
- HepG2 (rak wątrobowo komórkowy) – komórki rosnące w monowarstwie
- A549 (komórki nabłonka niedrobno komórkowego (gruczolakoraka) płuc) – komórki rosnące w monowarstwie

oraz linii białaczkowej:

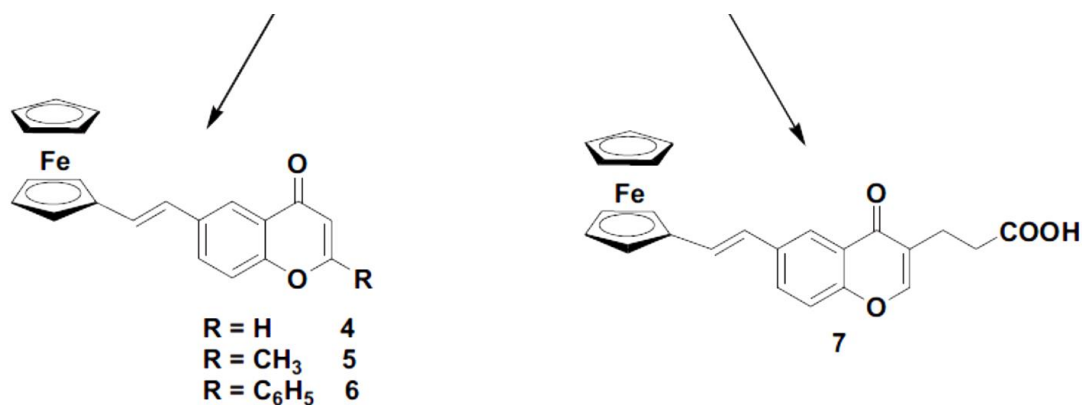
- CCRF- CEM (ostra białaczka limfoblastyczna) – komórki rosnące w zawiesinie.

**Tabela 1.** Wzory strukturalne badanych pochodnych metaloorganicznych.





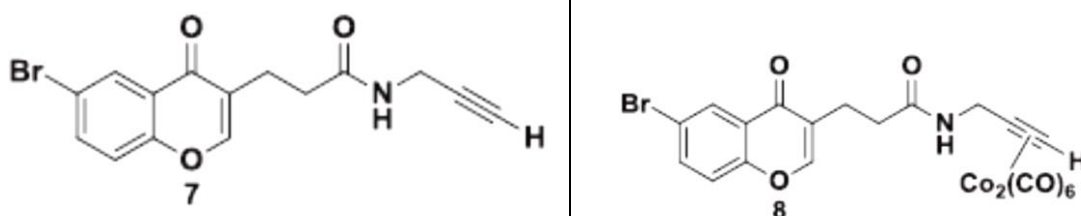
**B. Azaferroceny – związki 12 i 12a**

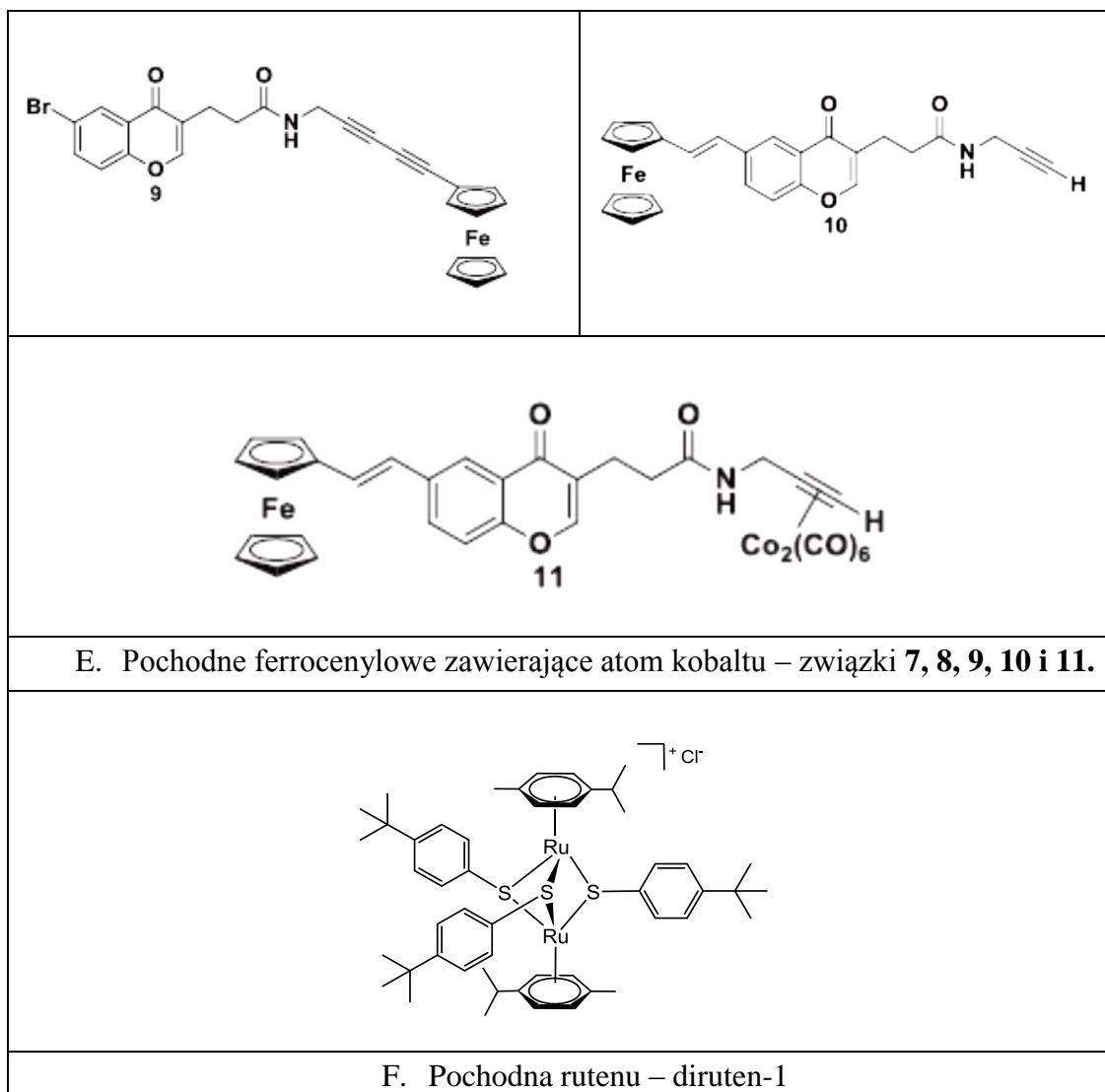


**C. Flawonoidowe pochodne ferrocenyłowe – związki 4, 5, 6 i 7.**



**D. Metaloorganiczne kompleksy alkilowe zawierające pierścień chromonowy oraz atom złota – związki 4, 5 i 6.**





### 9.5.1. Charakterystyka linii MCF-7 (ATCC® HTB-22™)

Linia MCF-7 (estrogenozależny gluczorakorak, *ang. adenocarcinoma estrogen-responsive*) raka piersi została po raz pierwszy wyprowadzona w roku 1970 z komórek metastazy (wysięku opłucnowego) nabłonkowego gruczolakoraka gruczołu piersiowego 69-letniej kobiety rasy kaukaskiej o grupie krwi 0, Rh+ (*Michigan Cancer Foundation-7, Detroit, USA*). Komórki te posiadają receptory dla estrogenów, co ma wpływ na ich funkcjonowanie i wrażliwość na chemioterapeutyki. Wykazują także ekspresję onkogenu WNT7B oraz wrażliwość na cytokeratyny. Nie są natomiast wrażliwe na desminę, endotelinę i wimentynę.

Jest to linia adherentna, rosnąca w monowarstwie. Namnażanie i wzrost komórek MCF-7 można zahamować poprzez dodanie do ich środowiska czynnika martwicy nowotworu (TNF $\alpha$ ) lub antyestrogenów. Substancje te mogą modulować sekrecję białek wiążących insulino-podobny czynnik wzrostu (IGFBP).

Kariotyp linii MCF-7 określany jest jako hipotetraploidalny z 8% poliploidią, hiperploidalny lub prawie triploidalny o liczbie chromosomów mieszczącej się w zakresie od 61 do 87.

### 9.5.2. Charakterystyka linii MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)

Linia estrogenoniezależnego raka piersi MDA-MB-231 (estrogenoniezależny gluczorakorak, ang. *adenocarcinoma estrogen-negative*) została wyprowadzona w roku 1973 z komórek metastazy (wysięku opłucnowego) nabłonkowego gruczolakoraka gruczołu piersiowego 51-letniej kobiety rasy kaukaskiej (*MD Anderson Cancer Center University of Texas, USA*). Komórki tej linii wywodzą się od potrójnie ujemnego raka piersi i nie posiadają zarówno receptorów hormonalnych (estrogenowych i progesteronowych) jak i nabłonkowych HER2. Są mało wrażliwe na cytostatyki i szybko zyskują oporność na te leki. Wykazują natomiast wrażliwość na większość cytotekeryn i wimentynę, ale są niewrażliwe na desminę i endotelinę. Podobnie jak komórki linii MCF-7, wykazują ekspresję onkogenu WNT7B.

Komórki linii MDA-MB-231 są adherentne, rosną w monowarstwie. Ich cechą charakterystyczną jest wydłużony, wrzecionowaty kształt.

Komórki linii MDA-MB-231, podobnie jak komórki MCF-7, są aneuploidalne (średnia liczba chromosomów wynosi 64 (zakres od 52 do 68), a zestaw chromosomów w kariotypie określany jest jako prawie triploidalny. Brak prawidłowych chromosomów 8 i 15.

### 9.5.3. Charakterystyka linii HepG2 (ATCC® HB-8065™)

Komórki linii HepG2 (nowotwór wątrobowo-komórkowy, ang. *hepatocellular carcinoma*) zostały wyizolowane z wątroby 15 letniego chłopca rasy kaukaskiej, chorego na raka wątrobowokomórkowego (*Filadelfia, USA*). Jest to jedna z najczęściej stosowanych (referencyjnych) ludzkich linii komórek nowotworowych w badaniach nad metabolizmem i toksycznością powszechnie stosowanych chemioterapeutyków oraz związków o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. Komórki linii HepG2 wykazują właściwości adherentne i rosną w monowarstwie. Na ich kariotyp składa się od 50 do 60 chromosomów (średnia wartość wynosi 55). Zdolne są do wydzielania niektórych białek osocza oraz białek fazy ostrej. Somatotropina (ludzki hormon wzrostu) stymuluje ich wzrost.

### 9.5.4. Charakterystyka linii A549 (ATCC® CCL-185™) komórek nabłonkopodobnych ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca

Są to pęcherzykowe podstawne komórki nabłonka gruczołowego płuca, które rosną w monowarstwie.

Komórki nabłonka gluczorakoraka płuc A549 (ang. *lung adenocarcinoma*) zostały wyprowadzone w roku 1972 w wyniku zabiegu eksplantacji tkanki płuc u 58 letniego mężczyzny rasy kaukaskiej przez zespół profesora D. J. Giard'a, Massachusetts, USA. Zestaw chromosomów komórek A549 określany jest jako hipotriploidalny. Średnia liczba chromosomów wynosi 66, jednak równie często występować może ich mniejsza (64 lub 65) lub większa liczba (67). Charakterystyczna dla komórek tej linii jest obecność 6 markerów chromosomowych: der(6)t(1;6) (q11;q27); del(6) (p23); del(11) (q21), del(2) (q11), M4 oraz M5. Większość komórek zawiera po dwa chromosomy X i Y, jednakże w przypadku około 40% komórek obserwowano utratę jednego lub wszystkich chromosomów Y. Komórki A549 wykazują cechy adherentne i rosną w monowarstwie.

### **9.5.5. Charakterystyka linii CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™)**

Komórki CCRF-CEM ostrej białaczki limfoblastycznej (ang. *acute lymphoblastic leukaemia A*) wyizolowano z krwi obwodowej 4-letniej dziewczynki rasy kaukaskiej, chorej na ostrą białaczkę limfatyczną (*Boston, USA*). Ich kariotyp składa się z od 41 do 95 chromosomów, średnia ich liczba wynosi 47. Komórki te wykazują ekspresję antygenów powierzchniowych CD3, CD4, CD5 oraz CD7. Są to komórki rosnące w hodowli zawiesinowej, bezpośrednio w medium hodowlanym.

## **10. METODY**

### **10.1. Hodowla komórkowa**

Hodowlę komórek prowadzono w warunkach jałowych, w sterylnych, jednorazowych naczyniach hodowlanych. Komórki hodowano w kompletnym medium wzrostowym, wzbogaconym inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicą płodową (FBS) – 10% v/v, z dodatkiem antybiotyków: streptomycyny [10 000 U/ml] i penicyliny [10 mg/ml] (1% v/v), w warunkach standardowych w inkubatorze CO<sub>2</sub> (temp. 37°C, 95% powietrza, 5% CO<sub>2</sub>, 100% wilgotności względnej).

Adherentne linie nowotworowe MCF-7, MDA-MB-231, HepG2 i A549 hodowano w medium hodowlanym DMEM, wzbogaconym FBS (10% v/v). Do hodowli zawiesinowej linii CCRF-CEM używano medium RPMI, również wzbogacone FBS (10% v/v).

### **10.2. Pasażowanie komórek**

Komórki wszystkich linii utrzymywano w fazie wzrostu logarytmicznego przez regularne pasażowanie do nowych naczyń hodowlanych po osiągnięciu przez hodowlę ok. 80% konfluencji.

#### **10.2.1. Pasażowanie komórek adherentnych**

Monowarstwę komórek, po usunięciu medium hodowlanego, przemywano 0,9% NaCl. Następnie dodawano 0,25% roztwór trypsyny z EDTA w ilości odpowiedniej dla powierzchni danego naczynia hodowlanego (300-500 µl). Komórki inkubowano z trypsyną przez 3-5 min w inkubatorze CO<sub>2</sub>, a proces trypsynizacji kontrolowano pod mikroskopem. Po zakończeniu trypsynizacji dodawano medium hodowlane o objętości odpowiedniej dla wielkości nowego naczynia hodowlanego i zawiesinę, po dokładnym wymieszaniu, przenoszono do nowych, jałowych naczyń hodowlanych.

#### **10.2.2. Pasażowanie komórek zawiesinowych**

Zawiesinę komórek linii CCRF-CEM, przenoszono do jałowych probówek o objętości 15 ml i wirowano w temp. 4°C przez 5 minut przy 1 000 obr/min. Do osadu komórek dodawano świeżego medium hodowlanego. Tak otrzymaną, zawiesinę poddawano mikroskopowej analizie. Komórki liczone w komorze Bürkera, a następnie rozcieńczano medium RPMI w celu otrzymania odpowiedniej liczby komórek w ml, zapewniającej im optymalny wzrost w naczyniu o określonej objętości. Końcową zawiesinę przenoszono do nowego, jałowego naczynia hodowlanego.

### **10.3. Ocena żywotności komórek**

Ocenę żywotności komórek dokonywano każdorazowo po ich pasażu. W tym celu stosowano 4% roztwór błękitu trypanu w NaCl, który wnika jedynie do komórek z uszkodzoną błoną komórkową, barwiąc je na kolor niebieski.

Niewielką ilość zawiesiny komórek mieszano w stosunku 1:1 z roztworem barwnika i наносono na hemocytometr *Bürkera*. Zliczano pod mikroskopem wszystkie komórki oraz komórki zabarwione na niebiesko (martwe). Obliczano procent martwych komórek w hodowli, przyjmując liczbę wszystkich zliczonych komórek za 100%.

### **10.4. Inkubacja komórek z badanymi związkami**

W zależności od analizy, komórki wysiewano na przezroczyste bądź czarne, jałowe 96-dółkowe płytki hodowlane lub na szalki o średnicy 35 cm. Hodowlę komórek zakładano 24 godziny przed planowanym eksperymentem, w celu ich przyklejenia się do powierzchni naczynia hodowlanego oraz namnożenia.

Liczbę komórek oraz rodzaj naczyń hodowlanych stosowanych w poszczególnych doświadczeniach, przedstawiono w Tabeli 1.

## **10.5. OCENA WŁAŚCIWOŚCI CYTOTOKSYCZNYCH**

### **10.5.1. Oznaczenie żywotności komórek metabolicznym mikropłytkowym testem spektrofotometrycznym z MTT**

#### Zasada metody

Metoda MTT należy do testów metabolicznych oznaczenia żywotności komórek i polega na pomiarze absorbancji fioletowego roztworu formazanu, produktu redukcji rozpuszczalnej w wodzie żółtej soli tetrazolowej (MTT) przez enzymy oksydoredukcyjne (głównie dehydrogenaza bursztynianowa mitochondriów) żywych komórek. Ilość produktu reakcji (nierozpuszczalnych w wodzie kryształów formazanu) jest proporcjonalna do liczby żywych i aktywnych metabolicznie komórek w próbie. W przypadku komórek uszkodzonych bądź martwych, formazan tworzy się w mniejszych ilościach, lub nie powstaje. Uzyskany po rozpuszczeniu kryształów formazanu w DMSO fioletowy roztwór wykazuje maksimum absorbancji przy długości fali  $\lambda = 580$  nm. W pracy zastosowano oryginalną metodę (Mosman, 1983). we własnej modyfikacji (Koceva-Chyla i wsp. 2005).

**Tabela 2.** Warunki hodowli komórek stosowane w poszczególnych analizach.

L.p.	Rodzaj analizy	Rodzaj zastosowanego naczynia hodowlanego	Liczba komórek
1.	Cytotoksyczność/cytostatyczność (MTT)	Mikro płytki 96-dołkowe (przezroczyste)	1 – 1,2 x 10 <sup>4</sup> /dołek
2.	Reaktywne formy tlenu (RFT)	Mikro płytki 96-dołkowe (czarne)	2 x 10 <sup>4</sup> /dołek
3.	Apoptoza/nekroza (podwójne barwienie), autofagia, katastrofa mitotyczna	Szalki o średnicy 35 mm	2 x 10 <sup>5</sup> komórek/szalkę
4.	Potencjał mitochondrialny	Mikro płytki 96-dołkowe (czarne)	2 x 10 <sup>4</sup> /dołek
5.	Uszkodzenia DNA	Szalki o średnicy 35 mm	3 x 10 <sup>5</sup> komórek
6.	Płynność błony komórkowej	Szalki o średnicy 35 mm	2 x 10 <sup>5</sup> komórek
7.	Cykl komórkowy	Szalki o średnicy 35 mm	5 x 10 <sup>5</sup> komórek
8.	Aktywność tioredoksyny	Szalki o średnicy 35 mm	8 x 10 <sup>5</sup> komórek
9.	Aktywność kaspazy-8 i -9	Szalki o średnicy 35 mm	8 x 10 <sup>5</sup> komórek
10.	Aktywność kaspazy -3	Szalki o średnicy 35 mm	8 x 10 <sup>5</sup> komórek

### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na bezbarwne, jałowe 96-dołkowe mikro płytki w liczbie odpowiedniej dla danej linii komórkowej. Po 24-godzinnej hodowli do określonych dołków mikro płytki dodawano badane związki i inkubowano w inkubatorze CO<sub>2</sub> przez 24 godziny, po czym usuwano medium, monowarstwę komórek przemywano dwukrotnie jałowym roztworem PBS, a do dołków mikro płytki dodawano świeże medium hodowlane. Po 48-godzinnej hodowli komórek wykonywano test MTT. Do każdego dołka mikro płytki dodawano po 50 µl roztworu soli tetrazolowej (stężenie końcowe 0,05 mg/ml). Mikro płytkę umieszczano na 3-4 godziny (w zależności od linii komórkowej) w inkubatorze CO<sub>2</sub>. Po zakończeniu inkubacji do dołków mikro płytki dodawano po 100 µl DMSO, w celu rozpuszczenia powstałych w środowisku żywych komórek fioletowych kryształów formazanu. Absorbancję roztworu formazanu, po delikatnym wymieszaniu, odczytywano przy długości fali  $\lambda = 580$  nm i długości fali referencyjnej  $\lambda = 720$  nm. Procent żywych komórek wyliczano porównując wartość absorbancji prób badanych z wartością absorbancji kontroli (komórki nietraktowane związkami). Absorbancje kontroli przyjmowano za 100%. Na podstawie uzyskanych wyników wykreślano krzywe przeżywalności komórek, przy użyciu programu komputerowego GraphPad Prism i obliczano stężenie IC<sub>50</sub> związków, które redukowało odsetek żywych komórek o 50%.



## 10.6. OCENA WŁAŚCIWOŚCI ANTYPROLIFERACYJNYCH

### 10.6.1. Właściwości cytostatyczne

W celu oznaczenia aktywności cytostatycznej badanych związków i ich zdolności do hamowania proliferacji komórek nowotworowych zastosowano inny wariant inkubacji komórek ze związkami. Prowadzono 24, 48 lub 72-godziną hodowlę komórek w medium, zawierającym badane związki. W każdym z ww. wymienionych punktach czasowych wykonywano test MTT, analogicznie jak w przypadku cytotoksyczności. Na podstawie uzyskanych krzywych przeżywalności dla każdego związku wyliczano stężenie  $IG_{50}$ .

### 10.6.2. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometryczną

#### Zasada metody

Cykl komórkowy określany jest jako sekwencja ściśle kontrolowanych zdarzeń, które prowadzą ostatecznie do podziału komórki. Podział mitotyczny umożliwia powstanie dwóch identycznych komórek potomnych, będących kopiami komórki macierzystej.

Do analizy cyklu komórkowego wykorzystywana jest technika cytometrii przepływowej, umożliwiającą zarówno identyfikację zabarwionego odpowiednim barwnikiem fluorescencyjnym DNA jak i dokładną analizę histogramu DNA w badanej populacji komórek. Jednym z najczęściej stosowanych barwników do tego celu jest jodek propidyny (PI), który wnika przez błonę komórkową utrwalonych w etanolu komórek, a następnie wiąże się z DNA na zasadzie interkalacji. Reakcja ma charakter stechiometryczny i nie jest specyficzna dla DNA, gdyż PI może wiązać się także i z dwuniciowym RNA. Analizę cyklu komórkowego wykonano wg metody Darzynkiewicz i Juan (2001).

#### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na jałowe szalki o średnicy 35 mm w ilości odpowiedniej dla stosowanej linii komórkowej. Po 24-godzinnej hodowli komórek do medium hodowlanego dodawano badanych związków w stężeniu  $IC_{50}$  i prowadzono 24-godziną inkubację. Inkubacja Po zakończonej inkubacji ze związkami, wymieniano medium i hodowano komórki przez kolejne 24 godziny. Po zakończeniu hodowli poinkubacyjnej komórki trypsynizowano, a następnie wirowano przez 5 minut, w 4°C, przy 1 000 obr./min. Supernatant wylewano, a osad komórek zawieszano w 200  $\mu$ l PBS, pozbawionego jonów  $Mg^{2+}$  oraz  $Ca^{2+}$ . Zawiesinę komórek utrwalano w 70% zimnym (-20°C) etanolu i przechowywano w takiej samej temperaturze do czasu analizy. Bezpośrednio przed pomiarem cytometrycznym, utrwalone w etanolu komórki odwirowywano przy 2 000 obr./min przez 5 minut, w 4°C. Osad komórek przemywano roztworem PBS i ponownie wirowano (1 000 obr./min, 5 minut, 4°C), a następnie zawieszano w 500  $\mu$ l buforu HBSS, zawierającego 1M Tris HCl (stężenie końcowe 10 mol/L), pH 7,5, 1 M  $MgCl_2$  (stężenie końcowe 5 mmol/L), oraz RNaze A 10 mg/ml (stężenie końcowe 10  $\mu$ g/ml) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji do zawiesiny komórek

dodawano PI (4 mg/ ml DMSO, stężenie końcowe 5  $\mu\text{M}$ ) dokonywano pomiaru cytometrycznego na cytometrze przepływowym Becton Dickinson LSR II..

Procent komórek w poszczególnych fazach cyklu podziałowego obliczano na podstawie histogramów DNA korzystając z odpowiedniego oprogramowania. Wyniki przedstawiono jako procent odpowiednich dla danej fazy cyklu wartości, uzyskanych dla DNA komórek kontrolnych (nieotraktowanych związkami).

## **10.7. OCENA WŁAŚCIWOŚCI PROOKSYDACYNYCH**

### **10.7.1. Określenie poziomu reaktywnych form tlenu (metoda z H<sub>2</sub>DCFDA)**

#### Zasada metody

Metoda oparta jest na utlenianiu sondy fluorescencyjnej H<sub>2</sub>DCF-DA (diocyanu dihydrodichlorofluoresceiny) przez wewnątrzkomórkowe RFT. H<sub>2</sub>DCF-DA stanowi zredukowaną chemicznie formę fluoresceiny. Sonda swobodnie przenika przez błonę komórkową do wnętrza komórki, gdzie w wyniku działania esteraz ulega hydrolizie (deacetylacji) do niefluoryzującej H<sub>2</sub>DCF. Następnym etapem przekształceń chemicznych sondy jest jej utlenienie przez wewnątrzkomórkowe RFT, w wyniku którego powstaje ostateczny produkt reakcji 2',7'-dichlorofluoresceina (DCF), charakteryzująca się silną fluorescencją. Związek ten pozostaje w cytozolu komórek, wykazując maksimum wzbudzenia i emisji przy długościach fal wzbudzenia/emisji  $\lambda_{\text{ex}}=495$  nm i  $\lambda_{\text{em}}=529$  nm. Intensywność fluorescencji sondy jest wprost proporcjonalna do ilości reagujących z nią RFT, obecnych w komórce. Analizę wykonano według metody opisanej w pracy Balcerczyk i wsp. (2005).

#### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na jałowe, czarne 96-dołkowe mikroplątki w liczbie odpowiedniej dla danej linii komórkowej. Po 24-godzinnej hodowli do dołków mikroplątki dodawano badane związki w stężeniach IC<sub>50</sub>, 1/2 IC<sub>50</sub> oraz 2 x IC<sub>50</sub>. Komórki inkubowano ze związkami przez 0,5, 3 lub 6 godzin. Po tym czasie usuwano medium, monowarstwę komórek przemywano dwukrotnie jałowym roztworem HBSS i do każdego dołka dodawano po 50  $\mu\text{l}$  roztworu HBSS (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES and 1% glucose), zawierającego H<sub>2</sub>DCFDA o stężeniu końcowym 5  $\mu\text{mol/l}$ . Komórki inkubowano z sondą przez 30 minut w inkubatorze CO<sub>2</sub>. Pomiarów natężenia fluorescencji dokonywano po 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 i 180 minutach od zakończenia inkubacji z sondą przy długości fali wzbudzenia  $\lambda_{\text{ex}}=490$  nm i emisji  $\lambda_{\text{em}}=529$  nm.

### **10.7.2. Określenie poziomu reaktywnych form tlenu (metoda z dihydroetydyną)**

#### Zasada metody:

Poziom anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) określano mikroplątkową metodą spektrofluorymetryczną z dihydroetydyną (DHE), która jest najczęściej używaną sondą fluorogenna do monitorowania wewnątrzkomórkowej produkcji anionorodnika

ponadtlenkowego  $O_2^{\bullet-}$  (Reers et al., 1991; Cossarizza et al., 1993). DHE uważana jest za najbardziej specyficzną i stabilną sondę fluorescencyjną do monitorowania generowania  $O_2^{\bullet-}$ . Jest zatrzymywana przez komórkę i można stosować ją również do barwienia komórek utrwalonych oraz w badaniach *In vivo*. DHE charakteryzuje się niebieską fluorescencją ( $\lambda_{ex}=355$  nm,  $\lambda_{em}=430$  nm). W wyniku reakcji pomiędzy DHE i  $O_2^{\bullet-}$  powstaje wysoce specyficzny produkt 2-hydroksyetydyna (2-OH-E+), która po interkalacji do DNA wykazuje silną czerwoną fluorescencję ( $\lambda_{ex}=460$  nm,  $\lambda_{em}=640$  nm) (Zao et al., 2005).

#### Przebieg oznaczenia:

Po zakończeniu inkubacji ze związkami usuwano medium, monowarstwę komórek w poszczególnych dołkach przemywano dwukrotnie HBSS (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM  $MgCl_2$ , 1.8 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $Na_2HPO_4$ , 10 mM HEPES i 1% glukoza) i do każdego dołka dodawano po 50  $\mu$ l roztworu dihydroetydyny w HBSS (stężenie końcowe 615  $\mu$ mol/l). Komórki inkubowano ze sondą przez 20 minut w warunkach odpowiednich dla danej linii komórkowej (37°C), a następnie mierzono fluorescencję po czasie 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 i 180 min. Pomiar wykonywano przy dwóch długościach fal wzbudzenia i emisji fluorescencji:  $\lambda_{ex} = 360$  nm/ $\lambda_{em} = 420$  nm (dla dihydroetydyny) oraz  $\lambda_{ex} = 360$  nm/ $\lambda_{em} = 640$  nm (dla etydyny). Obliczano stosunek fluorescencji 640 nm/420 nm. Stosunek ten dla kontroli przyjmowano za 0%, a fluorescencję prób przeliczano jako  $\Delta f$  w stosunku do kontroli.

### **10.7.3. Ocena udziału reaktywnych form tlenu w cytotoksyczności badanych związków metaloorganicznych**

W celu określenia udziału reaktywnych form tlenu w cytotoksyczności badanych związków metaloorganicznych, komórki pre-inkubowano przez 1 godzinę z przeciwutleniaczami N-acetylocysteina (NAC, 3 mM), witaminą E (Trolox, 50  $\mu$ M) lub kwasem askorbinowym (witaminą C, 50  $\mu$ M). Następnie, do medium komórek dodawano odpowiednie stężenia związków i wykonywano test MTT.

## **10.8. OCENA WŁAŚCIWOŚCI PRO-APOPTOTYCZNYCH**

### **10.8.1. Określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej (podwójne barwienie komórek fluorescencyjnymi barwnikami Hoechst 33258 i jodkiem propidyny)**

#### Zasada metody

Jednoczesne zastosowanie dwóch barwników fluorescencyjnych (jodek propidyny i Hoechst 33258), których mechanizmem wnikania do komórki i widmo fluorescencyjne różnią się, umożliwia identyfikację w tej samej próbce 4 typów komórek: żywych, wczesnoapoptotycznych, późnoapoptotycznych i nekrotycznych. Jodek propidyny (PI) posiada ujemny ładunek i wnika jedynie do komórek z uszkodzoną błoną komórkową, co pozwala na identyfikację komórek nekrotycznych lub komórek znajdujących się w późnych fazach apoptozy. Hoechst 33258, natomiast, wnika swobodnie przez nieuszkodzoną błonę komórek żywych i wczesnoapoptotycznych, umożliwiając tym samym

ich identyfikację. W wyniku przenikania barwnika przez nienaruszone błony biologiczne, barwi DNA jądra komórkowego na jasnoniebieski kolor. Natężenie fluorescencji barwnika związane jest ze stopniem upakowania DNA, co pozwala, na podstawie intensywności świecenia fluorochromu w jądrze komórkowym, odróżnić silnie fluoryzujące komórki apoptotyczne, zawierające silnie skondensowaną chromatynę, od słabo fluoryzujących komórek żywych, zawierających luźniejszą chromatynę. Oba fluorochromy ulegają wzbudzeniu przez światło z zakresu ultrafioletu – jodek propidyny charakteryzuje się pomarańczowo-czerwoną fluorescencją, natomiast Hoechst 33258 – niebieską. Barwienie komórek mieszaniną obu barwników pozwala na wyróżnienie w obrazie mikroskopowym 4 frakcji komórek różniących się fluorescencją:

- komórki żywe (słaba, matowa jasnoniebieska fluorescencja),
- komórki we wczesnej fazie PCD (jaskrawa jasnoniebieska fluorescencja),
- komórki w późnej fazie PCD (różowo-fioletowa fluorescencja),
- komórki nekrotyczne (intensywna czerwona fluorescencja) (Gąsiorowski i wsp. 2001).

#### Przebieg oznaczenia

Po 24-godzinnej inkubacji komórek z badanymi związkami, wymienano medium na nowe i prowadzono dalszą hodowlę komórek przez 24 i 48 godz. (hodowla poinkubacyjna). Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji ze związkami (0 godz.) oraz po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej, komórki trypsynizowano i przygotowywano zawiesinę, zawierającą  $1 \times 10^5$  komórek/ml buforu HBSS. Następnie, do zawiesiny dodawano po 1  $\mu$ l barwników fluorescencyjnych: Hoechst 33258 i PI (2 mg/ml każdy) i inkubowano w ciemności w temp. pokojowej przez 5-10 minut. Po zakończonej inkubacji, zawiesinę komórek, po delikatnym dokładnym wymieszaniu, наносono na szkiełka podstawowe i analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Olympus IX 70, stosując filtr UV 360–370 nm. W każdym preparacie zliczano 300 komórek w polu widzenia. Sumę wszystkich komórek przyjmowano za 100%, a zawartość komórek żywych, wczesno- i późnoapoptotycznych oraz nekrotycznych obliczano jako frakcję całości.

#### **10.8.2. Analiza zmian transbłonowego potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi_m$ ) (metoda z JC-1)**

##### Zasada metody

JC-1 jest kationowym barwnikiem karbocyjaninowym, szeroko stosowanym jako sonda fluorescencyjna do wykrywania depolaryzacji błony mitochondrialnej. Selektywne nagromadzenie JC-1 w mitochondriach jest wysoce zależne od transbłonowego potencjału mitochondrialnego ( $\Psi_m$ ) (Reers et al., 1991; Cossarizza et al., 1993).

W komórkach prawidłowych, odpowiedni potencjał błony mitochondrialnej (MMP) oraz sprawność mitochondriów zapewniają efektywne funkcjonowanie energetycznych szlaków metabolicznych, dostarczających energii w postaci ATP. Komórki w normalnych warunkach, posiadają wysoki potencjał błony mitochondrialnej (MMP), szacowany na  $-120$  do  $-180$  mV i uwarunkowany odpowiednią dystrybucją protonów ( $H^+$ ). W stanach patologicznych następuje gwałtowny spadek produkcji ATP, co powoduje wyczerpanie

energii i depolaryzację MMP. Zmiany potencjału mitochondrialnego są zjawiskiem charakterystycznym dla początkowych etapów PCD.

Zastosowanie sondy fluorescencyjnej JC-1 umożliwia spektrofluorymetryczną analizę zmian potencjału błony mitochondrialnej (MMP). JC-1 gromadzi się w dużych ilościach w hiperspolaryzowanej błonie mitochondrialnej (-140 mV), gdzie tworzy agregaty, emitujące czerwoną fluorescencję ( $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$ ). Podczas depolaryzacji (MMP -100 mV) i uprzepuszczenia błony mitochondrialnej następuje spadek stężenia JC-1 i rozpad agregatów do monomerów, emitujących zieloną fluorescencję, podobną do tej fluoresceiny ( $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ). Przejście JC-1 z postaci zagregowanej do monomerycznej wiąże się z przesunięciami w jego widmie fluorescencyjnym oraz ze zmianą fluorescencji pomarańczowej na zieloną. Te cechy sprawiają, że JC-1 jest czułym markerem zmian MMP, a pomiar stosunku fluorescencji agregatów do monomerów wygodnym i niezawodnym sposobem do oceny zmian w MMP w komórkach (Nuydens i wsp., 1999).

Stosunek fluorescencji agregatów ( $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ) i monomerów ( $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ ) – 590 nm/540nm, odzwierciedla poziom uszkodzenia błony mitochondriów komórek. Pozytywną kontrolę stanowiły komórki preinkubowane z 5  $\mu\text{mol/l}$  CCCP, którego funkcją jest rozprężanie transportu elektronów łańcucha oddechowego. Konsekwencją zmian procesu fosforylacji oksydacyjnej jest obniżenie potencjału mitochondrialnego i zmniejszenie prawdopodobieństwa wystąpienia jednoelektronowych redukcji cząsteczek tlenu.

### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na jałowe, czarne 96-dołkowe płytki w liczbie odpowiedniej dla danej linii komórkowej. Po 24-godzinnej hodowli do dołków dodawano badane związki w stężeniach  $\text{IC}_{50}$ ,  $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$  oraz  $2 \times \text{IC}_{50}$  i inkubowano przez 0,5; 3 lub 6 godzin. Po zakończeniu inkubacji usuwano medium, zawierające badane związki. Monowarstwę komórek przemywano dwukrotnie jałowym roztworem HBSS i do każdego dołka dodawano po 50  $\mu\text{l}$  sondy JC-1 o stężeniu 5  $\mu\text{mol/l}$  rozpuszczonej w HBSS. Komórki inkubowano z sondą przez 30 minut w inkubatorze  $\text{CO}_2$ . Następnie, monowarstwę komórek przemywano dwukrotnie roztworem PBS i do każdego dołka mikropłytki dodawano po 100  $\mu\text{l}$  buforu HBSS. Pomiarów fluorescencji monomerów i agregatów JC-1 dokonywano przy następujących wartościach długości fal wzbudzenia i emisji:

- $\lambda_{\text{ex}}=485 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em}}=538 \text{ nm}$  (monomery)
- $\lambda_{\text{ex}}=530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ nm}$  (agregaty).

Wyniki przedstawiono w procentach kontroli obliczonych na podstawie porównania stosunku natężenia fluorescencji 590/540 nm próby badanej i kontroli (100%).

### **10.8.3. Ocena aktywności kaspazy -8, -9, -3**

#### Zasada metody – kaspaza-8, -9

Kaspazy należą do dużej rodziny proteaz serynowych zaangażowanych w proces apoptotycznej śmierci komórki. Udział tych enzymów w procesie apoptozy realizuje się

zarówno na etapie inicjacji (kaspazy inicjujące, np. kaspaza-8 oraz -9), jak i etapie końcowym, określanym jako faza efektorowa (kaspazy efektorowe, np. kaspaza-3). Kaspaza-8 zaangażowana jest głównie w receptorowy (zewnętrzny) szlak apoptozy, przebiegający przy udziale białek receptorowych, zlokalizowanych na błonie komórkowej. Kaspazy-9 oraz -3 funkcjonują natomiast w wewnątrzkomórkowym szlaku mitochondrialnym, w którym główną rolę w przekazaniu sygnałów apoptotycznych i regulacji procesów związanych ze śmiercią komórki odgrywają mitochondria.

Oznaczenia aktywności kaspaz-8, -9 wykonywano w lizatach komórkowych, do których dodawano specyficznego dla badanych proteaz peptydu, skoniugowanego z p-nitroaniliną (pNA). W wyniku proteolitycznego cięcia peptydu, pod wpływem aktywnych kaspaz -8 lub -9, dochodzi do uwolnienia chromoforu pNA i zabarwienia roztworu. Pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda=405$  nm umożliwia określenie poziomu aktywności kaspaz w lizatach komórkowych, która jest wprost proporcjonalna do intensywności zabarwienia mieszaniny reakcyjnej.

#### Przebieg oznaczenia – kaspazy-8 i -9

Komórki wysiewano na jałowe szalki o średnicy 35 mm w ilości odpowiedniej dla stosowanej linii komórkowej. Po 24-godzinnej hodowli do medium hodowlanego komórek dodawano badanych związków w stężeniu  $IC_{50}$ . Inkubacja komórek ze związkami trwała przez 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji komórki poddawano 10-minutowej homogenizacji na lodzie, a następnie odwirowywano w  $4^{\circ}C$ , przy 10 000 obr./min przez 1 minutę. Z każdej próby pobierano po 50  $\mu$ l supernatantu i dodawano do odpowiednich dołków 96-dołkowej czarnej płytki. Następnie, do każdego dołka dodawano mieszaninę reakcyjną, składającą się z buforu reakcyjnego, DTT oraz substratu dla kaspazy-8 lub kaspazy-9 i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze  $37^{\circ}C$ . Po inkubacji dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali  $\lambda=405$  nm.

#### Zasada metody – kaspaza-3

Aktywność enzymu oznaczana jest w lizatach komórkowych. Do lizatu dodawany jest specyficzny substrat Z-DEVD-R110 (bisamid rodaminy połączony z substratem dla kaspazy-3, który gasi fluorescencję barwnika ksantenowego). Proteolityczne cięcie substratu Z-DEVD-R110 przez kaspazę-3, powoduje odłączenie monoamidu rodaminy, który w dalszym etapie ulega przekształceniu do cząsteczki R110. Oba produkty hydrolizy wykazują fluorescencję przy długości fal wzbudzenia i emisji odpowiednio  $\lambda_{ex}=496$  nm i  $\lambda_{em}=520$  nm. Pomiar fluorescencji umożliwia określenie poziomu aktywności kaspazy-3 w lizatach komórkowych.

#### Przebieg oznaczenia – kaspaza-3

Komórki wysiewano na jałowe szalki o średnicy 35 mm w ilości odpowiedniej dla stosowanej linii komórkowej. Po 24-godzinnej hodowli do medium hodowlanego komórek dodawano badanych związków w stężeniu  $IC_{50}$ . Komórki inkubowano ze związkami przez 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji, komórki poddawano homogenizacji (30 minut) na lodzie w buforze dostarczonym w zestawie, a następnie

wirowano w 4°C, przy 5000 obr./min, przez 5 minut. Z każdej próby pobierano po 50 µl supernatantu i dodawano do dołków 96-dołkowej czarnej mikroplastyki. W celu określenia fluorescencji tła, do określonych dołków zamiast lizatu komórek dodawano 50 µl buforu lizującego. Kolejną kontrolę stanowiły dołki zawierające inhibitor aktywności kaspazy-3. Do wszystkich dołków dodawano mieszaniny reakcyjnej, składającej się z buforu reakcyjnego oraz substratu dla kaspazy-3. Mikroplastykę inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 30 min. Po zakończeniu inkubacji dokonywano pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia/emisji odpowiednio  $\lambda_{ex}=496$  i  $\lambda_{em}=520$  nm.

## **10.9. ANALIZA ZDOLNOŚCI BADANYCH ZWIĄZKÓW METALOORGANICZNYCH DO INDUKOWANIA PROCESU AUTOFAGII**

Najbardziej powszechną metodą, stosowaną do wykrywania autofagosomów, formowanych w komórkach, w których zachodzi proces autofagii, jest mikroskopia fluorescencyjna. Do tego celu stosowanych jest ponad 60 różnych barwników fluorescencyjnych. W pracy wykorzystano fluorochromatyczne barwienie oranżem akrydynowym (AO), który wiąże się z niezdenaturowanym, dwuniciowym DNA żywych komórek, barwiąc jądro komórkowe w świetle UV na kolor zielony. AO może także wiązać się z RNA i jednoniciowym DNA barwiąc je na pomarańczowo. Jedynymi strukturami komórki, które wybarwiają się na kolor czerwony są lizosomy i autofagosomy. Natężenie barwy zależne jest od pH środowiska, w którym znajduje się barwnik. Ze względu na to, że AO posiada charakter zasadowy, gromadzi się w największej ilości w środowisku o niskim pH.

### Przebieg oznaczenia

Po zakończeniu inkubacji komórek ze związkami usuwano medium, monowarstwę komórek przemywano dwukrotnie roztworem PBS i wybarwiano roztworem AO (końcowe stężenie barwnika 5 µmol/l) przez 5 minut, w temperaturze pokojowej, w ciemności. Po wybarwieniu komórek odmywano nadmiar barwnika i fotografowano komórki pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus IX 70, Tokio, Japonia, filtr UV 360–370 nm), przy powiększeniu 150x. Oceniano komórki z wybarwionymi autofagosomami.

## **10.10. OCENA WŁAŚCIWOŚCI GENOTOKSYCZNYCH**

### **10.10.1. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową (elektroforeza pojedynczej komórki)**

#### Zasada metody

Uszkodzenia materiału genetycznego będące wynikiem ekspozycji komórki na czynniki genotoksyczne prowadzą do zaburzeń strukturalnych DNA i stanowią potencjalne źródło mutacji. Elektroforeza pojedynczych komórek (ang. *single cell gel electrophoresis*, *SCGE*), pozwala m.in. na pomiar jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć DNA. Podczas elektroforezy, DNA migruje w stronę anody z prędkością zależną od wielkości cząsteczki. Obraz mikroskopowy uszkodzonej komórki poddanej elektroforezie przypomina wyglądem

kometę: „głowa” odpowiada miejscu, w którym unieruchomiono komórkę przed lizą, „ogon” stanowią pętle i fragmenty nici DNA zrelaksowane i uwolnione ze struktur jądrowych w wyniku pęknięć DNA.

### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na jałowe szalki o średnicy 35 mm w liczbie odpowiedniej dla danej linii komórkowej. Po 24-godzinnej hodowli do medium hodowlanego komórek dodawano badanych związków w 3 stężeniach:  $IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2} IC_{50}$  oraz  $2 \times IC_{50}$ . Komórki inkubowano ze związkami przez 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji, wymieniano medium na nowe i prowadzono dalszą 24-godzinną hodowlę poinkubacyjną, aby umożliwić komórkom naprawę uszkodzeń DNA. Bezpośrednio przed analizą, komórki trypsynizowano, wirowano, zawieszano w niewielkiej ilości PBS i dodawano do roztworu agarozy o niskim punkcie topnienia. Niewielką ilość tak przygotowanej zawiesiny komórek w agarozie nanoszono na szkiełko podstawowe, opłaszczone agarozą o normalnym punkcie topnienia, przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i pozostawiano do czasu zastygnięcia agarozy. Preparaty inkubowano przez przynajmniej 1 godzinę w buforze lizującym (2,5 mol/l NaCl, 100 mmol/l  $Na_2$  - EDTA, 10 mmol/l Tris, 1% Triton X -100) w celu uwolnienia DNA. Następnie szkiełko przemywano trzykrotnie buforem rozwijającym (1 mmol/l  $Na_2$ -EDTA, 300 mmol/l NaOH) i inkubowano w tym samym buforze przez 20 minut.

Kolejnym etapem była elektroforeza komórek w buforze elektroforetycznym przez 20 minut (29V, 30 mA). Po elektroforezie, preparaty pozostawiano do wyschnięcia, a następnie barwiono za pomocą roztworu DAPI (2 mg/ml). Analizę komet DNA dokonywano pod mikroskopem fluorescencyjnym Nikon Eclipse (*Nikon, Tokio, Japonia*), wyposażonym w kamerę video 4910 COHU (*Cohu, Inc., San Diego, CA*) i komputerem z zainstalowanym oprogramowaniem Lucia-Comet v. 4.51 (*Laboratorium Obrazowania, Praga, Republika Czeska*). Każdorazowo z każdego preparatu zliczano 100 przypadkowo wybranych komet.

## **10.11. OCENA WŁAŚCIWOŚCI BŁONY KOMÓRKOWEJ**

### **10.11.1. Zmiany płynności błony plazmatycznej (pomiar anizotropii fluorescencji TMA-DPH i DAUDA)**

#### Zasada metody

Do oznaczeń zmian płynności błony plazmatycznej wykorzystano metodę spektroskopii fluorescencyjnej oraz dwie sondy fluorescencyjne (TMA-DPH i DAUDA), lokujących się na różnej głębokości dwuwarstwy lipidowej. TMA-DPH wbudowuje się w powierzchniowy obszar zewnętrznej monowarstwy, DAUDA natomiast wnika w głębszy hydrofobowy obszar błony. Fluorescencję sond mierzono na spektrofotometrycznym Perkin-Elmer (*Massachusetts, USA*) z przystawką do pomiaru anizotropii fluorescencji przy równoległym i prostopadłym położeniu polaryzatorów.



### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na jałowe szalki o średnicy 35 mm w liczbie odpowiedniej dla danej linii komórkowej. Po 24-godzinnej hodowli do medium hodowlanego komórek dodawano szereg rozcieńczeń badanych związków w stężeniach końcowych 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60  $\mu\text{M}$ . Po 2-godzinnej inkubacji komórki trypsynizowano i przenoszono do probówek Eppendorf (po 0,5 ml zawiesiny/próbę). Zawiesinę komórek komórek wirowano przy 2500 obr/min, przez 5 minut, w temp. 4°C. Osad komórek przemywano dwukrotnie zimnym PBS (0-4°C) i zawieszano w buforze Tris-HCl/KCl (50 mM Tris-HCl, 0,15 M KCl). Tak przygotowane próby umieszczano na lodzie. Bezpośrednio przed pomiarem do prób dodawano odpowiedniej sondy fluorescencyjnej (stężenie końcowe  $10^{-6}$   $\mu\text{M}$ ) i inkubowano w lodzie, w ciemności. Pomiarów fluorescencji dokonywano na spektrofluorymetrze Perkin-Elmer LS-5B w przystawce z polaryzatorem, odczytując anizotropię fluorescencji przy długości fali wzbudzenia  $\lambda_{\text{ex}}=365$  nm i długości fali emisji  $\lambda_{\text{em}}=425$  nm (TMA-DPH) oraz długości fali wzbudzenia  $\lambda_{\text{ex}}=350$  nm i długości fali emisji  $\lambda_{\text{em}}=420$  nm (DAUDA).

## **10.12. ANALIZA AKTYWNOŚCI REDUKTAZY TIOREDOKSYNY (TEST KOLORYMETRYCZNY)**

### Zasada metody

Reduktaza tioredoksyiny (EC1.8.1.9) jest enzymem, zaangażowanym w szereg istotnych procesów komórkowych oraz metabolicznych, takich jak prawidłowy wzrost komórek, aktywność p53 czy ochrona komórek przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego. Do oceny zmian aktywności enzymu w komórkach nowotworowych, eksponowanych na działanie badanych pochodnych metaloorganicznych, wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw kolorymetryczny firmy BioVision (*Milpitas Boulevard, Milpitas, CA, USA*). Podstawą metody jest katalizowana przez TrxR reakcja redukcji kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego) (DTNB) do barwnego anionu 2-tio-5-nitrobenzoesowego ( $\text{TNB}^{2-}$ ). Reakcja przebiega w obecności NADPH. Żółty kolor TNB wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 412 nm. Ze względu na to, że obecne w próbach materiału biologicznego inne reduktazy oraz peroksydaza glutationowa mogą również redukować DTNB, w metodzie stosowane są inhibitory, swoiste dla TrxR. W próbach dokonuje się 2 pomiarów absorbancji produktu redukcji DTNB: bez inhibitora TrxR oraz w obecności inhibitora TrxR. Różnica pomiędzy wartościami absorbancji określa pośrednio aktywność enzymatyczną TrxR. Enzym ssaczy może oprócz tioredoksyn redukować także substraty nie zawierające mostków disiarczkowych, np. seleniany, kwasy liponowe, nadtlenki lipidów i nadtlenek wodoru.

### Przebieg oznaczenia

Przed właściwym oznaczeniem wykreślano krzywą wzorcową, dodając do poszczególnych studzienek 96-dołkowej bezbarwnej mikropłytki wzorcowy roztwór TNB w stężeniu końcowym 0, 10, 20, 30, 40, 50 nM/dołek.

Komórki wysiewano na jałowe szalki o średnicy 35 mm w liczbie odpowiedniej dla stosowanej linii komórkowej. Po 24-godzinnej hodowli do medium hodowlanym dodawano badanych związków w stężeniu  $IC_{50}$  i inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze  $CO_2$ . Po zakończeniu inkubacji, komórki poddawano homogenizacji na lodzie, w buforze dostarczonym z zestawem. Homogenat wirowano przy 10 000 x g, przez 15 minut, w temp. 4°C. W kolejnym etapie przygotowywano mieszaninę reagentów, składającą się z buforu reakcyjnego, roztworu DTNB oraz NADPH. Mieszaninę tę w objętości 40  $\mu$ l dodawano do każdego z następujących rodzajów dołków:

- kontrola pozytywna – roztwór TrxR i bufor reakcyjny
- homogenaty komórek, bez inhibitora TrxR – 50  $\mu$ l homogenatu i bufor reakcyjny,
- homogenaty komórek z inhibitorem TrxR – 50  $\mu$ l homogenatu, inhibitor TrxR i bufor reakcyjny.

Po dodaniu buforu reakcyjnego i dokładnym wymieszaniu śledzono kinetykę reakcji poprzez pomiar absorbancji roztworu przy długości fali 412 nm w czasie 0 – 20 minut w temperaturze 25°C. Aktywność reduktazy trio-redoksyny wyznaczono ze wzoru:

$$\text{Aktywność TrxR} = \frac{B}{(T2 - T1) \times V} \times \text{rozcieńczenie badanej próby} = \frac{mU}{mL}$$

gdzie: B – ilość wytworzonego TNB, odczytana z krzywej wzorcowej, T1 – czas pierwszego odczytu absorbancji [min], T2 – czas w przedziale 0-20 min., po którym absorbancja osiąga wartość maksymalną; czas ostatniego odczytu absorbancji [min], V – ilość próby dodanej do studzienki 96 dołkowej mikro płytki [ml].

### 10.13. ANALIZA STATYSTYCZNA

Wyniki badań, uzyskanych w przynajmniej 3 niezależnych eksperymentach, w 3-6 powtórzeniach każdy, przedstawiono w formie średniej arytmetycznej i średniego błędu średniej (SEM). Średnią arytmetyczną i średni błąd średniej obliczano przy użyciu programu Microsoft Excel (program pakietu Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation, USA). Do oceny istotności statystycznej uzyskanych wyników zastosowano analizę wariancji jednoczynnikowej ANOVA oraz test post-hoc Tukeya dla porównań wielokrotnych programu STATISTICA firmy StatSoft, USA.

## 11. WYNIKI

### 11.1. AKRYLOILOFERROCENY (POCHODNE KWASU AKROLEINOWEGO) ORAZ AZAFERROCENY

#### 11.1.1. Cytotoksyczność pochodnych ferrocenyłowych

Cytotoksyczność ferrocenów określono na podstawie frakcji komórek, które po 24-godzinnej inkubacji ze wzrastającymi stężeniami (10-120  $\mu\text{mol/L}$ ) tych związków zdolne były do proliferacji. Żywotność komórek określano mikropłytkową metodą spektrofotometryczną z MTT. Odsetek żywych komórek w próbie obliczano w odniesieniu do komórek kontrolnych (komórki inkubowane w PBS), których żywotność arbitralnie przyjmowano za 100%. Na podstawie krzywych przeżywalności, za pomocą programu komputerowego GraphPad Prism Software, wyliczano stężenie  $\text{IC}_{50}$  związków, które powodowało 50% spadek żywotności traktowanych komórek w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Krzywe przeżywalności komórek linii HepG2 oraz A549 eksponowanych przez 24 godziny na działanie badanych metaloorganicznych pochodnych, wyznaczone przy użyciu metody MTT, przedstawiono na Rys. 10. W tabeli 3 zamieszczono wartości stężeń  $\text{IC}_{50}$  obliczonych dla obu linii komórek po ich potraktowaniu związkami **15**, **15Cl**, **12a** i **12b**.

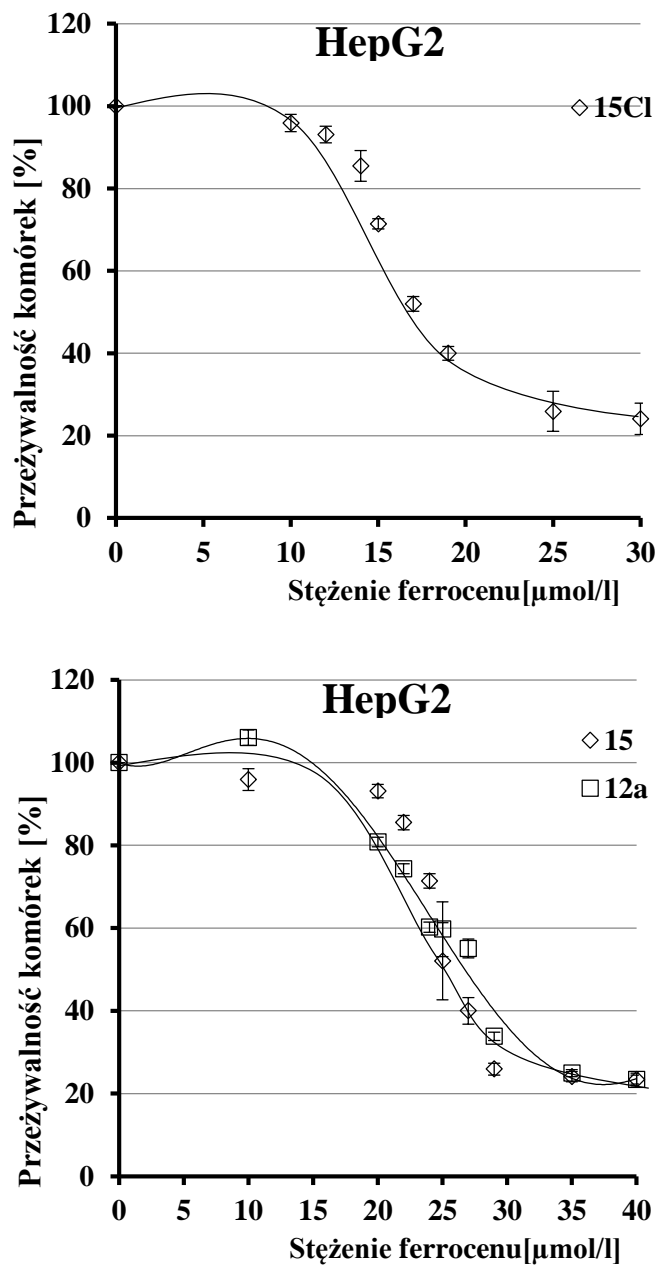
**Tabela 3.** Wartości stężeń  $\text{IC}_{50}$  pochodnych **15**, **15Cl**, **12a** i **12b** wyznaczone dla linii komórek HepG2 oraz A549. Komórki inkubowano ze związkami metaloorganicznymi przez 24 godziny (efekt cytotoksyczny).

Linia komórkowa	Cytotoksyczne właściwości pochodnych ferrocenów $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]			
	<b>15</b>	<b>15Cl</b>	<b>12a</b>	<b>12b</b>
HepG2	25,5 $\pm$ 0,8	17,5 $\pm$ 1,4	25,0 $\pm$ 1,9	62,0 $\pm$ 1,1
A549	61,0 $\pm$ 2,5	59,0 $\pm$ 4,3	62,5 $\pm$ 4,3	58,0 $\pm$ 3,6

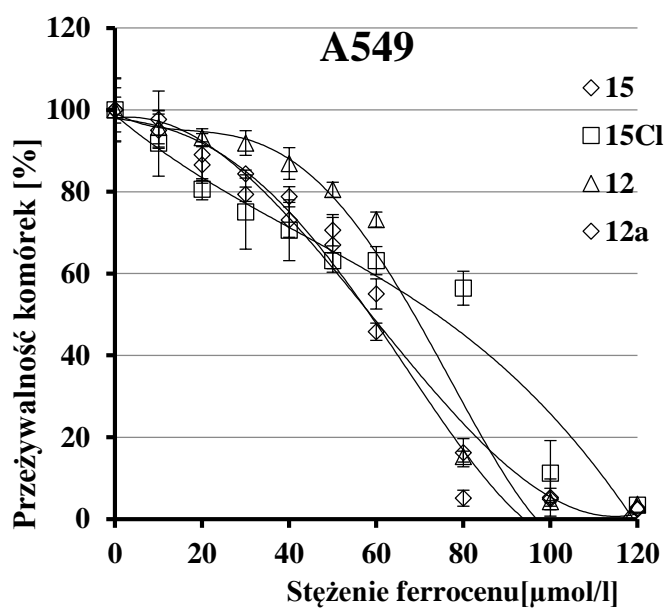
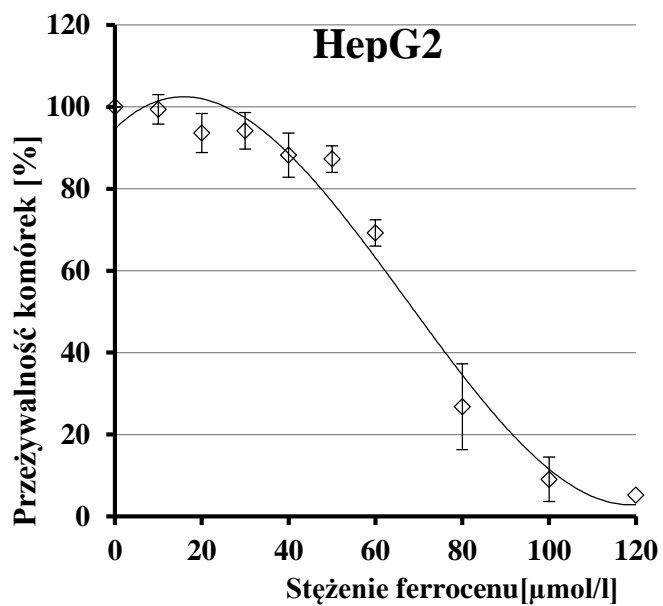
Wszystkie pochodne metaloorganiczne przejawiały właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych linii HepG2 oraz A549. Stopień zahamowania proliferacji komórek nowotworowych i stężenie  $\text{IC}_{50}$  związków wydają się być skorelowane zarówno z ich strukturą chemiczną jak i z rodzajem linii komórkowej. Komórki nabłonka gruczołakoraka płuc A549 charakteryzował niski poziom wrażliwości na wszystkie cztery badane ferroceny. Stężenie  $\text{IC}_{50}$ , wyliczone na podstawie krzywych przeżywalności dla wszystkich ferrocenów mieściło się w zakresie 60-65  $\mu\text{mol/L}$ . Bardziej wrażliwe były komórki wątroby HepG2 (stężenie  $\text{IC}_{50}$ =17-25  $\mu\text{mol/L}$ ). Z czterech testowanych związków, trzy charakteryzowały się wysoką efektywnością hamowania proliferacji komórek. Stężenie  $\text{IC}_{50}$  zawarte było w przedziale 17-25  $\mu\text{mol/L}$ . Najbardziej cytotoksyczne okazały się proste pod względem budowy chemicznej akryloiloferroceny (związki **15** i **15Cl**). W oparciu o wyniki MTT oraz dalszych badań nad właściwościami genotoksycznymi, generowania reaktywnych form tlenu oraz indukcji apoptozy, wykazano, iż chlor obecny w strukturze metaloorganicznej pochodnej zwiększał jej cytotoksyczność w porównaniu ze związkiem

macierzystym. Związek **12a** natomiast, w niskim stężeniu (10  $\mu\text{mol/L}$ ) pobudzał proliferację komórek.

Do dalszych badań nad molekularnymi mechanizmami aktywności przeciwnowotworowej pochodnych ferrocenyowych wybrano najbardziej wrażliwą linię HepG2 oraz związki **15**, **15Cl** i **12a** jako najbardziej cytotoksyczne.



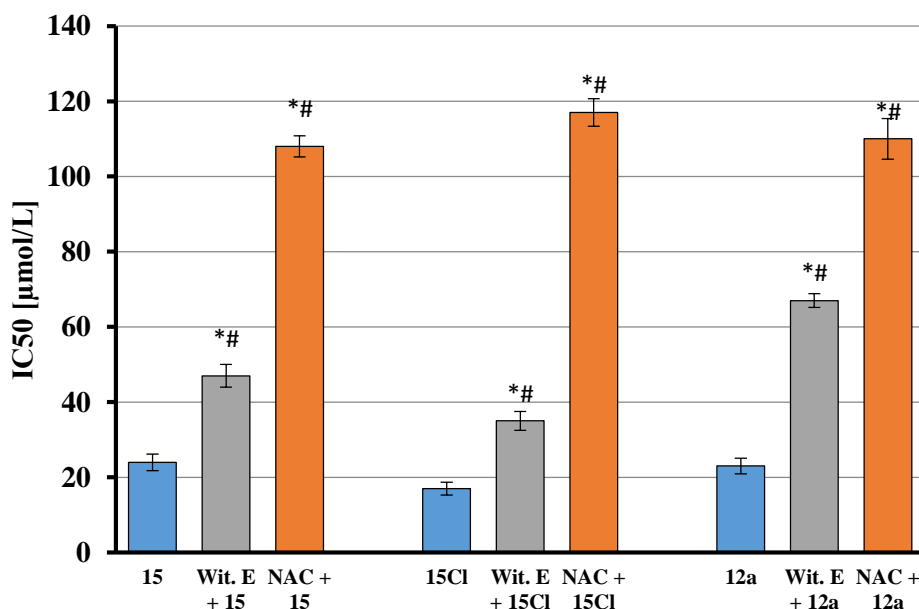
**Rysunek 6a.** Krzywe przeżywalności komórek linii HepG2, inkubowanych przez 24 godziny z ferrocenyłowymi pochodnymi **15**, **15Cl**, **12a**.



**Rysunek 6b.** Krzywe przeżywalności komórek linii HepG2 oraz A549, inkubowanych przez 24 godziny z ferrocenylowymi pochodnymi **15**, **15Cl**, **12** lub **12a**.

### 11.1.2. Udział reaktywnych form tlenu (RFT) w aktywności cytotoksycznej pochodnych ferrocenyowych

W celu określenia udziału reaktywnych form tlenu RFT w cytotoksycznej aktywności ferrocenów 15, 15Cl oraz 12a, komórki HepG2 przed hodowlą ze związkami, inkubowano w ciągu 1 godziny z przeciwutleniaczami: N-acetylocysteiną (NAC), lub rozpuszczalną w wodzie pochodną witaminy E (Trolox). Uzyskane wyniki wskazują, że preinkubacja komórek z przeciwutleniaczami powodowała znaczący spadek właściwości cytotoksycznych metaloorganicznych pochodnych, co znalazło odzwierciedlenie w zwiększeniu wartości stężenia  $IC_{50}$ . Na Rys. 7 przedstawiono wartości stężenia  $IC_{50}$  ferrocenów uzyskanych bez lub po godzinnej preinkubacji komórek z antyoksydantami NAC lub Troloxem. W przypadku zastosowania antyoksydantów, zaobserwowano znaczny, istotnie statystycznie wzrost wartości  $IC_{50}$  dla wszystkich użytych ferrocenów. Warto jednak zaznaczyć, iż NAC była bardziej skuteczna niż Trolox (w każdym wariancie eksperymentu), jako zmiatacz wolnych rodników generowanych przez ferroceny. Wyniki te mogą wskazywać, że głównym miejscem działania stosowanych metaloorganicznych pochodnych jest cytosol.



**Rysunek 7.** Wpływ przeciwutleniaczy NAC (3 mmol/L) oraz Trolox (Wit. E) (50  $\mu\text{M}$ ) na właściwości cytotoksyczne ferrocenów 15, 15Cl oraz 12a względem komórek linii HepG2. Komórki przed inkubacją ze związkami metaloorganicznymi preinkubowano przez 1 godzinę z przeciwutleniaczami. Komórki traktowano ferrocenami w szerokim zakresie stężeń (0-120  $\mu\text{M}$ ) przez 24 godziny. Frakcję żywych komórek oceniano metodą MTT. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS), # $p < 0,05$  NAC vs. Trolox (Wit. E).

### 11.1.3. Cytostatyczna aktywność pochodnych ferrocenyowych

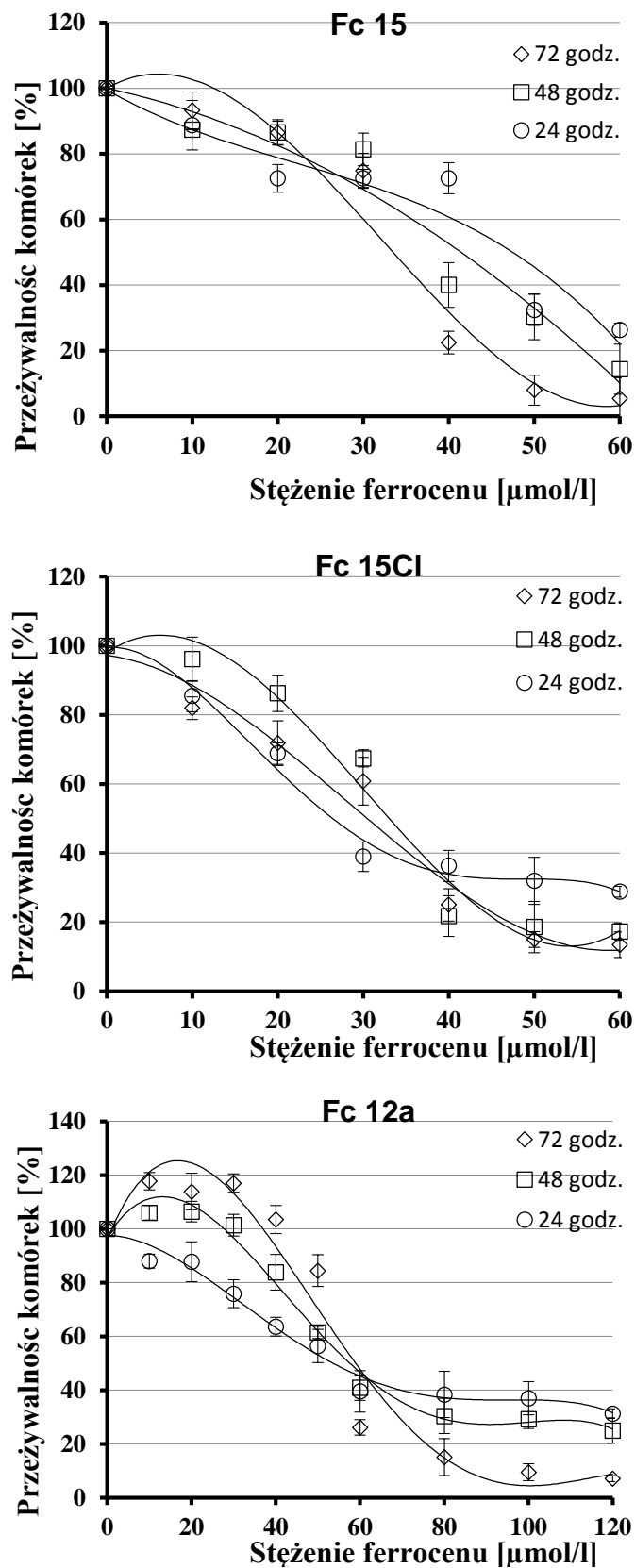
W celu oceny zdolności pochodnych ferrocenyowych 12a, 15, 15Cl do zahamowania proliferacji komórek raka wątroby HepG2, zastosowano czasy inkubacji dłuższe od czasów podwojenia tzw. *cell doubling time* który w przypadku komórek linii HepG2 wyniósł  $20 \pm 3$  godzin. Komórki nowotworowe inkubowano ze związkami przez 48

i 72 godz., a następnie oznaczano procent żywych komórek w hodowli metodą MTT. Krzywe przeżywalności komórek zamieszczono na Rys. 8.

Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, że przedłużony czas inkubacji komórek nowotworowych z pochodnymi ferrocenyłowymi skutkuje niższą ich wydajnością działania w zakresie mechanizmów cytotoksycznych i antyproliferacyjnych, niż ma to miejsce w przypadku klasycznego testu cytotoksyczności MTT i 24 godzinnej ekspozycji komórek na badane metaloorganiczne pochodne. Obliczone stężenie  $IG_{50}$  dla ferrocenów **15** i **15Cl** było wyższe o około 10  $\mu\text{mol/L}$ , w stosunku do wartości  $IC_{50}$ . Wyjątkowo wyraźny spadek antyproliferacyjnego działania odnotowano natomiast dla ferrocenu **12a**. Stężenie  $IG_{50}$  wyliczone dla stosowanych czasów inkubacji było około 3-krotnie większe niż wartość  $IC_{50}$  tego związku. Dodatkowo, w przypadku **12a**, przedłużenie czasu ekspozycji komórek na niskie dawki badanych pochodnych ferrocenyłowych powodowało wzrost ich proliferacji. Efekt taki jest niepożądany w kontekście potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych badanych związków. W tabeli 4 przedstawiono wartości  $IG_{50}$  wyliczone na podstawie krzywych przeżywalności komórek HepG2 eksponowanych na działanie **15**, **15Cl** lub **12a**, w różnych czasach inkubacji.

**Tabela 4.** Wartości stężenia  $IG_{50}$  ferrocenów **15**, **15Cl** oraz **12a** względem linii HepG2. Komórki inkubowano z metaloorganicznymi pochodnymi przez 24, 48 lub 72 godziny (efekt cytostatyczny).

Czas inkubacji	Cytostatyczne właściwości pochodnych ferrocenów, $IG_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]		
	<b>15</b>	<b>15Cl</b>	<b>12a</b>
24 godziny	32,5±0,7	30,0±1,0	60,0±1,6
48 godziny	36,5±1,0	31,5±1,1	59,0±1,1
72 godziny	34,5±1,9	27,5±2,5	57,0±2,5



**Rysunek 8.** Krzywe przeżywalności komórek linii HepG2 inkubowanych przez 24, 48 lub 72 godziny z ferrocenylowymi pochodnymi 15, 15Cl lub 12a.



#### 11.1.4. Poziom reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych ekspozowanych na działanie badanych metaloorganicznych pochodnych

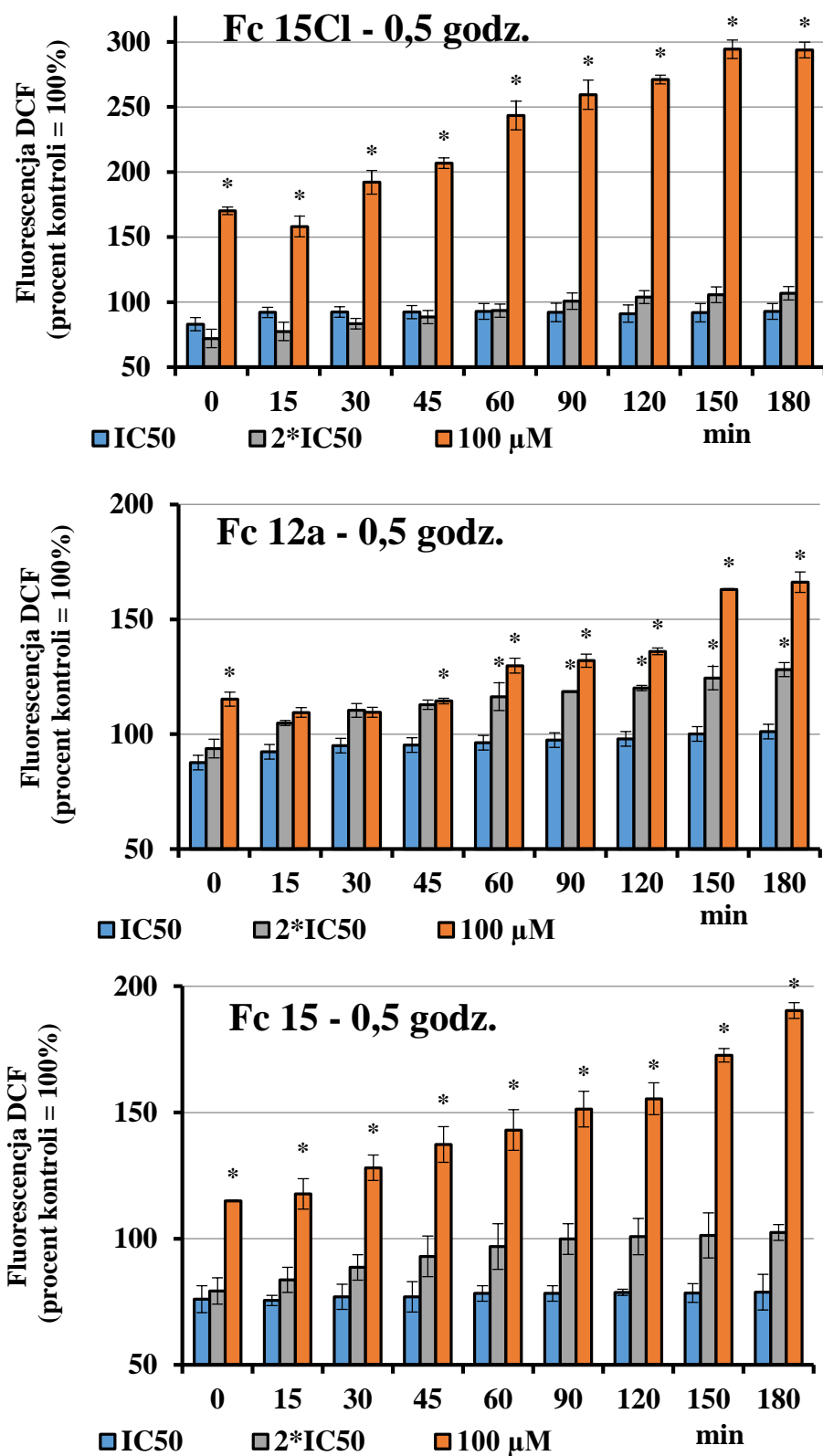
Reaktywne formy tlenu, generowane w komórkach nowotworowych HepG2 poddanych działaniu ferrocenów (głównie  $H_2O_2$ ) identyfikowano przy użyciu fluorescencyjnej sondy  $H_2DCFD-DA$ . Komórki HepG2 traktowano następującymi stężeniami związków:  $IC_{50}$ ,  $2xIC_{50}$  oraz  $100 \mu mol/L$ . Zastosowano trzy czasy inkubacji: 0,5; 3 oraz 6 godzin. Poziom generowanych reaktywnych form tlenu był skorelowany z czasem inkubacji oraz stężeniem z testowanych pochodnych.

W przypadku 30 minutowej inkubacji komórek z ferrocenami największy wzrost poziomu RFT obserwowany był przy zastosowaniu największego stężenia  $100 \mu M$ . Zależność ta obowiązywała dla wszystkich trzech testowanych cząsteczek. Ferroceny **15**, **15Cl** i **12a** dodane do środowiska komórek HepG2 w najwyższym stężeniu powodowały odpowiednio około 1,5-, 2- lub 3-krotny wzrost RFT względem nietraktowanych komórek kontrolnych. Dla niższych stężeń ferrocenów **15** i **15Cl** ( $IC_{50}$ ,  $2xIC_{50}$ ) nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian poziomu RFT. Pochodna **12a** w stężeniu  $2xIC_{50}$  powodowała nieznaczny wzrost poziomu RFT (około 20% w porównaniu z komórkami kontrolnymi).

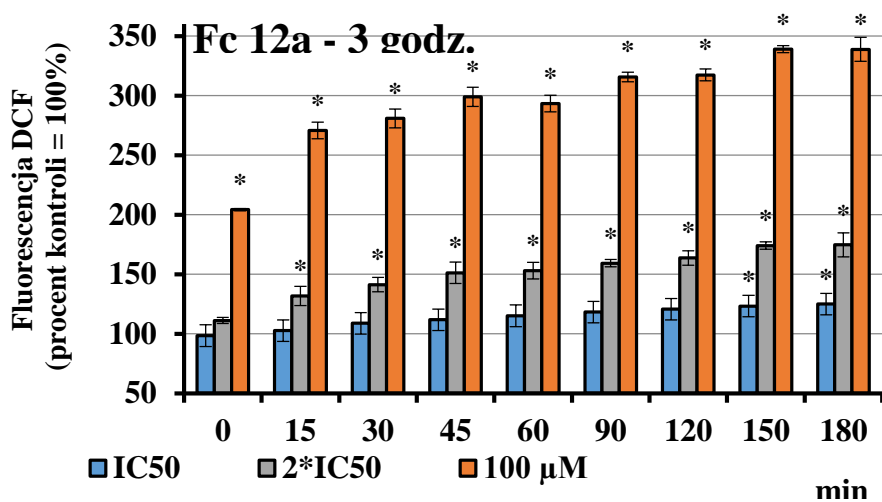
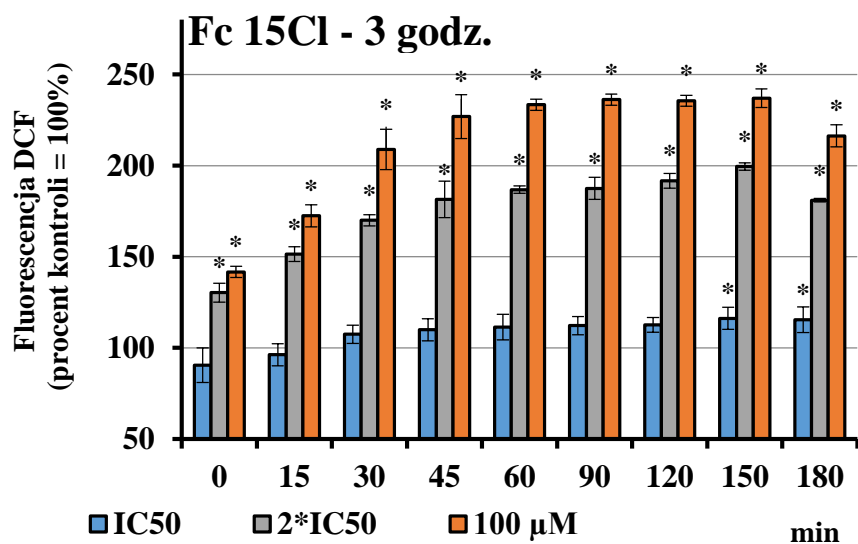
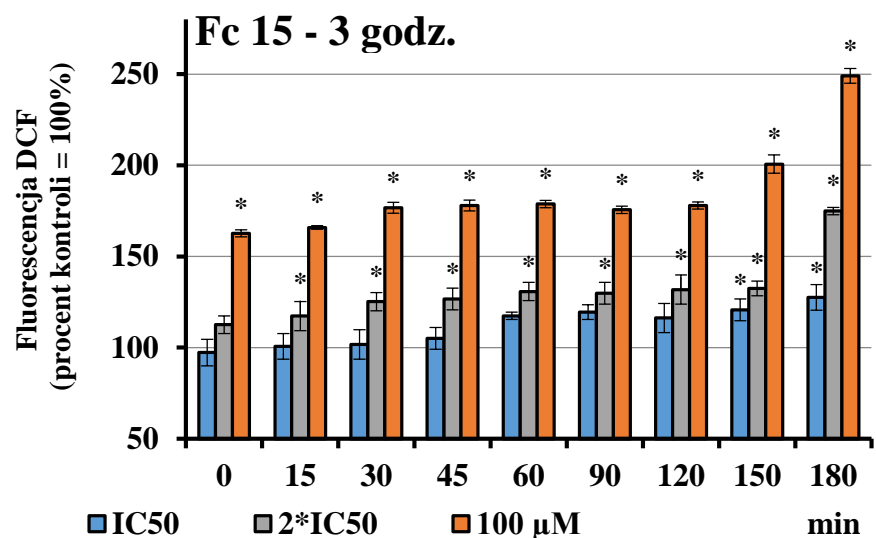
Wydłużenie czasu inkubacji do trzech godzin spowodował wzrost poziomu RFT, a zmiany te były skorelowane ze stężeniem związków i czasu od zakończenia inkubacji. Ferroceny zawierające w swej strukturze atom chloru wykazywały największą aktywność prooksydacyjną, generowały najwięcej RFT w komórkach nowotworowych. Stężenie  $2xIC_{50}$  **15Cl** i **12a** powodowało około 1,5-2 krotny wzrost RFT w stosunku do komórek kontrolnych. W przypadku największego zastosowanego stężenia ( $100 \mu M$ ), dla wszystkich badanych związków zarejestrowano 2,5 – 3,5- krotny wzrost poziomu RFT w porównaniu z kontrolą. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w poziomie reaktywnych form tlenu, gdy związki stosowano w stężeniu  $IC_{50}$ .

W 6 godzinnej ekspozycji komórek na badane związki, wzrost reaktywnych form tlenu w przypadku najwyższego stężenia ( $100 \mu M$ ) wzrastał progresywnie wraz z czasem od zakończenia inkubacji. W przypadku ferrocenu **15** i **15Cl** kinetyka zmian poziomu RFT podczas 3 godz. okresu poinkubacyjnego była procesem dwuetapowym.

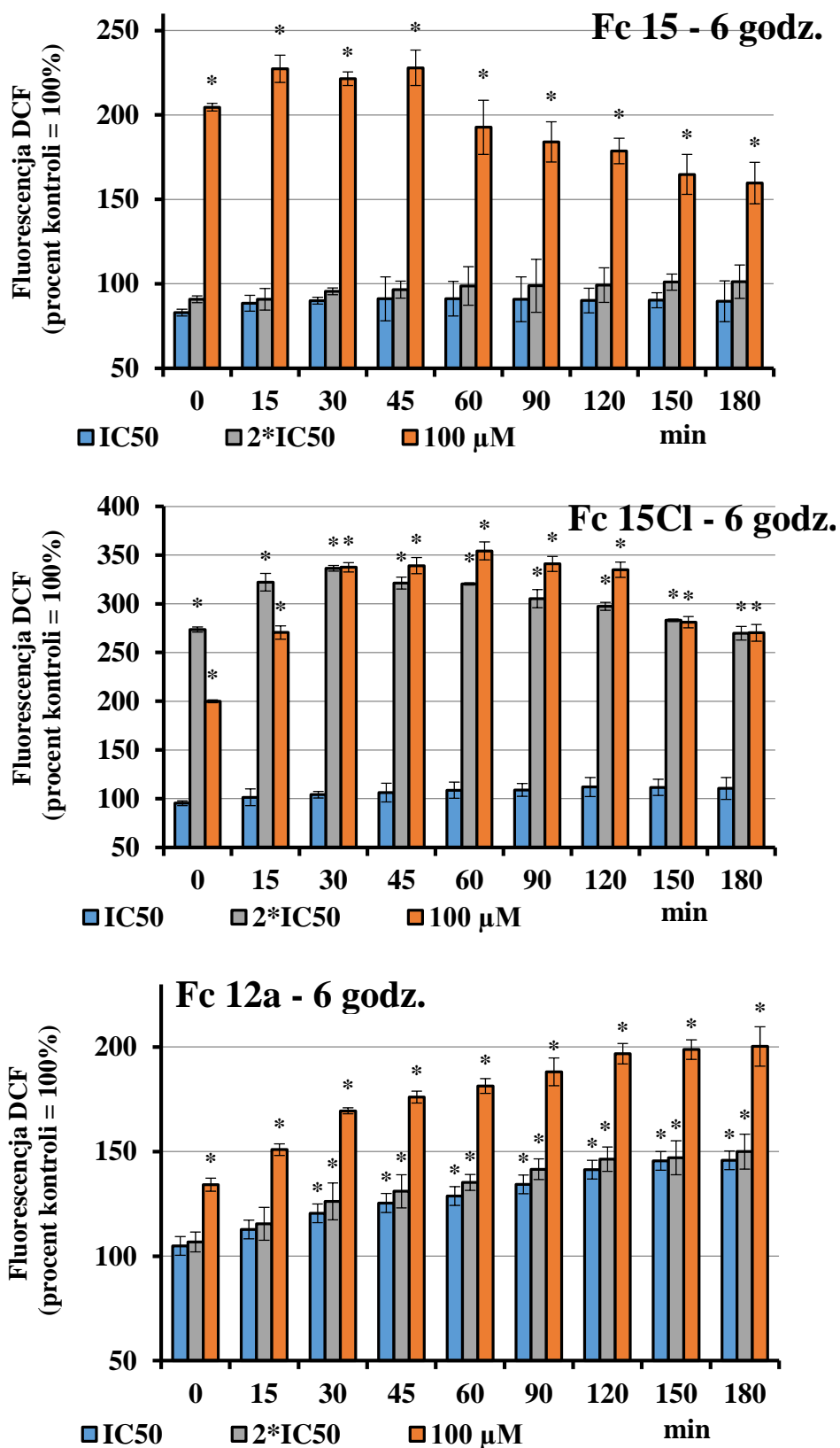
W pierwszym etapie następował stopniowy wzrost reaktywnych form tlenu, które osiągały maksymalny poziom w 45 (**15**) i 60 minucie (**15Cl**). Po dłuższym czasie zaobserwowano stopniowy spadek poziomu RFT (60-180 min). Istotny statystycznie wzrost poziomu RFT w komórkach traktowanych najniższym stężeniem  $IC_{50}$  obserwowano jedynie dla związku **12a**.



**Rysunek 9a.** Ilość reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych linii HepG2 przez badane ferrocenylowe pochodne **15**, **15Cl**, **12a** – czas inkubacji 0,5 godz.. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

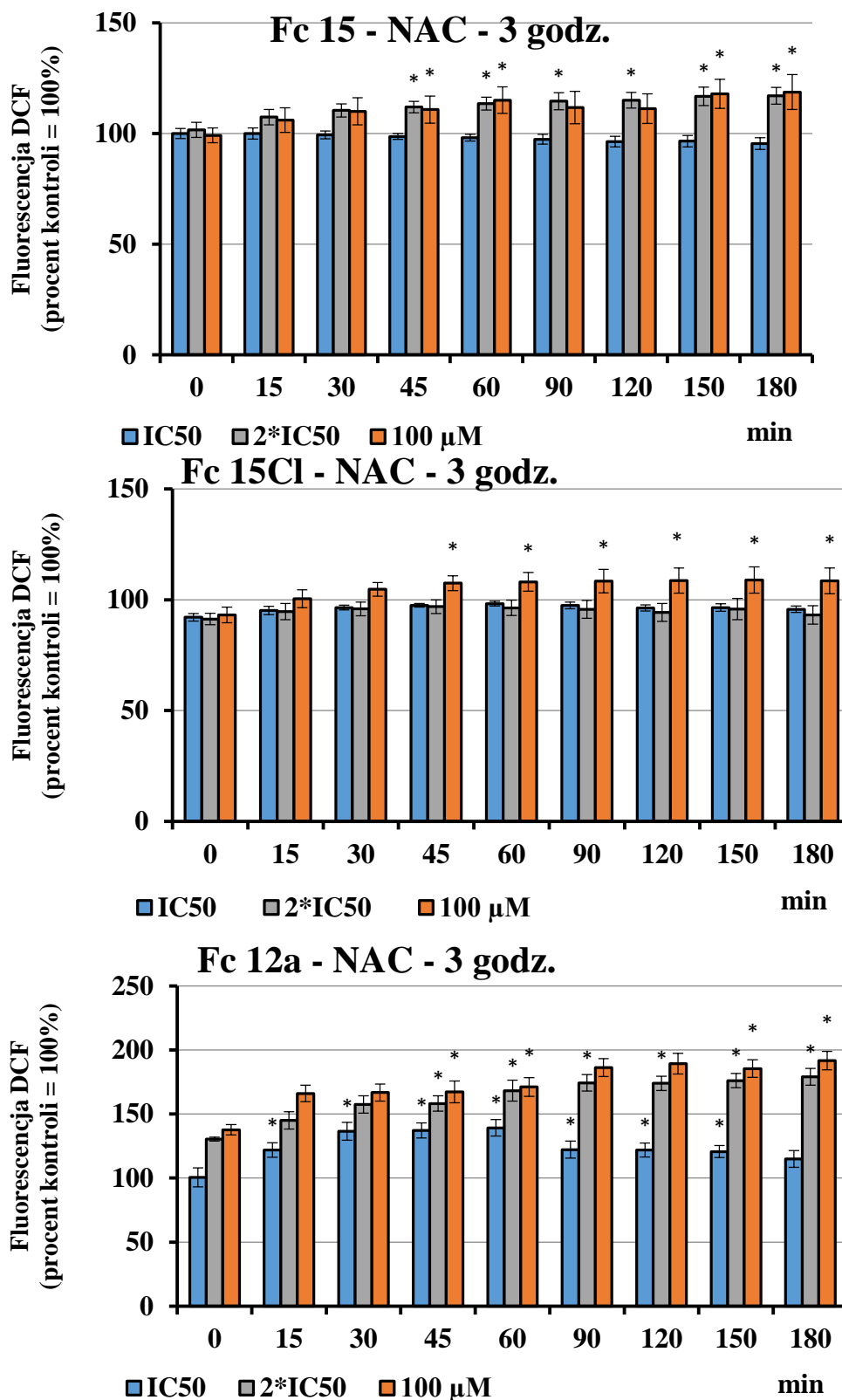


**Rysunek 9b.** Ilość reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych linii HepG2 przez badane ferrocenylowe pochodne **15**, **15Cl**, **12a** – czas inkubacji 3 godz.. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

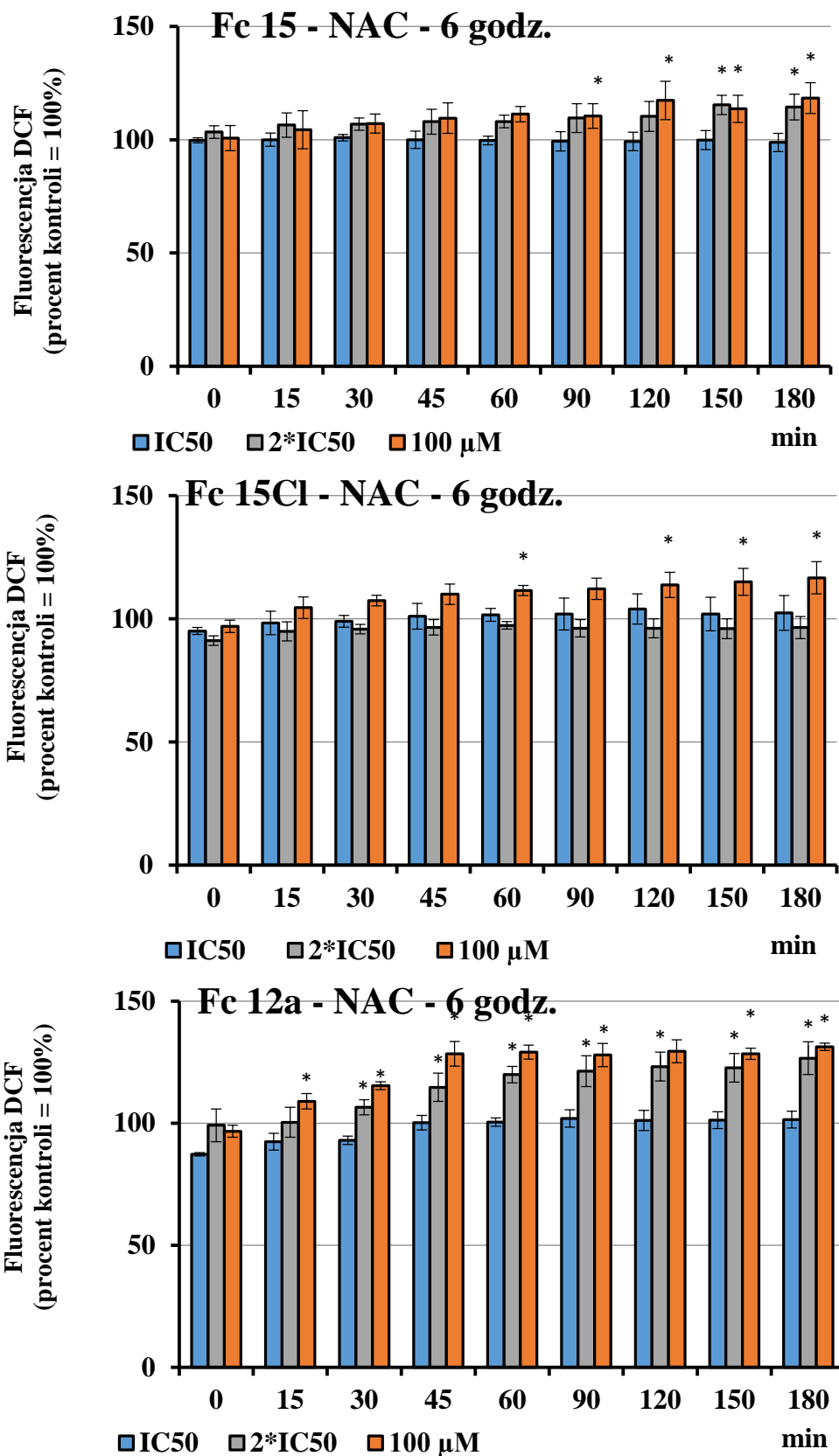


**Rysunek 9c.** Ilość reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych linii HepG2 przez badane ferrocenyłowe pochodne 15, 15Cl, 12a – czas inkubacji 6 godz.. \* $p < 0,05$  vs. Kontrola (komórki traktowane PBS).

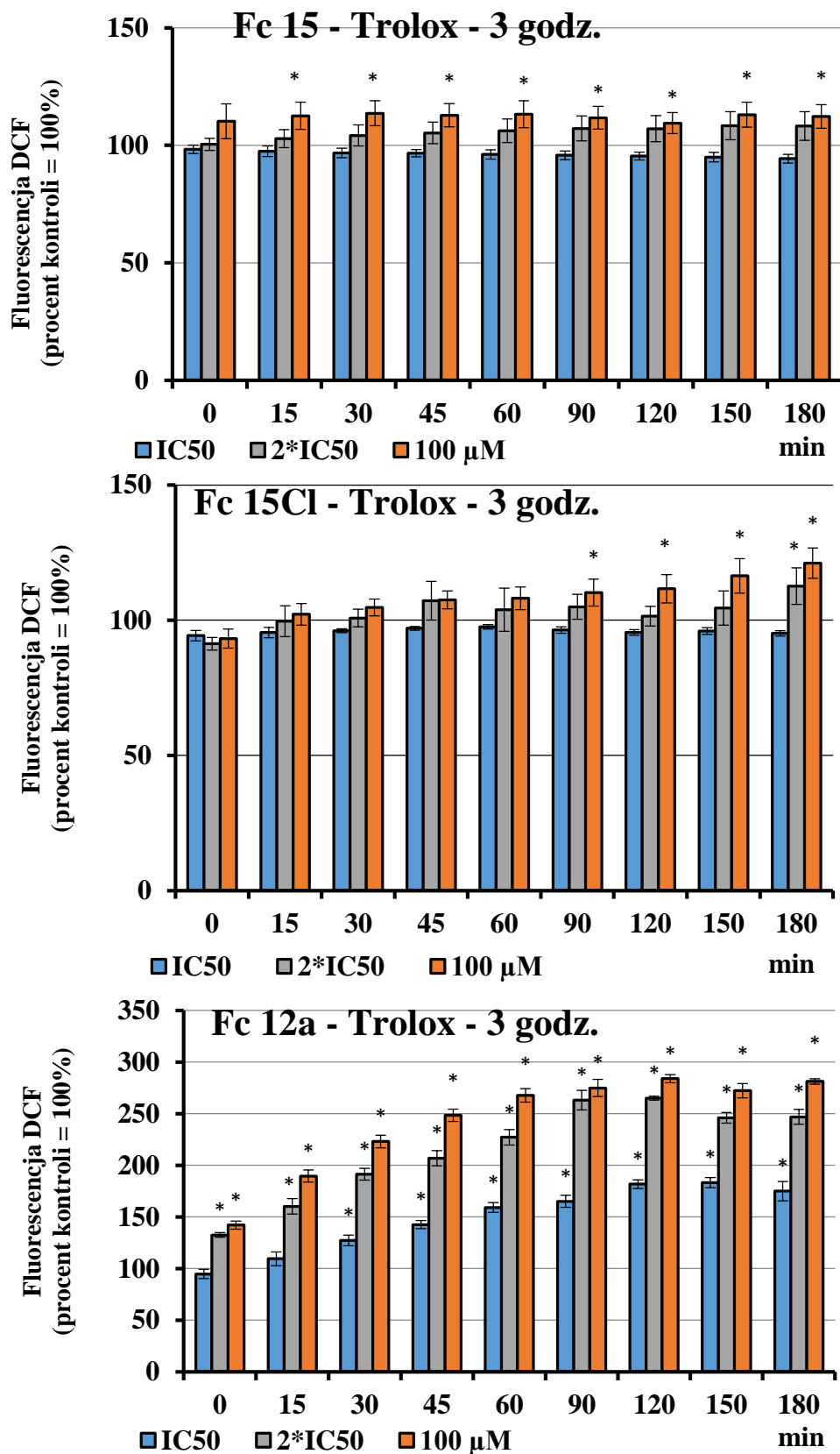
Badanie wpływu przeciwutleniaczy NAC i Troloxu na wzrost poziomu reaktywnych postaci tlenu w komórkach traktowanych ferrocenami **15**, **15Cl** lub **12a** wykonywane były dla czasu inkubacji 3 oraz 6 godzin. Czas 0,5 godziny został pominięty ze względu na fakt, iż po tym czasie inkubacji nie wykazano istotnych statystycznie zmian w kinetyce generowania ROS. Zastosowanie przeciwutleniaczy spowodowało spadek poziomu wytwarzania reaktywnych form tlenu w komórkach HepG2. Taka zależność obserwowana była dla wszystkich zastosowanych stężeń ferrocenów. Wyniki wskazują, iż efektywniejszym działaniem charakteryzuje się przeciwutleniacz NAC. Potwierdzają również wcześniejsze badania wpływu RFT na cytotoksyczności metaloorganicznych pochodnych.



**Rysunek 10a.** Ilość reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych linii HepG2 przez badane ferrocenylowe pochodne **15**, **15Cl**, **12a** po zastosowaniu godzinnej preinkubacji z NAC – czas inkubacji 3 godz.. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

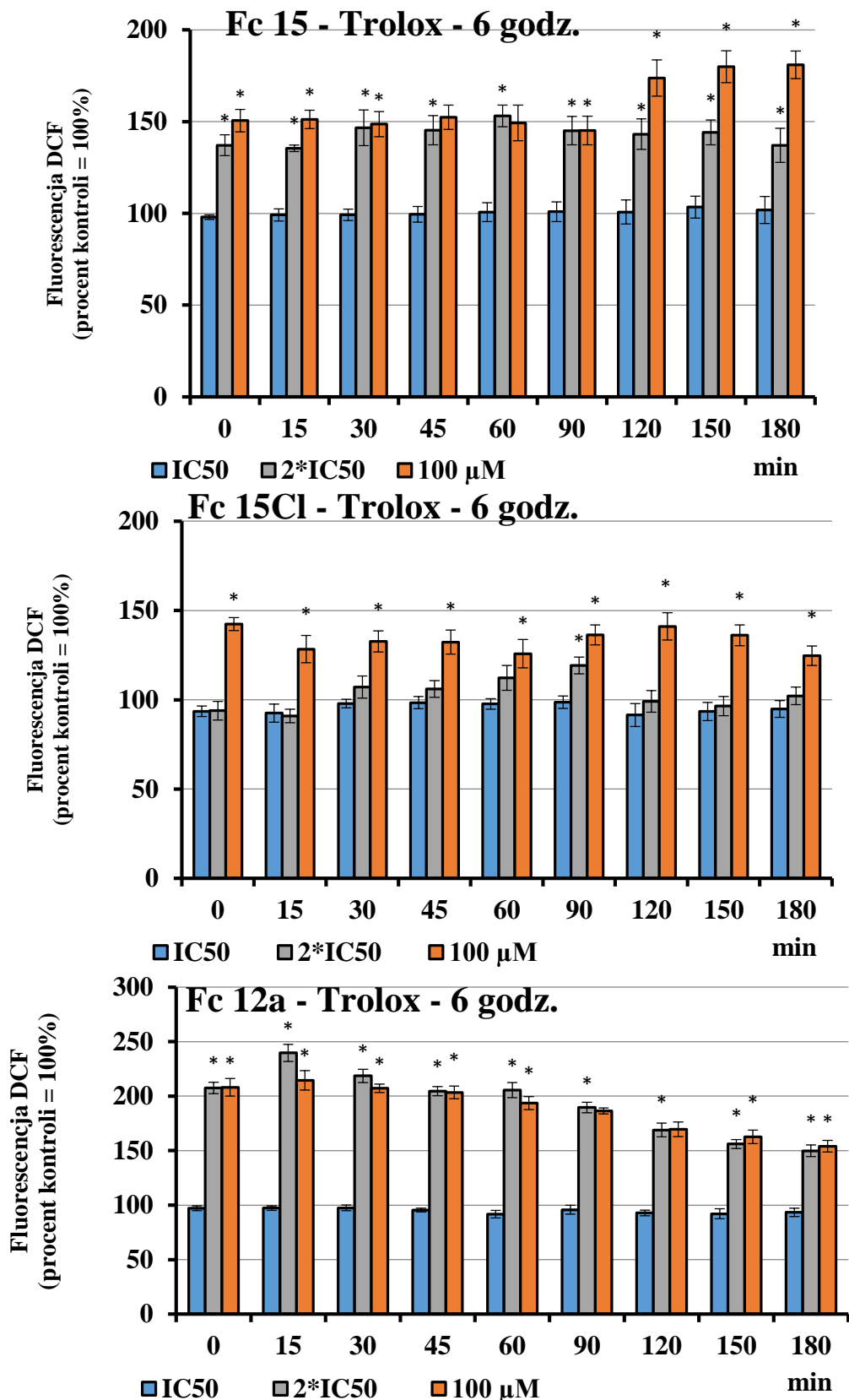


**Rysunek 10b.** Ilość reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych linii HepG2 przez badane ferrocenyłowe pochodne **15**, **15Cl**, **12a** po zastosowaniu godzinnej preinkubacji z NAC – czas inkubacji 6 godz.. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).



**Rysunek 11a.** Ilość reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych linii HepG2 przez badane ferrocenylowe pochodne **15**, **15Cl**, **12a** po zastosowaniu godzinnej preinkubacji z Troloxem – czas inkubacji 3 godz.. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).





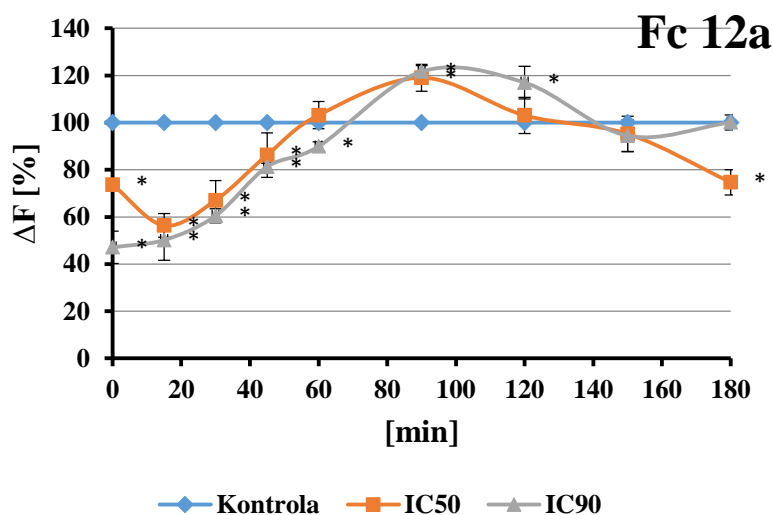
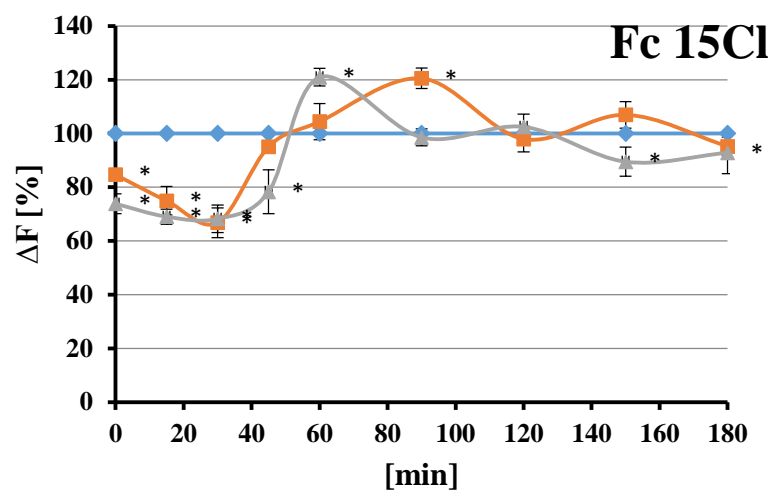
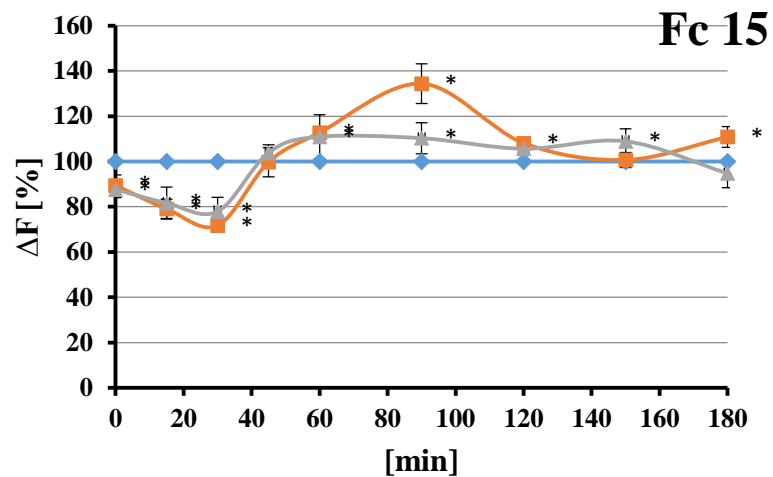
**Rysunek 11b.** Ilość reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych linii HepG2 przez badane ferrocenylowe pochodne **15**, **15Cl**, **12a** po zastosowaniu godzinnej preinkubacji z Troloxem – czas inkubacji 6 godz.. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

### 11.1.5. Wpływ metaloorganicznych pochodnych na potencjał mitochondrialny

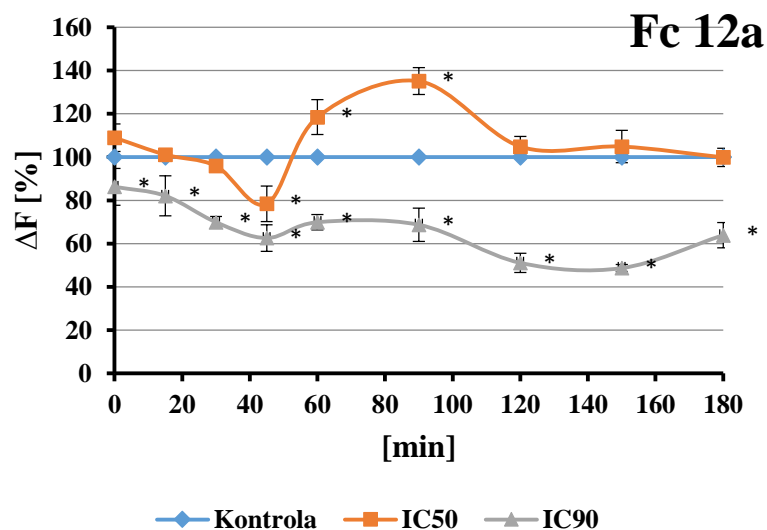
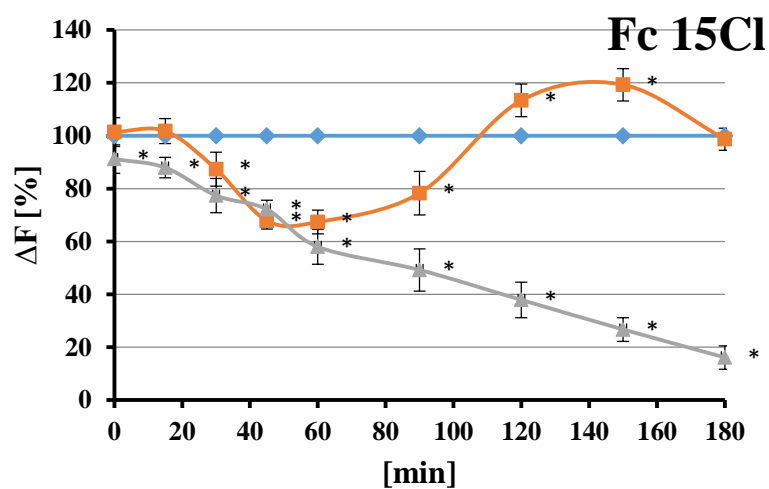
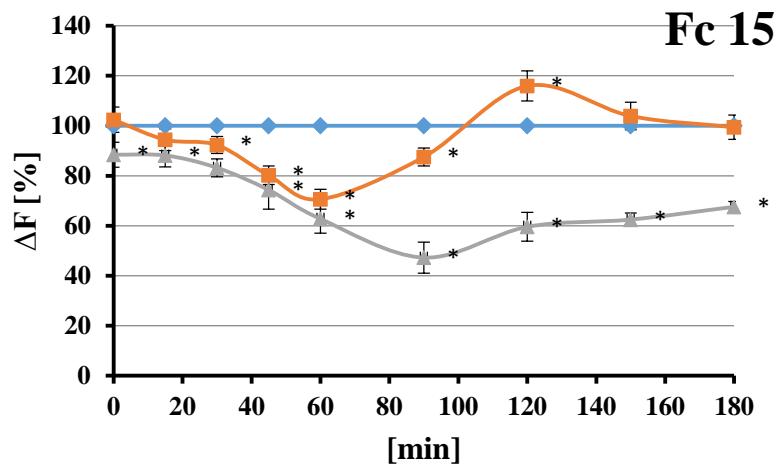
Cechą charakterystyczną wczesnych etapów apoptozy jest zaburzenie funkcjonowania mitochondriów, przejawiające się zmianą ich potencjału błonowego oraz potencjału redox. W celu określenia aktywności proapoptotycznej badanych ferrocenów dokonano analizy potencjału mitochondrialnego komórek linii HepG2 inkubowanych przez 24 godz. z ferrocenami **15**, **15Cl** i **12a**. Uzyskane wyniki wskazują, iż badane pochodne przejawiają właściwości proapoptotyczne. Związki te, powodują zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi_m$ ) komórek HepG2, co świadczy o indukcji zaprogramowanej śmierci, która może przebiegać głównie na szlaku mitochondrialnym. Inkubacja komórek HepG2 z ferrocenami powodowała istotne zaburzenia potencjału mitochondrialnego na skutek depolaryzacji, jak i hiperpolarizacji błony mitochondrialnej. W przypadku 0,5 oraz 3 godzinnej inkubacji komórek z ferrocenami, w trakcie trwania 180 minutowego pomiaru, zaobserwowano zarówno proces depolaryzacji, jak i repolaryzacji błony mitochondrialnej HepG2. Zastosowanie najdłuższego czasu inkubacji (6 godzin) skutkowało detekcją stanu depolaryzacji. Zmiany  $\Delta\Psi_m$  zależne były od rodzaju ferrocenu i jego stężenia. W komórkach traktowanych przez 30 min stężeniem  $IC_{50}$  pochodnej **15** obserwowano w pierwszym okresie (0-30 min) po zakończeniu inkubacji z ferrocenem depolaryzację błony mitochondrialnej oraz około 30% spadek potencjału mitochondriów, w porównaniu do komórek kontrolnych. W kolejnym okresie (60-90 min) obserwowano przejściowe stany repolaryzacji/hiperpolarizacji po czym następował powrót do stanu wyjściowego  $\Delta\Psi_m$ , ponowną repolaryzację (90-120 min). W przypadku 3 godzinnej inkubacji z **15** obserwowano dłuższy stan depolaryzacji błony mitochondrialnej komórek HepG2. Czas, w jakim obserwowano zmiany  $\Delta\Psi_m$  uwarunkowany był od stosowanych stężeń ferrocenu ( $IC_{50}$  lub  $IC_{90}$ ). W przypadku  $IC_{90}$  stan depolaryzacji trwał dłużej, a zjawiska całkowitej repolaryzacji nie zaobserwowano. Regeneracja potencjału mitochondrialnego i jego powrót do stanu początkowego obserwowano jedynie dla stężenia  $IC_{50}$ . Depolaryzacja błony mitochondriów w komórkach eksponowanych na działanie ferrocenu **15** przez 6 godzin, trwała jeszcze dłużej – aż do 90 minuty pomiaru. Maksymalny spadek  $\Delta\Psi_m$  dla stężenia  $IC_{50}$  wynosiła 20%, natomiast dla  $IC_{90}$  – 50% względem komórek kontrolnych.

Podobną kinetykę zmian  $\Delta\Psi_m$  obserwowano w komórkach inkubowanych przez 30 min ze stężeniem  $IC_{50}$  chloropochodnej ferroceny **15** (**15Cl**). Związek ten powodował jednak większy (40%) spadek  $\Delta\Psi_m$  w początkowym okresie (0-30 min) niż związek macierzysty (ferrocen **15** – 30%). W kolejnych okresach obserwowano takie same zmiany  $\Delta\Psi_m$  jak w przypadku ferrocenu macierzystego (**15**): przejściową hiperpolarizację błony mitochondrialnej (60-90 min), a następnie jej repolaryzację (90-120 min) i powrót do poziomu kontroli. Tendencja ta utrzymywała się zarówno dla  $IC_{50}$  jak i  $IC_{90}$  ferrocenu **15Cl**. 3 godzinna inkubacja komórek HepG2 z opisywaną metaloorganiczną pochodną w stężeniu  $IC_{90}$  powodowała znaczny spadek  $\Delta\Psi_m$ , postępujący wraz z całkowitym czasem pomiaru. W ciągu 180 minut hodowli poinkubacyjnej nie zaobserwowano wzrostu  $\Delta\Psi_m$  i zjawiska repolaryzacji. Nieco inaczej zachowywały się mitochondria komórek traktowanych mniejszym stężeniem związku **15**, gdzie w zakresie 90-150 min. pomiaru obserwowano hiperpolarizację, a w końcowym etapie repolaryzację.

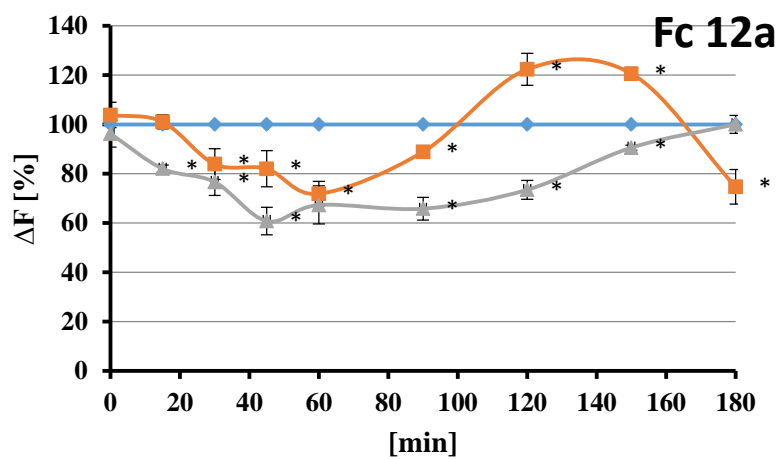
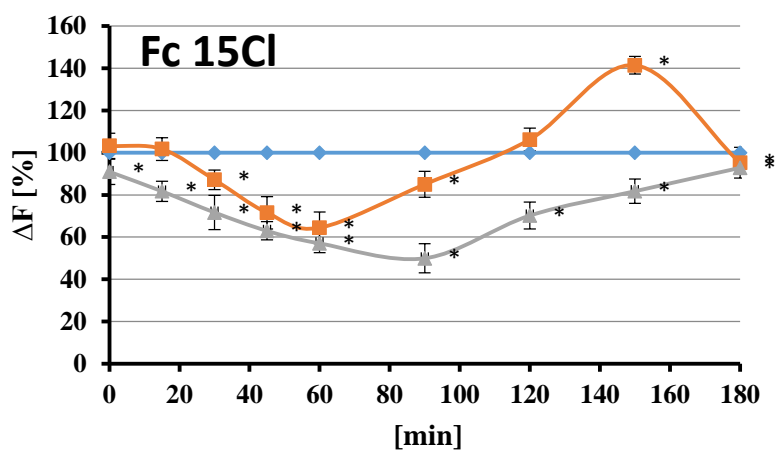
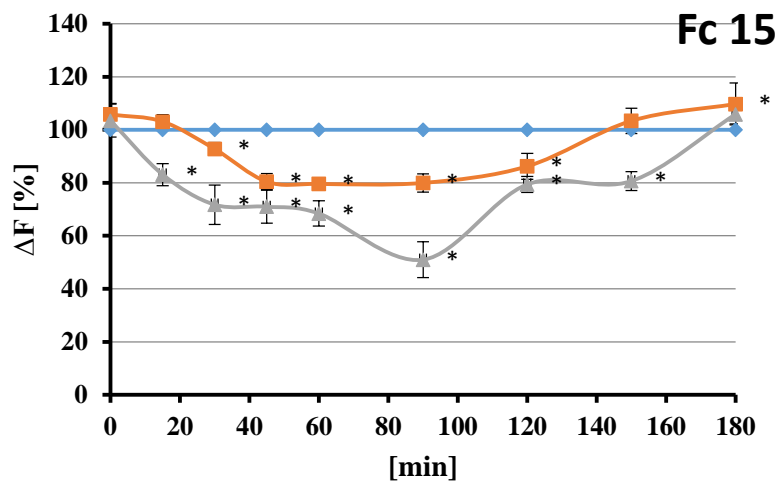
W wariacie eksperymentu, gdzie komórki nowotworowe traktowane były ferrocenem **12a** wartym odnotowania jest fakt, iż dla 30 minutowej hodowli poinkubacyjnej, zmiany ich potencjału mitochondrialnego (depolaryzacja) były znacznie szybsze i większe niż dla HepG2 inkubowanych z **15** czy **15Cl**. Spadek  $\Delta\Psi_m$  obserwowany był już w pierwszych 15 minutach pomiaru. Kolejnymi etapami zmian funkcjonowania mitochondriów była hiper- i repolaryzacja ich błon. W przypadku 3 lub 6 godzinnej inkubacji komórek z **12a**, kinetyka zmian  $\Delta\Psi_m$  przebiegała w sposób analogiczny, jak opisano to dla **15** i **15Cl**. Poziom zmierzonej wartości depolaryzacji oraz późniejszego powrotu do stanu homeostazy mitochondriów uwarunkowany był stosowanym stężeniem metaloorganicznej pochodnej.



**Rysunek 12a.** Zmiany potencjału mitochondrialnego komórek HepG2 eksponowanych na działanie ferrocenyowych pochodnych **15**, **15Cl**, **12a** – czas inkubacji 30 min. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).



**Rysunek 12b.** Zmiany potencjału mitochondrialnego komórek HepG2 eksponowanych na działanie ferrocenyowych pochodnych **15**, **15Cl**, **12a** – czas inkubacji 3 godz. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

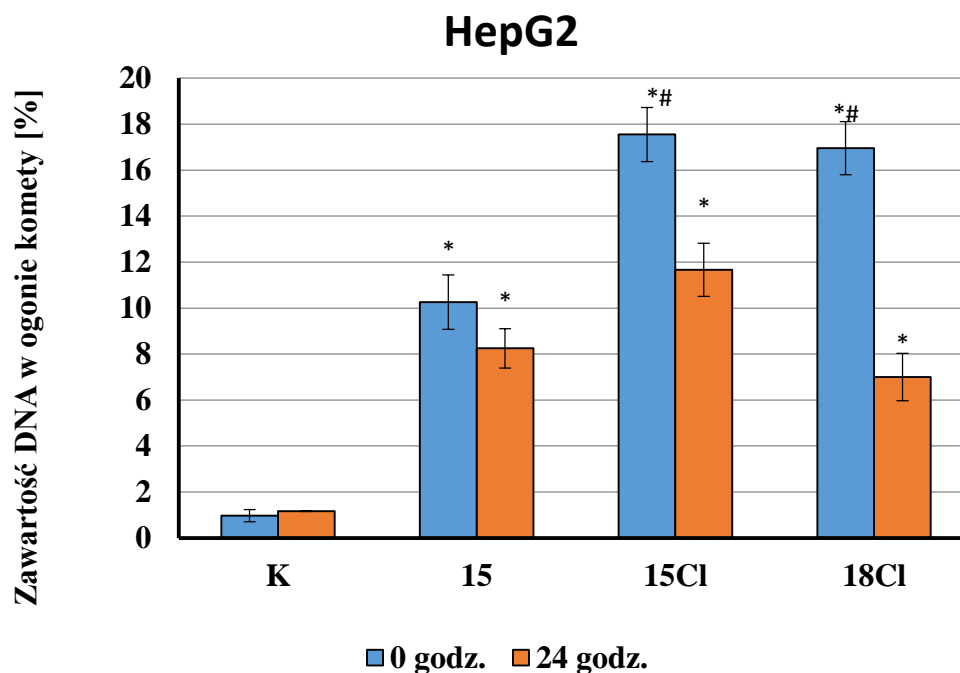


**Rysunek 12c.** Zmiany potencjału mitochondrialnego komórek HepG2 eksponowanych na działanie ferrocenyowych pochodnych **15**, **15Cl**, **12a** – czas inkubacji 6 godz. \*p<0,05 vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

### 11.1.6. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową

Uzyskane wyniki wskazują, że wszystkie trzy badane metaloorganiczne pochodne wykazują genotoksyczne właściwości powodując uszkodzenia DNA ludzkich komórek nowotworowych linii HepG2. Wszystkie zaobserwowane zmiany procentowej zawartości DNA w ogonie komet były istotne statystycznie i świadczyły o znacznym uszkodzeniu DNA przez badane związki. Należy podkreślić iż najefektywniejsze genotoksyczne działanie wykazywały ferroceny zawierające w swej strukturze atom chloru – **15Cl** oraz **12a**, które powodowały prawie 2-krotnie więcej uszkodzeń DNA, niż ferrocen **15**, który nie zawierał atomu chloru. Wyniki te wskazują, że obecność chloru w badanych pochodnych metaloorganicznych, odgrywa kluczową rolę w ich aktywności genotoksycznej oraz jak wykazały wcześniejsze badania – cytotoksycznej. Wysoką aktywność antyproliferacyjną chlorowanych pochodnych ferrocenów wobec komórek HepG2 potwierdzono przy użyciu testu MTT. Najwięcej uszkodzeń DNA (procentowa zawartość DNA w ogonie komety) stwierdzono bezpośrednio po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji komórek ze związkami.

W celu umożliwienia komórkom naprawy powstałych uszkodzeń DNA, zastosowano 24-godziną hodowlę poinkubacyjną, gdzie procent uszkodzeń DNA dla każdego z badanych ferrocenów był mniejszy. Ilość uszkodzeń DNA po tym czasie uległa znacznemu obniżeniu, co świadczy o tym, że komórki nowotworowe w tym czasie były w stanie naprawić część uszkodzeń DNA.



**Rysunek 13.** Uszkodzenia DNA generowane w komórkach nowotworowych linii HepG2 przez metaloorganiczne pochodne **15**, **15Cl** lub **12a**. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS), # $p < 0,05$  0 godz. vs. 24 godz..

**Komórki kontrolne**



**Fc 15 (IC<sub>50</sub>) 0 godz.**



**Fc 15 (IC<sub>50</sub>) 24 godz.**



**Fc 15Cl (IC<sub>50</sub>) 0 godz.**



**Fc 15Cl (IC<sub>50</sub>) 24 godz.**



**Fc 12a (IC<sub>50</sub>) 0 godz.**



**Fc 12a (IC<sub>50</sub>) 24 godz.**



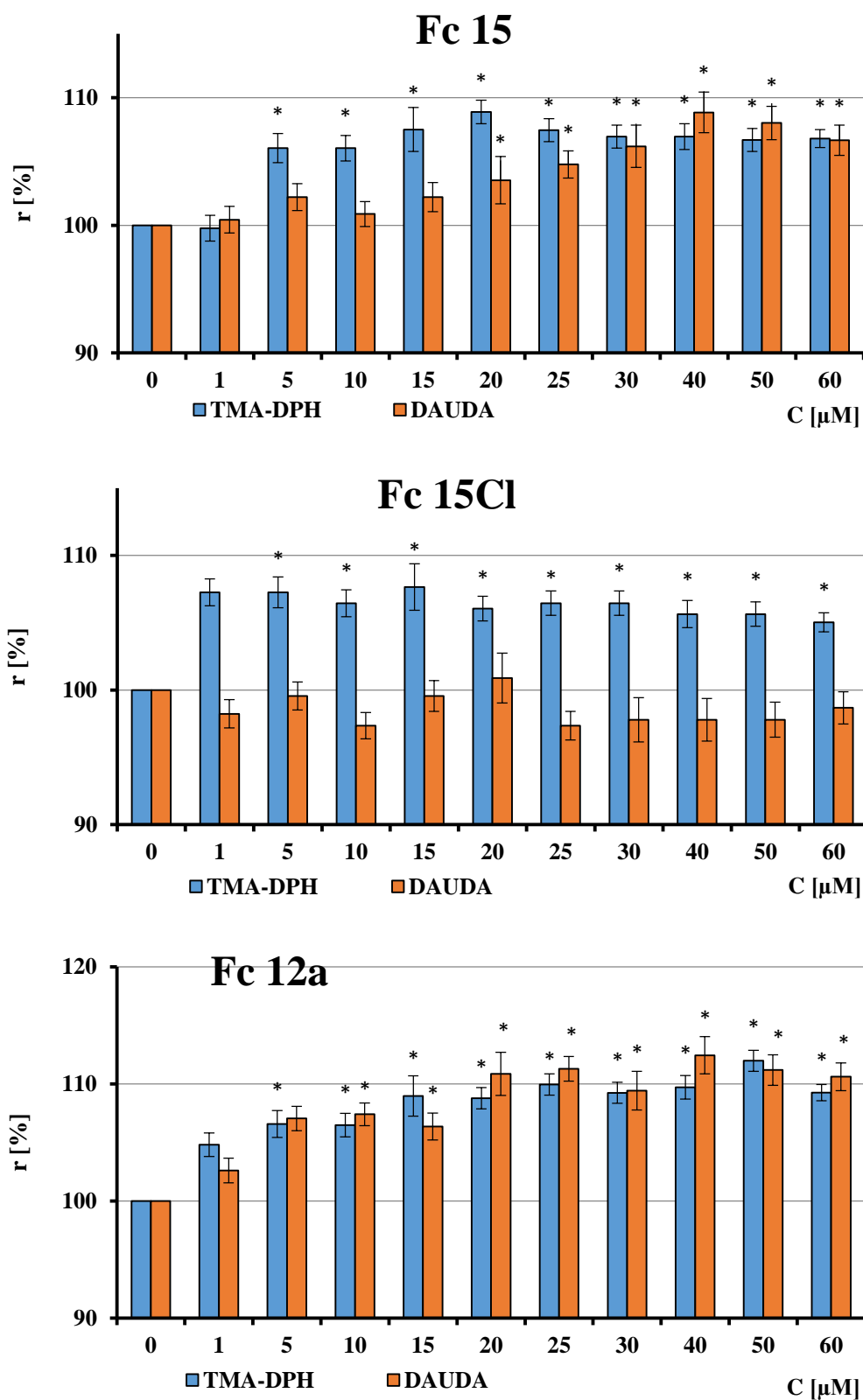
**Rysunek 14.** Zdjęcia komet DNA, uzyskanych z ludzkich komórek nowotworowych linii HepG2, poddanych działaniu metaloorganicznych pochodnych **15**, **15Cl** i **12a**. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse, Tokyo, Japan.



### 11.1.7. Zmiany płynności błony plazmatycznej wywołane przez metaloorganiczne pochodne

Zmiany mikro lepkości wewnętrznej błony komórek linii HepG2 poddanych działaniu metaloorganicznych pochodnych badano przy użyciu 2 sond fluorescencyjnych, lokujących się na różnych głębokościach dwuwarstwy lipidowej błony: TMA-DPH lokującej się w warstwie powierzchniowej i DAUDA – lokującej się w rdzeniu hydrofobowym.

Wykazano, że badane ferroceny wpływają znacząco na właściwości błony plazmatycznej komórek linii HepG2, powodując zmiany jej lepkości wewnętrznej. W komórkach inkubowanych z ferrocenami zastosowanymi w szerokim zakresie stężeń (1-60  $\mu\text{mol/L}$ ) stwierdzono statystycznie istotny spadek płynności błony komórkowej w obrębie jej zewnętrznej warstwy (sonda TMA-DPH). Zmiany te obserwowano już przy najniższych ze stosowanych stężeń ferrocenów. Pozostały one w korelacji z zastosowanym stężeniem ferrocenu – 1  $\mu\text{mol/L}$  (**15Cl**, **12a**) oraz 5  $\mu\text{mol/L}$  (**15**). Najbardziej skutecznym okazał się związek **12a**, powodując około 10% spadek płynności błony komórkowej. Interesujące, że w komórkach traktowanych związkiem **15Cl** nie stwierdzono istotnych zmian płynności błony w jej obszarze hydrofobowym. Niechlorowana pochodna (związek **15**) była skuteczna jedynie w wyższych stężeniach (20-60  $\mu\text{mol/L}$ ) powodując spadek płynności błony w granicach 5-7%. Najbardziej skuteczna okazała się, pochodna **12a**, która powodowała spadek płynności błony komórek HepG2 zarówno w obszarach powierzchniowych jak i hydrofobowych już w stężeniu (5  $\mu\text{mol/L}$ ).



**Rysunek 15.** Zmiany płynności błon komórek HepG2 eksponowanych na działanie ferrocenylowych pochodnych 15, 15Cl lub 12a. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

## 11.2. FLAWONOIDOWE POCHODNE FERROCENYLOWE

### 11.2.1. Cytotoksyczność pochodnych ferrocenyłowych

Krzywe przeżywalności komórek nowotworowych linii HepG2, MCF-7, MDA-MB-231 oraz CCRF-CEM inkubowanych z badanymi ferrocenyłowymi pochodnymi flawonoidów, wyznaczone metodą MTT przedstawiono na Rys. 16a-b.

Cytotoksyczność związków określono na podstawie frakcji komórek, które przeżyły 24 godziną inkubację w środowisku metaloorganicznych pochodnych stosowanymi z wzrastającym stężeniem (0-120  $\mu\text{mol/L}$ ). Żywotność komórek określono metodą spektrofotometryczną (test MTT). Odsetek żywych komórek przeliczano na procent kontroli (komórki inkubowane w PBS), których żywotność arbitralnie przyjęto jako 100%. W tabeli 5 przedstawiono wartości stężenia  $\text{IC}_{50}$  obliczonych dla linii MCF-7, MDA-MB-231, HepG2 oraz CCRF-CEM po traktowaniu związkami **4**, **5**, **6** i **7**.

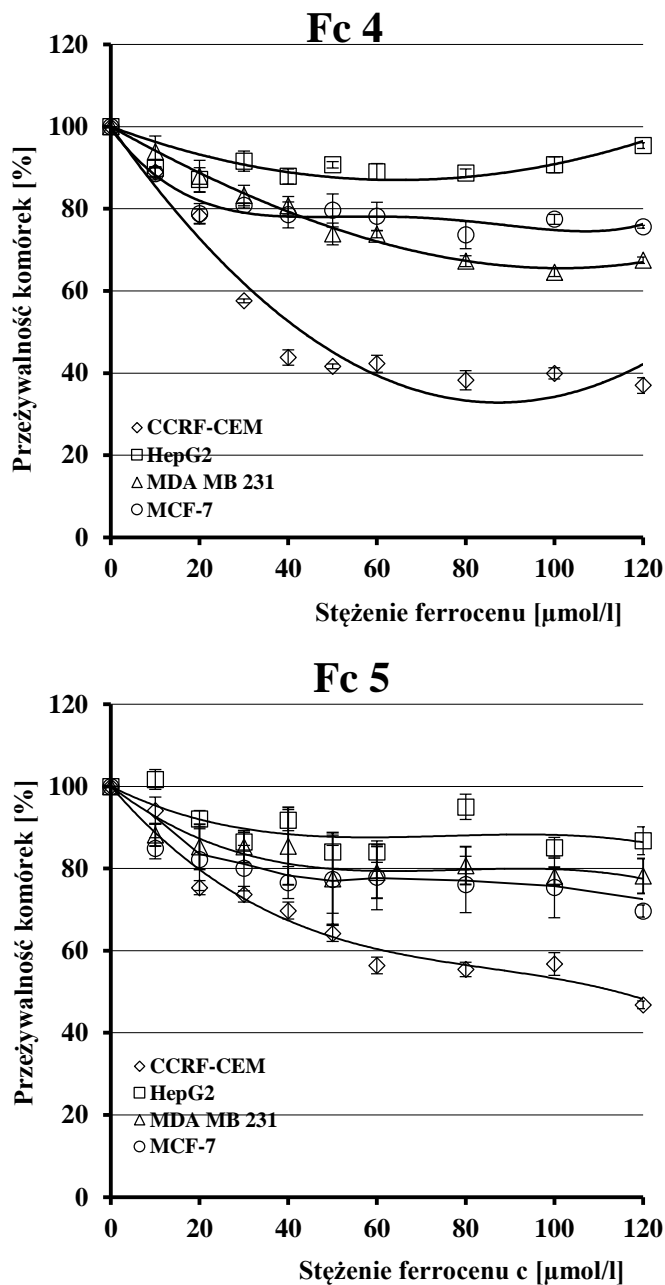
**Tabela 5.** Wartości stężenia  $\text{IC}_{50}$  związków **4-7** wobec linii komórek MCF-7, MDA-MB-231, HepG2 oraz CCRF-CEM. Komórki inkubowano ze związkami przez 24 godziny (efekt cytotoksyczny).

Linia komórkowa	Cytotoksyczne właściwości pochodnych ferrocenów, $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]			
	4	5	6	7
HepG2	>120	>120	>120	>120
MCF-7	>120	>120	>120	>120
MDA-MB-231	>120	>120	>120	>120
CCRF-CEM	37,5 $\pm$ 0,9	86,5 $\pm$ 3,4	47,2 $\pm$ 2,3	64,1 $\pm$ 1,2

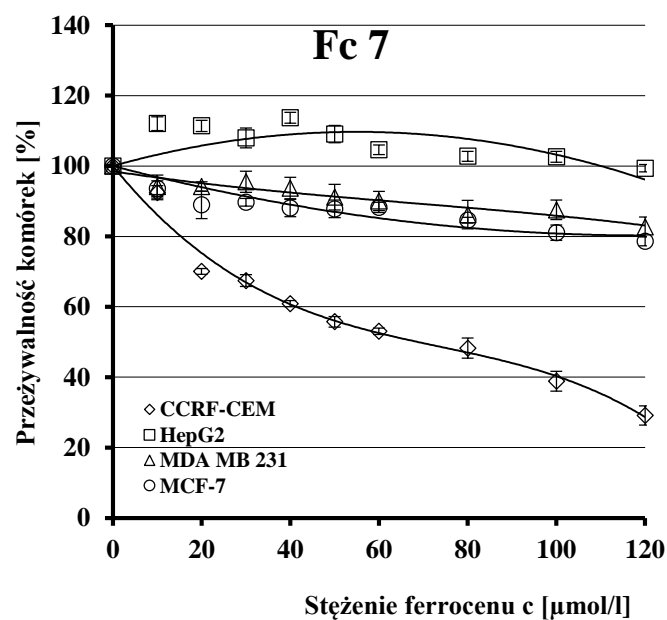
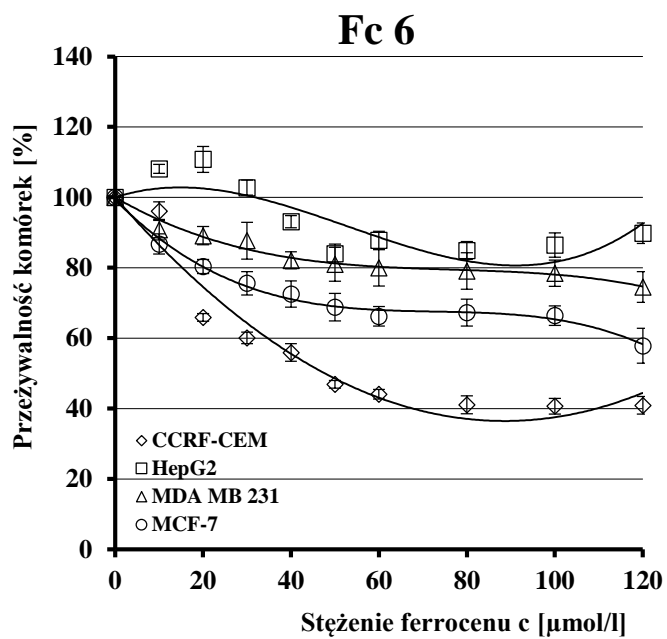
Spośród zastosowanych w badaniach linii komórek nowotworowych najbardziej wrażliwa na badane związki okazała się zawieszinowa linia białaczkowa CCRF-CEM, której proliferacja hamowana była przez każdą z badanych flawonowych pochodnych ferrocenyłowych. Najbardziej cytotoksyczny był związek **4**, dla którego wartość wyliczonego stężenia  $\text{IC}_{50}$  wynosiła 37,5  $\mu\text{mol/L}$ . W przypadku adherentnych linii komórek nowotworowych poddanych analizie, obserwowano znacznie mniejszą cytotoksyczność związków. Jak przedstawiono w tabeli 5 dla HepG2, MCF-7 oraz MDA-MB-231 zastosowanie szerokiego zakresu stężeń analizowanych związków **4-7** było niewystarczające, aby odpowiednio wyznaczyć wartość stężenia  $\text{IC}_{50}$ .

Różnice w molekularnych mechanizmach cytotoksycznych właściwości opisywanych flawonoidowych pochodnych wynikać mogą z rodzaju komórek nowotworowych zastosowanych w badaniu oraz ich specyficznych właściwości. Z drugiej jednak strony warto podkreślić również istotny wpływ budowy chemicznej samych związków. Na podstawie analizy ich struktury można stwierdzić, że zmiana jednego z podstawników w pozycji węgla C2 znajdującego się strukturze aromatycznych pierścieni szkieletu kromonu implikuje zmianę właściwości cytotoksycznych całego związku. Zjawisko to szczególnie dobrze widoczne jest dla badanych flawonoidowych kompleksów metaloorganicznych **4**, **5** oraz **6**. Związki te zawierają w pozycji C2 odpowiednio wodór, grupę metylową  $\text{CH}_3$  lub pierścień aromatyczny  $\text{C}_6\text{H}_5$ . Największą efektywnością działania w zakresie cytotoksyczności i hamowania podziałów komórek nowotworowych jak wspomniano wcześniej charakteryzował się związek **4**. Zamiana atomu wodoru w pozycji C2 w sposób diametralny i istotny obniżała skuteczność działania związku, co potwierdzają wyliczone wartości  $\text{IC}_{50}$ .

Na podstawie wstępnej analizy cytotoksycznych właściwości flawonoidowych pochodnych ferrocenyowych, dokonano selekcji związków jak również linii komórek nowotworowych stosowanych w dalszych eksperymentach. Ze względu na niską aktywność badanych cząsteczek, do kolejnych badań z zakresu cytostatyczności oraz mikroskopowej analizy morfologii komórek nowotworowych i procesu PCD wykorzystano linię CCRF-CEM oraz związki 4, 5, 6, 7.



**Rysunek 16a.** Krzywe przeżywalności komórek linii CCRF-CEM, HepG2, MCF-7 oraz MDA-MB-231 inkubowanych przez 24 godziny z ferrocenyłowymi pochodnymi 4 i 5.



**Rysunek 16b.** Krzywe przeżywalności komórek linii CCRF-CEM, HepG2, MCF-7 oraz MDA-MB-231 inkubowanych przez 24 godziny z ferrocenylowymi pochodnymi 6 i 7.

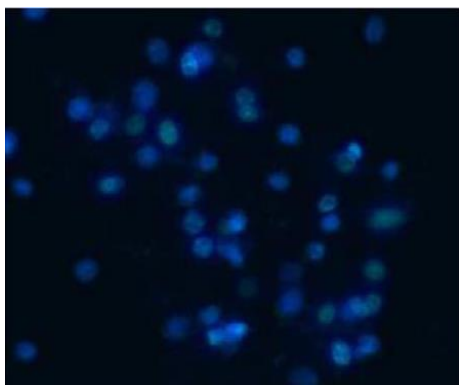
### **11.2.2. Analiza morfologiczna; identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej zastosowaniem podwójnego barwienia komórek barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst 33258 i jodkiem propidyny (PI)**

Zmiany morfologii komórek linii CCRF-CEM inkubowanych przez 24 godziny w środowisku ferrocenylowych pochodnych **4-7** przeprowadzono z wykorzystaniem technik mikroskopowych. W dalszych eksperymentach przeprowadzono również analizę apoptotycznych właściwości ferrocenylowych związków – zdjęcia mikroskopowe pod powiększeniem obiektywu 150x10. Przykłady poszczególnych zmian w zakresie morfologii komórek przedstawiono na Rys. 17.

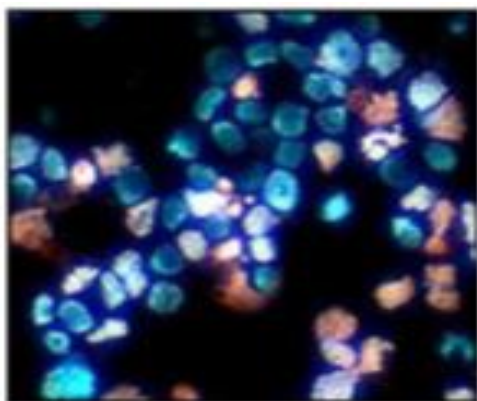
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż badane związki charakteryzowały się różnorodnym stopniem oddziaływania na komórki CCRF-CEM przejawiające się zmianami ich morfologii. Ciekawym jest fakt, iż nie stwierdzono występowania ścisłej korelacji pomiędzy aktywnością cytotoksyczną danej pochodnej, a stopniem jej oddziaływania na komórki nowotworowe pod względem morfologii.

W przypadku związku **4**, który wykazywał największą efektywność hamowania proliferacji komórek białaczkowych ( $IC_{50}=37,5 \mu\text{mol/L}$ ) nie zaobserwowano jednoczesnych zmian ich kształtu czy wielkości zależnych od funkcjonowania metaloorganicznej pochodnej. z wykorzystaniem metody podwójnego barwienia barwnikami Hoechst 33258 oraz PI. Już po 24 godzinnej inkubacji komórek z badanymi cząsteczkami, obserwowano pojawienie się frakcji komórek apoptotycznych. Uruchomienie szlaku programowanej śmierci skorelowane było również z morfologicznymi zmianami w obrębie komórek, które są charakterystyczne dla tego procesu. Pod mikroskopem widoczna była kondensacja chromatyny z jednoczesnym obkurczaniem jądra komórkowego CCRF-CEM. Istotnym odnotowania jest również fakt, pojawienia się w całkowitej populacji komórek traktowanych związkami **4-7** frakcji nekrotycznej. Na podstawie uzyskanych wyników można więc stwierdzić, iż prawdopodobnie u podstaw cytotoksycznych oraz cytostatycznych właściwości badanych flawonoidowych pochodnych metaloorganicznych, leży ich zdolność do indukcji w komórkach nowotworowych PCD oraz nekrozy.

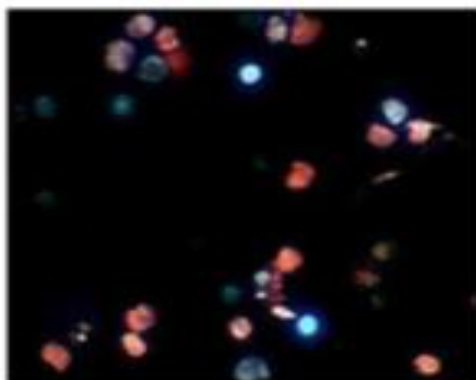
### Komórki kontrolne CCRF-CEM



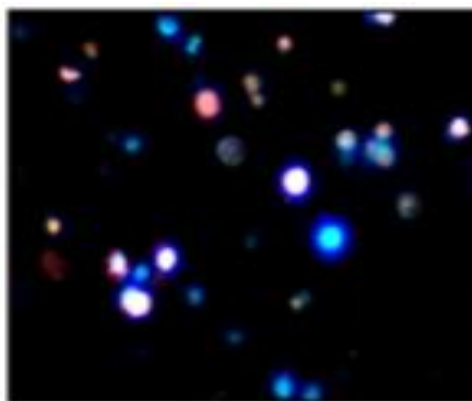
**4 (100  $\mu\text{mol/L}$ )**



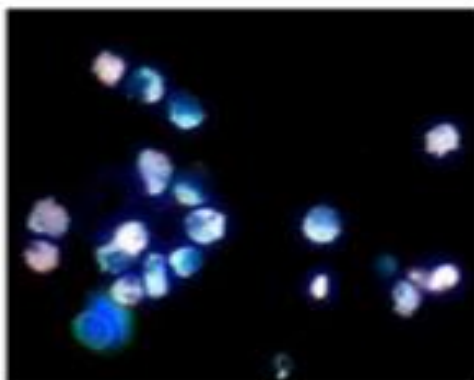
**6 (100  $\mu\text{mol/L}$ )**



**5 (100  $\mu\text{mol/L}$ )**



**7 (100  $\mu\text{mol/L}$ )**



**Rysunek 17.** Indukcja apoptozy komórek CCRF-CEM eksponowanych na ferrocenylowe pochodne flawonoidów 4-7. Komórki barwiono dwoma barwnikami fluorescencyjnymi – Hoechst 33258 oraz jodkiem propidyny w celu określenia frakcji komórek żywych (błada, niebieska fluorescencja), wczesnoapoptotycznych (jasna, niebieska fluorescencja), późnoapoptotycznych (fioletowa fluorescencja) oraz nekrotycznych (czerwona fluorescencja).

## 11.3. POCHODNE FERROCENYLOWE ZAWIERAJĄCE KOBALT

### 11.3.1. Cytotoksyczność pochodnych ferrocenyłowych

Komórki MCF-7, MDA-MB-231, HepG2 i CCRF-CEM inkubowano z wrastającymi stężeniami (0-120  $\mu\text{mol/L}$ ) związków metaloorganicznych, a następnie hodowano przez 48 godz. Na podstawie uzyskanych wyników wykreślono krzywe przeżywalności komórek ww. wymienionych linii oraz w programie GraphPad Prism wyliczono stężenia  $\text{IC}_{50}$ . Krzywe przeżywalności komórek linii MCF-7, MDA-MB-231, HepG2 oraz CCRF-CEM przedstawiono na Rys. 18a-b.

Żywotność komórek określono mikropłytkową metodą spektrofotometryczną z MTT. Odsetek żywych komórek w próbce obliczano w stosunku do kontroli (komórki inkubowane w PBS), których żywotność arbitralnie przyjęto jako 100%. W tabeli 6 przedstawiono wartości stężeń  $\text{IC}_{50}$  obliczonych dla komórek linii MCF-7, MDA-MB-231, HepG2 oraz CCRF-CEM inkubowanych ze związkami 7, 8, 9, 10, 11.

**Tabela 6.** Wartości stężenia  $\text{IC}_{50}$  pochodnych **7-11** wyznaczone dla linii komórek MCF-7, MDA-MB-231, HepG2 oraz CCRF-CEM. Komórki inkubowano ze związkami metaloorganicznymi przez 24 godziny (efekt cytotoksyczny).

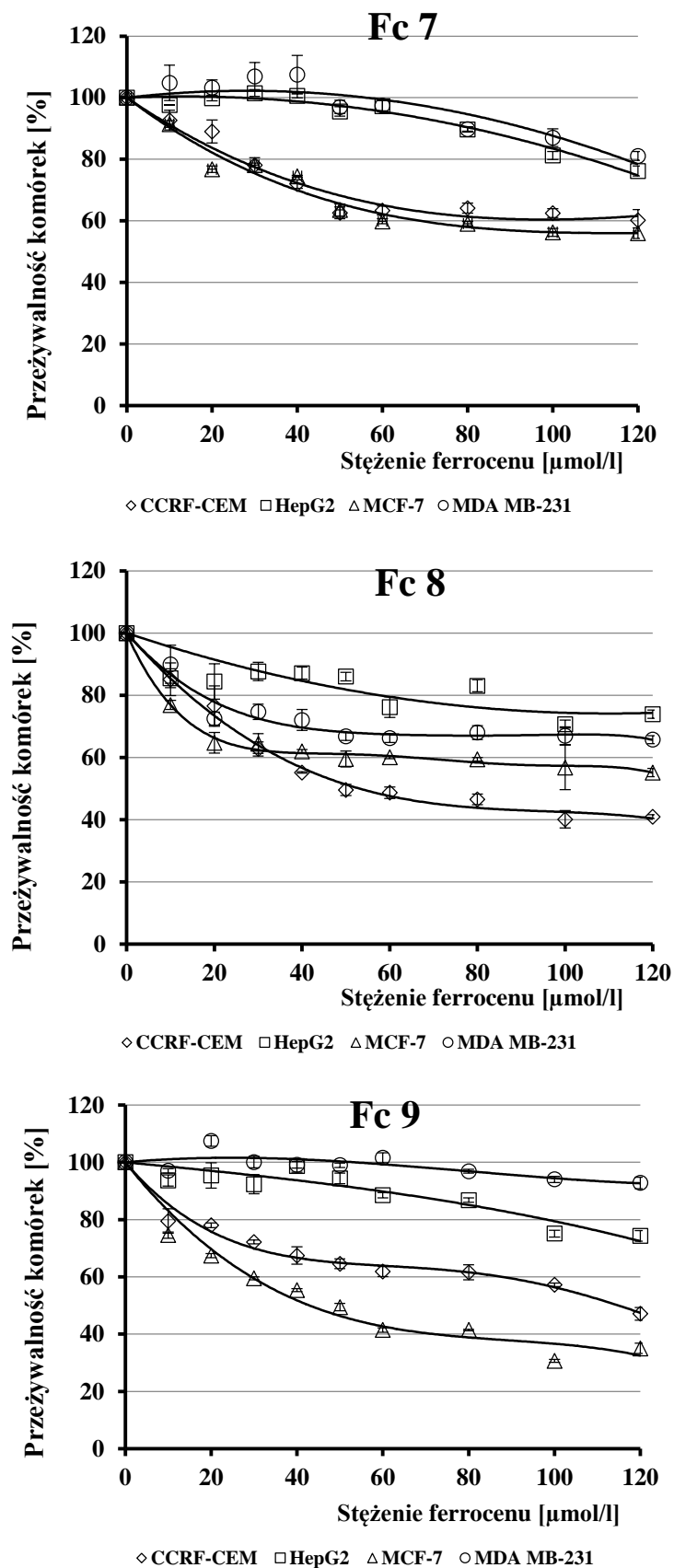
Linia komórkowa	Cytotoksyczne właściwości pochodnych ferrocenów, $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]				
	7	8	9	10	11
MCF-7	>120	>120	$50,0 \pm 1,8$	$23,0 \pm 2,1$	$24,0 \pm 2,4$
MDA-MB-231	>120	>120	>120	>120	>120
CCRF-CEM	>120	$62,1 \pm 1,3$	>120	$30,0 \pm 0,9$	$45,0 \pm 1,1$
HepG2	>120	>120	>120	$35,0 \pm 1,6$	>120

Spośród 5 przebadanych pochodnych metaloorganicznych jedynie dwie wykazywały zadowalające właściwości cytotoksyczne względem badanych linii komórek nowotworowych. Pochodna **7** nie wykazywała istotnej aktywności antyproliferacyjnej w zakresie stosowanych stężeń (0-120  $\mu\text{mol/L}$ ). Pochodne **8** i **9** były cytotoksyczne jedynie dla komórek linii CCRF-CEM (**8**) oraz MCF-7 (**9**), a wartość wyliczonego na podstawie krzywych przeżywalności stężenia  $\text{IC}_{50}$  zawarta była w zakresie stężeń 50-62  $\mu\text{mol/L}$ . Największą aktywnością cytotoksyczną charakteryzowały się związki zawierające układ aromatyczny ferrocenu – winylowa pochodna ferrocenyłowa (**10**) oraz chromonowa (**11**). Pierwsza z wymienionych cząsteczek hamowała proliferację komórek linii HepG2, MCF-7 i CCRF-CEM w zakresie stosowanych stężeń, podczas gdy działanie antyproliferacyjne związku **11** ograniczało się do linii MCF-7 oraz CCRF-CEM. Najbardziej wrażliwe na działanie obu substancji były komórki estrogenozależnego raka piersi MCF-7.

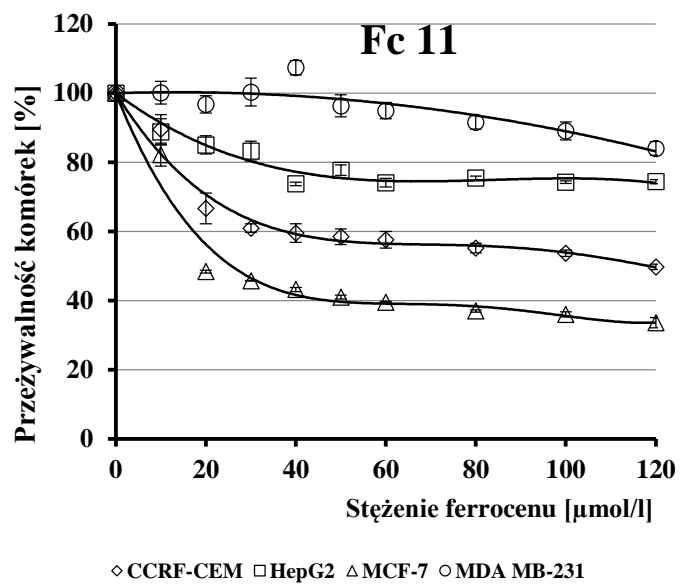
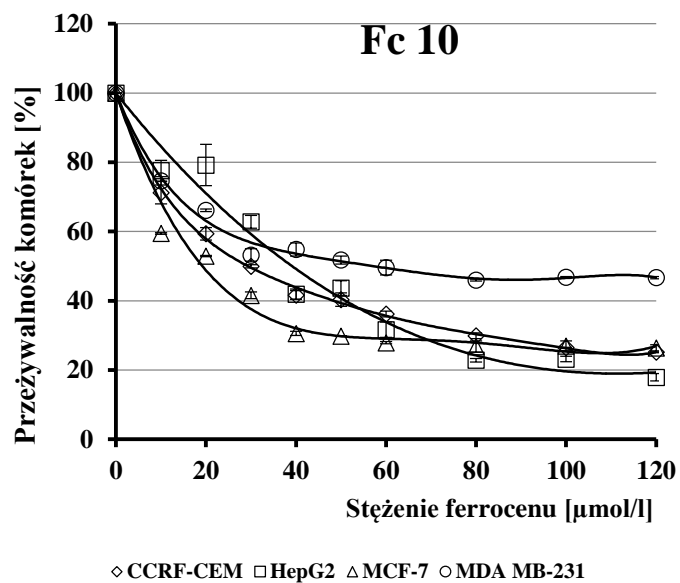
Różnice cytotoskyczności badanych pochodnych metaloorganicznych mogą wynikać z ich budowy chemicznej. Najbardziej efektywne były związki zawierające w swej strukturze ugrupowanie ferrocenu oraz atom kobaltu.

Do dalszej analizy wyselekcjonowano dwie najbardziej aktywne pochodne (**10** i **11**) oraz 3 linie komórek nowotworowych. HepG2, CCRF-CEM i MCF-7, charakteryzujących się największą wrażliwością na badane pochodne metaloorganiczne.





**Rysunek 18a.** Krzywe przeżywalności komórek linii CCRF-CEM, HepG2, MCF-7 oraz MDA-MB-231 inkubowanych przez 24 godziny z ferrocenylowymi pochodnymi 7-9.

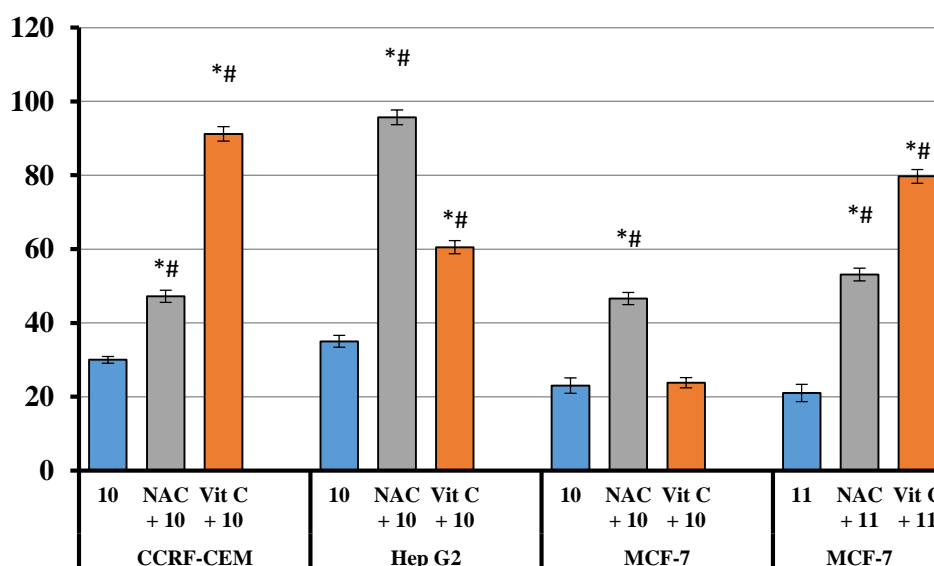


**Rysunek 18b.** Krzywe przeżywalności komórek linii CCRF-CEM, HepG2, MCF-7 oraz MDA-MB-231 inkubowanych przez 24 godziny z ferrocenylowymi pochodnymi **10** i **11**.

### 11.3.2. Udział reaktywnych form tlenu (ROS) w aktywności cytotoksycznej pochodnych ferrocenyowych

Aby określić udział reaktywnych form tlenu w aktywności cytotoksycznej badanych ferrocenów **10** oraz **11**, komórki przed inkubacją ze związkami preinkubowano przez 1 godzinę z przeciwutleniaczami: N-acetylocysteiną (NAC), lub witaminą C. Podobnie, jak w przypadku pierwszej grupy ferrocenów (akryloilferroceny oraz azaferroceny) preinkubacja z antyoksydantami powodowała istotny statystycznie wzrost przeżywalności komórek nowotworowych i równoczesny spadek aktywności cytotoksycznej metaloorganicznych pochodnych. Jak pokazuje Rys. 19, wzrost przeżywalności komórek nowotworowych po preinkubacji z NAC lub witaminą C wzrosła 1,6 – 3,8-krotnie w porównaniu z komórkami nieinkubowanymi z przeciwutleniaczami. Uzyskane wyniki sugerują istotną rolę RFT w aktywności cytotoksycznej i antyproliferacyjnej badanych związków wobec ludzkich linii komórek nowotworowych.

NAC wykazywała lepsze właściwości cytoprotekcyjne i hamowała cytotoksyczne działanie ferrocenu **10** względem linii HepG2 i MCF-7. Witamina C natomiast z większą skutecznością redukowała cytotoksyczne działanie związku **10** i **11** na komórki CCRF-CEM (**10**) oraz MCF-7 (**11**).



**Rysunek 19.** Wpływ przeciwutleniaczy NAC (3 mmol/L) oraz witaminy C (50  $\mu$ mol/L) na właściwości cytotoksyczne ferrocenów **10** oraz **11** względem komórek linii HepG2, CCRF-CEM, MCF-7. Komórki przed inkubacją ze związkami metaloorganicznymi preinkubowano przez 1 godzinę z przeciwutleniaczami. Komórki traktowano ferrocenami w szerokim zakresie stężeń (0-120  $\mu$ M) przez 24 godziny. Frakcję żywych komórek oceniano metodą MTT. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS), # $p < 0,05$  NAC vs. witamina C.

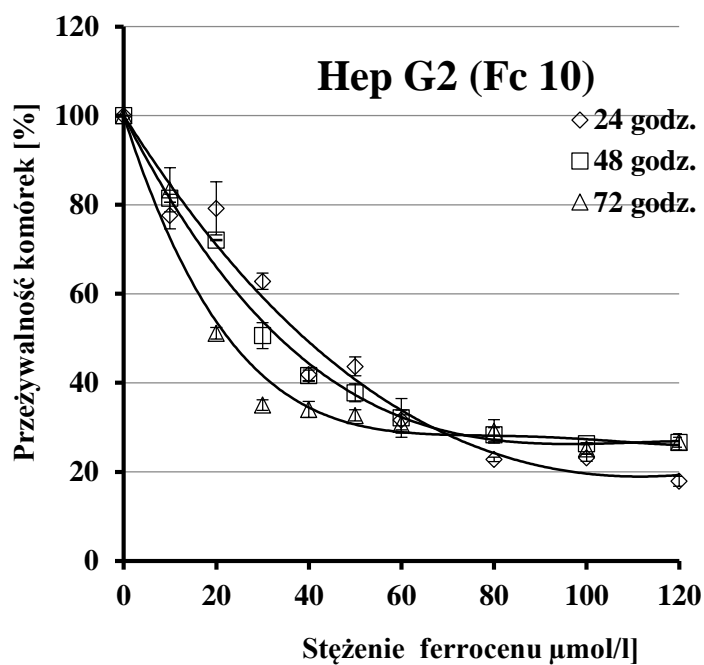
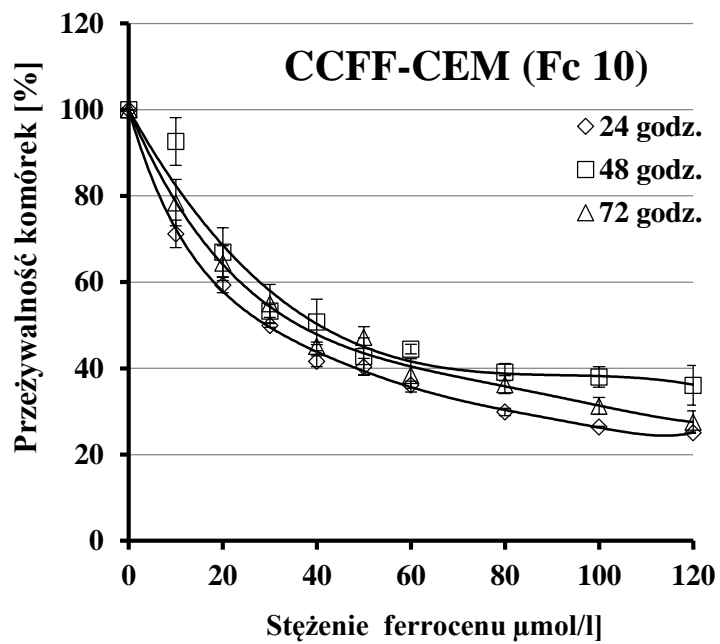
### 11.3.3. Cytostatyczność pochodnych ferrocenyłowych

Celem eksperymentu była ocena zdolności pochodnych ferrocenyłowych **10** i **11** do zahamowania proliferacji komórek HepG2, MCF-7 i CCRF-CEM. Zastosowano czasy inkubacji z badanymi związkami dłuższe od czasów podwojenia tzw. *cell doubling time*. Komórki nowotworowe inkubowano ze związkami przez 48 i 72 godz., a następnie oznaczano procent żywych komórek w hodowli metodą MTT. Krzywe przeżywalności komórek zamieszczono na Rys. 20a-b.

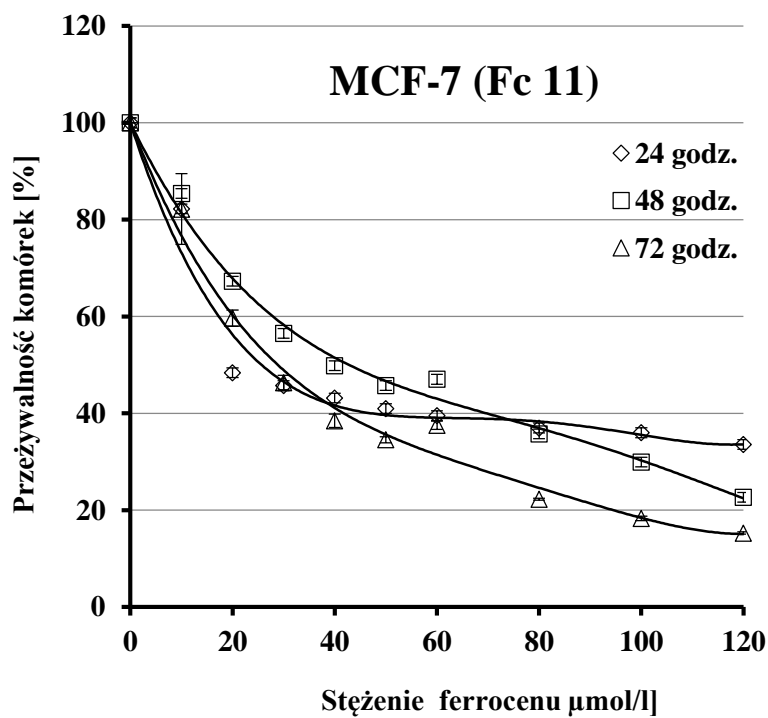
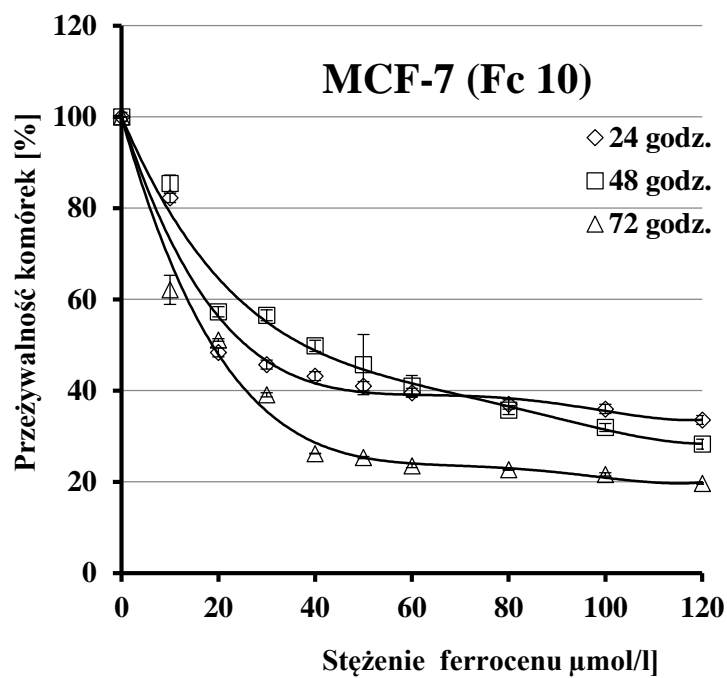
W przypadku linii HepG2, skuteczność inhibicji podziałów komórkowych przez związek **10** zależał od czasu ich ekspozycji na badany ferrocen. Zastosowanie dłuższego czasu inkubacji (72 godz.) skutkowało lepszą efektywnością zahamowania proliferacji komórek nowotworowych. Wyliczona na podstawie krzywych przeżywalności wartość stężenia  $IG_{50}$  była mniejsza niż wartość stężenia  $IC_{50}$  wyznaczonego w teście cytotoksyczności. Analogiczne zmiany obserwowano dla komórek linii MCF-7 traktowanych pochodną **10**, gdzie obserwowano zależną od czasu inkubacji z badanym ferrocenem inhibicję proliferacji komórek nowotworowych oraz mniejszą niż  $IC_{50}$  wartość  $IG_{50}$ . Zależność hamowania podziałów komórkowych od czasu inkubacji ze związkami stwierdzono także dla komórek linii MCF-7 (związek **11**) oraz CCRF-CEM (związek **10**).

**Tabela 7.** Wartości stężenia  $IG_{50}$  ferrocenów 10 oraz 11 względem linii HepG2, MCF-7 oraz CCRF-CEM. Komórki inkubowano z metaloorganicznymi pochodnymi przez 48 lub 72 godziny (efekt cytostatyczny).

Linia komórkowa (ferrocen)	Cytostatyczne właściwości pochodnych ferrocenów, $IG_{50}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	
	48 godziny	72 godziny
HepG2 (10)	$33,5 \pm 0,5$	$25,5 \pm 1,8$
MCF-7 (10)	$21,5 \pm 1,5$	$20,5 \pm 0,6$
MCF-7 (11)	$41,5 \pm 2,3$	$39,0 \pm 1,4$
CCRF-CEM (10)	$47,0 \pm 1,1$	$41,5 \pm 0,9$



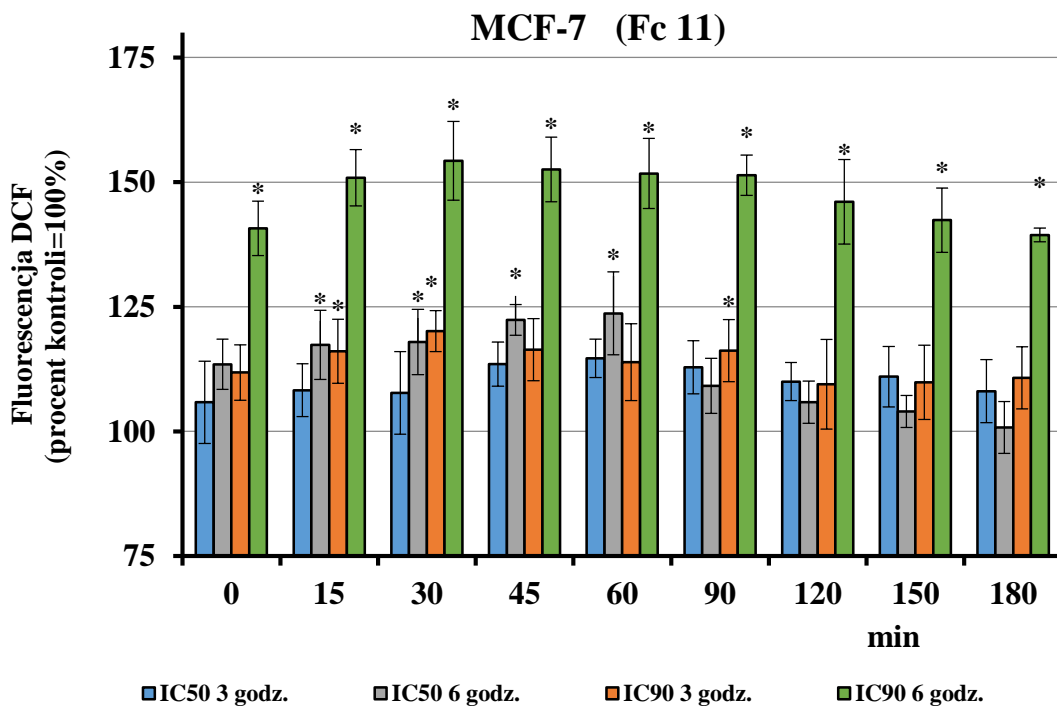
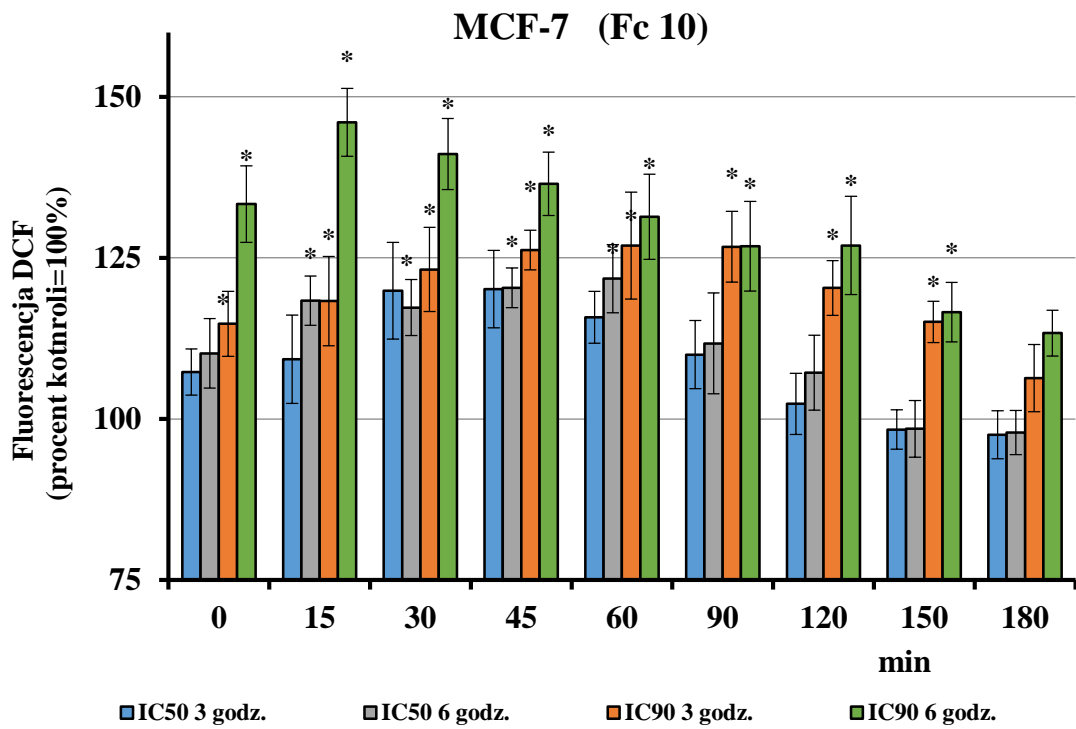
**Rysunek 20a.** Krzywe przeżywalności komórek linii CCRF-CEM, HepG2 inkubowanych przez 24, 48 lub 72 godziny z ferrocenyłowymi pochodnymi 10.



**Rysunek 20b.** Krzywe przeżywalności komórek linii MCF-7 inkubowanych przez 24, 48 lub 72 godziny z ferrocenyłowymi pochodnymi 10, 11.

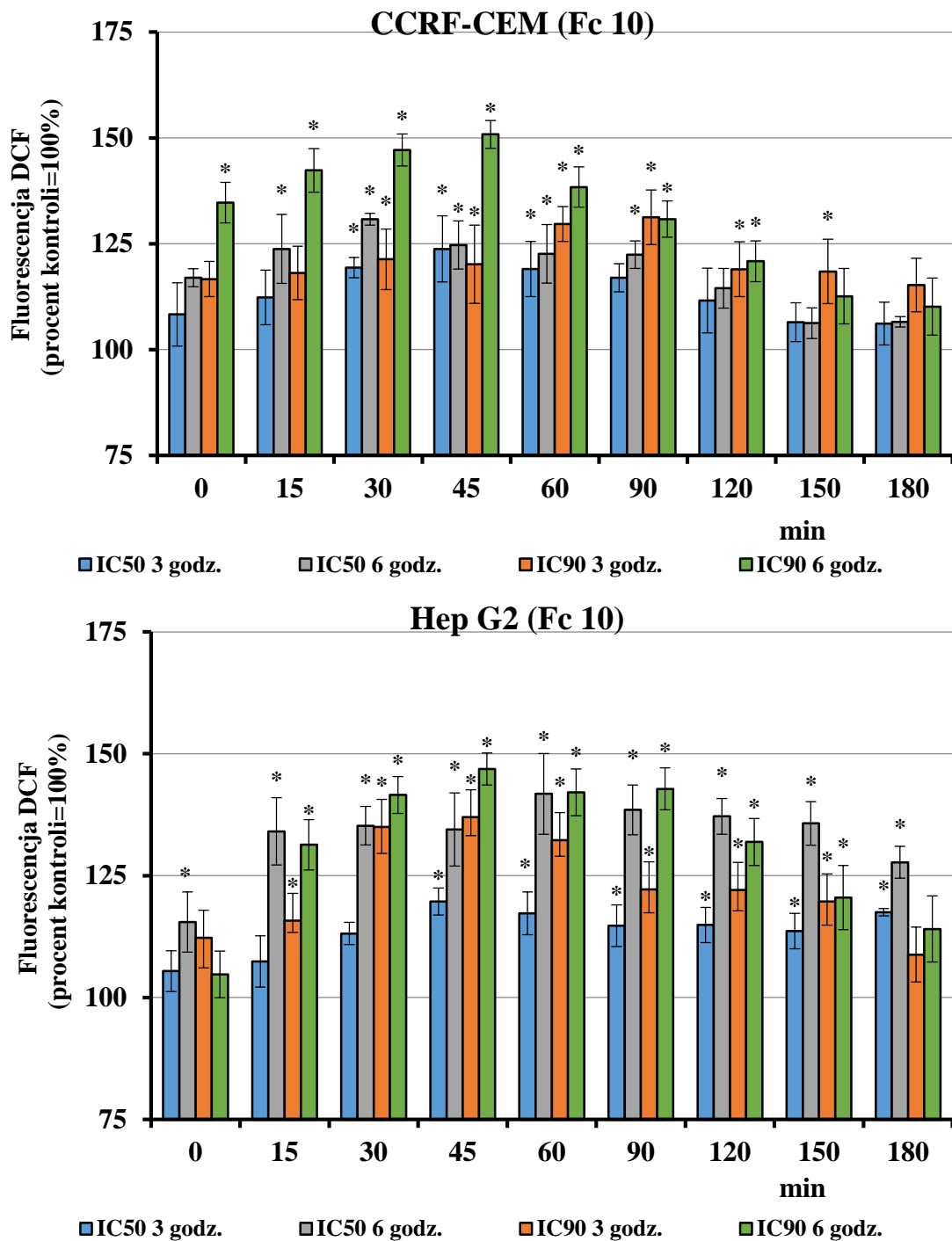
#### **11.3.4. Poziom reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych ekspozowanych na działanie badanych metaloorganicznych pochodnych**

Ilość RFT (głównie  $H_2O_2$ ), generowanych w komórkach nowotworowych ekspozowanych na działanie ferrocenów, mierzono przy użyciu sondy fluorescencyjnej  $H_2DCFD-DA$ . Komórki traktowano stężeniami  $IC_{50}$  i  $IC_{90}$  związków przez 3 lub 6 godzin. Badania wykazały wzrost poziomu RFT w komórkach nowotworowych, który był skorelowany zarówno z czasem ich inkubacji z testowanymi pochodnymi, jak również z ich stężeniem. Największy wzrost RFT obserwowano dla najdłuższego czasu inkubacji (6 godz.) oraz wyższego stężenia ( $IC_{90}$ ). Stwierdzono dwutorowy przebieg kinetyki RFT w trakcie 180 minutowego okresu hodowli poinkubacyjnej. W trakcie pierwszych 15-45 min następował początkowy, postępujący wzrost ilości RFT w komórkach nowotworowych. Podczas kolejnych 60-120 min następował ich spadek, po czym poziom RFT utrzymywał się na tym samym poziomie do końca poinkubacyjnego okresu (150-180 min). Wyjątek stanowiły komórki linii MCF-7, inkubowane ze związkiem **11** przez 6 godzin, w których stężenia  $IC_{90}$  powodowało 50% wzrost RFT, utrzymujący się przez cały okres 180-minutowej hodowli poinkubacyjnej.



**Rysunek 21a.** Ilość reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych linii MCF-7 przez badane ferrocenyłowe pochodne 10 lub 11. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).





**Rysunek 21b.** Ilość reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych linii CCRF-CEM oraz HepG2 przez badaną ferrocenyłową pochodną **10**. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

### **11.3.5. Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem podwójnego barwienia komórek barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst 33258 i jodkiem propidyny (PI)**

Analizę właściwości proapoptotycznych badanych ferrocenów wykonano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Komórki barwiono jednocześnie dwoma fluorochromami – jodkiem propidyny oraz Hoechst 33258, co umożliwiło identyfikację w tej samej próbce frakcji komórek żywych, wczesno-, późno-apoptotycznych i nekrotycznych. Na Rys. 23a-c przedstawiono wyniki analizy właściwości proapoptotycznych badanych pochodnych.

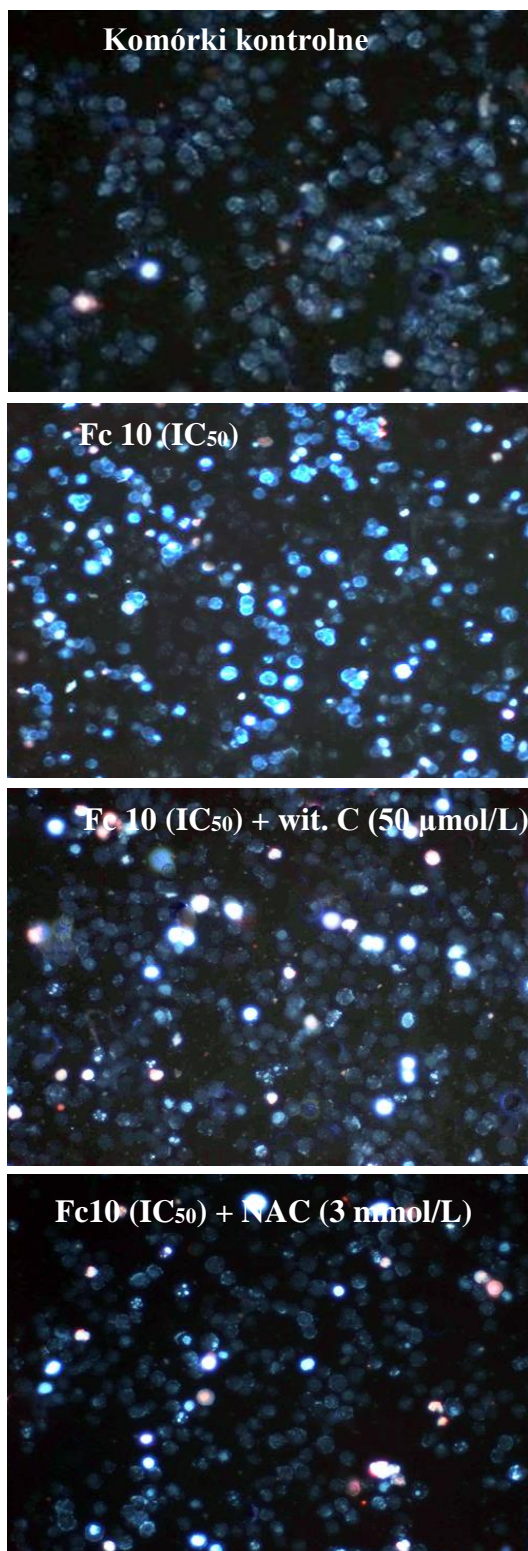
Komórki nowotworowe linii MCF-7, HepG2 oraz CCRF-CEM inkubowano ze stężeniem  $IC_{50}$  metaloorganicznych pochodnych przez 24 godziny, po czym zmieniano medium i hodowano komórki przez następne 24 godziny (hodowla poinkubacyjna). W celu oceny udziału RFT, a w konsekwencji również stresu oksydacyjnego w indukcji apoptozy przez badane związki, komórki nowotworowe przed potraktowaniem związkami metaloorganicznymi preinkubowano przez 1 godzinę z przeciwutleniaczami NAC (3 mmol/L) oraz witaminą C (50  $\mu$ mol/L).

Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie zastosowane pochodne indukowały apoptozę komórek nowotworowych. Analiza morfologiczna komórek wykazała liczne zmiany w ich strukturze, które są charakterystyczne dla procesu programowanej śmierci, takie jak obkurczanie komórek, marginalizację chromatyny czy wakuolizację cytoplazmy. Procentowa zawartość komórek, jaka umierała na drodze śmierci apoptotycznej skorelowana była z czasem hodowli poinkubacyjnej. Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (0 godz.), obserwowano pojawienie się frakcji komórek we wczesnej apoptozie (~ 10-17%). Znacznie mniejszy natomiast był odsetek komórek w późnej fazie procesu apoptozy, który wynosił jedynie 0,5-5%. Warto również podkreślić, iż skutkiem traktowania komórek nowotworowych badanymi ferrocenami, było pojawienie się frakcji komórek, które umierały na drodze śmierci nekrotycznej. Ich zawartość w całej populacji wynosiła 6-12%. Ilościowy rozkład poszczególnych frakcji populacji komórkowej uwarunkowany był zarówno przez rodzaj zastosowanego związku, jak również i badanej linii komórkowej.

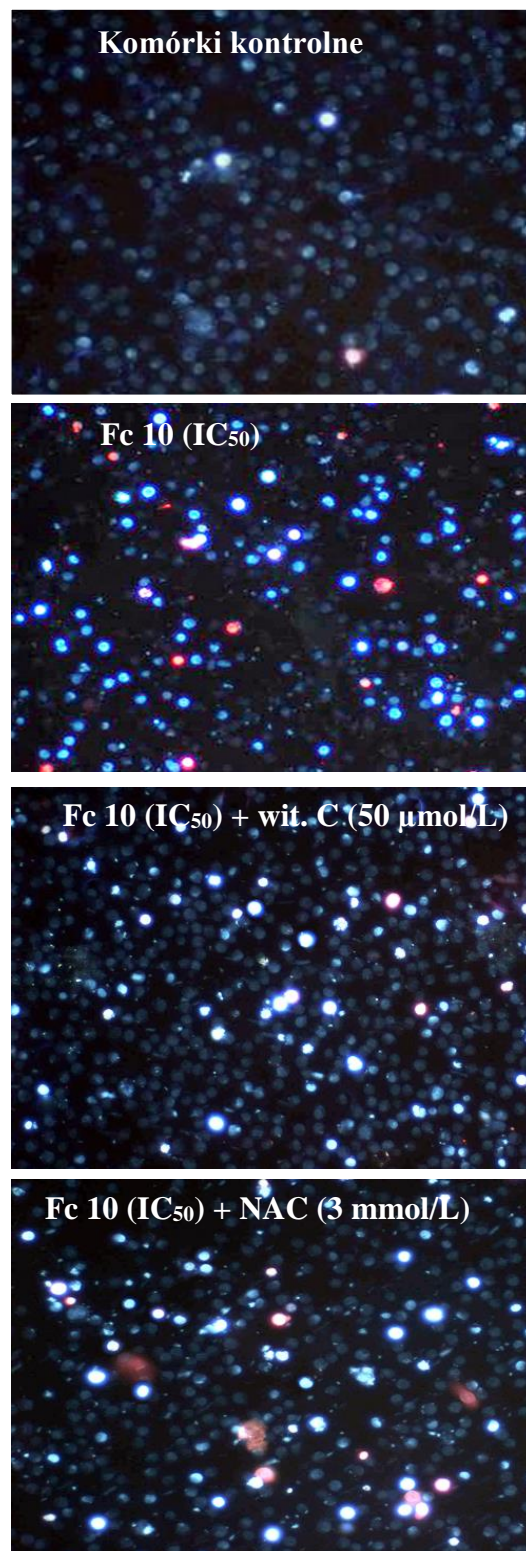
Po 24 godzinnej hodowli poinkubacyjnej obserwowano kilkuprocentowy (5-8%) wzrost zarówno frakcji komórek wczesnoapoptotycznych, jak i nekrotycznych. W populacji obecna była zawsze mała frakcja komórek późno-apoptotycznych.

Godzinna preinkubacja komórek nowotworowych z przeciwutleniaczami NAC lub witaminą C powodowała istotnie statystyczną redukcję zarówno frakcji komórek apoptotycznych jak i nekrotycznych, przy jednoczesnym wzroście frakcji komórek żywych. Zmiany takie notowano dla wszystkich zastosowanych metaloorganicznych pochodnych oraz linii komórek nowotworowych. W większości przypadków NAC wykazywał większą efektywność hamowania proapoptotycznych właściwości analizowanych ferrocenów. Uzyskane dane sugerują, iż stres oksydacyjny, generowany przez opisywaną grupę ferrocenów, warunkuje również ich właściwości proapoptotyczne i przyczynia się do indukcji PCD.

## MCF-7



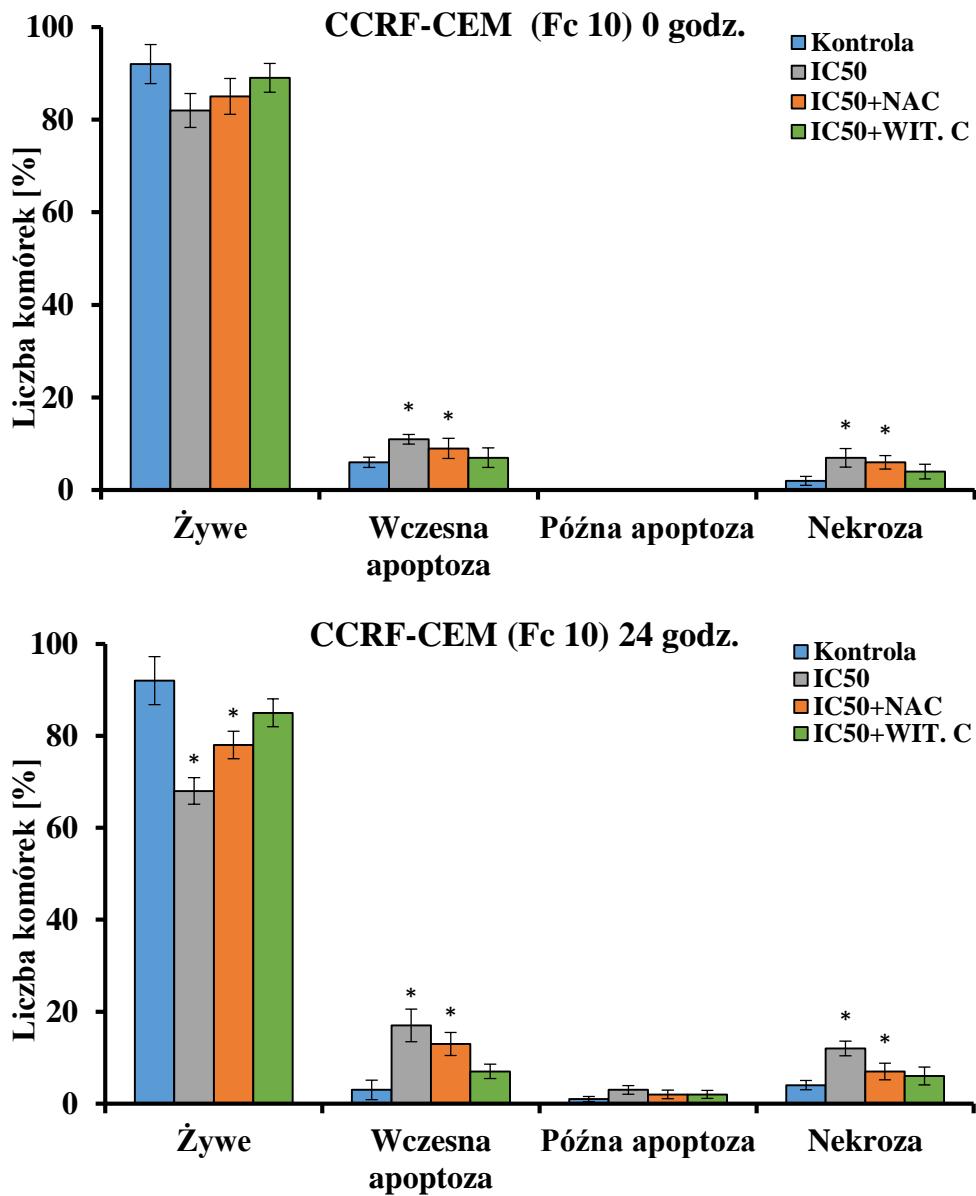
## CCRF-CEM



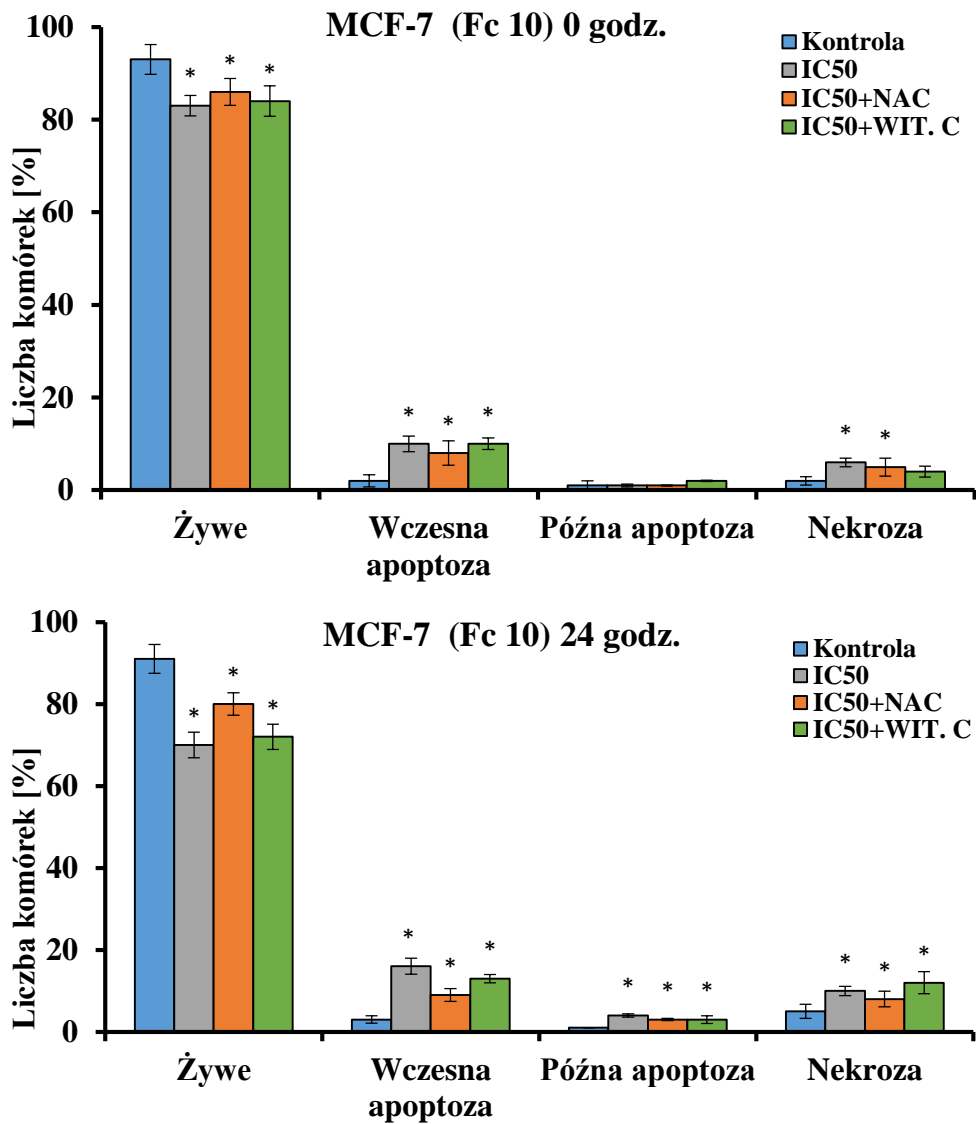
**Rysunek 22a.** Indukcja apoptozy komórek CCRF-CEM i MCF-7, eksponowanych na działanie ferrocenylovej pochodnej **10**. Komórki barwiono barwnikami fluorescencyjnymi – Hoechst 33258 oraz jodkiem propidyny w celu określenia frakcji komórek żywych (błada, niebieska fluorescencja), wczesnoapoptotycznych (jasna, niebieska fluorescencja), późnoapoptotycznych (fioletowa fluorescencja) oraz nekrotycznych (czerwona fluorescencja).



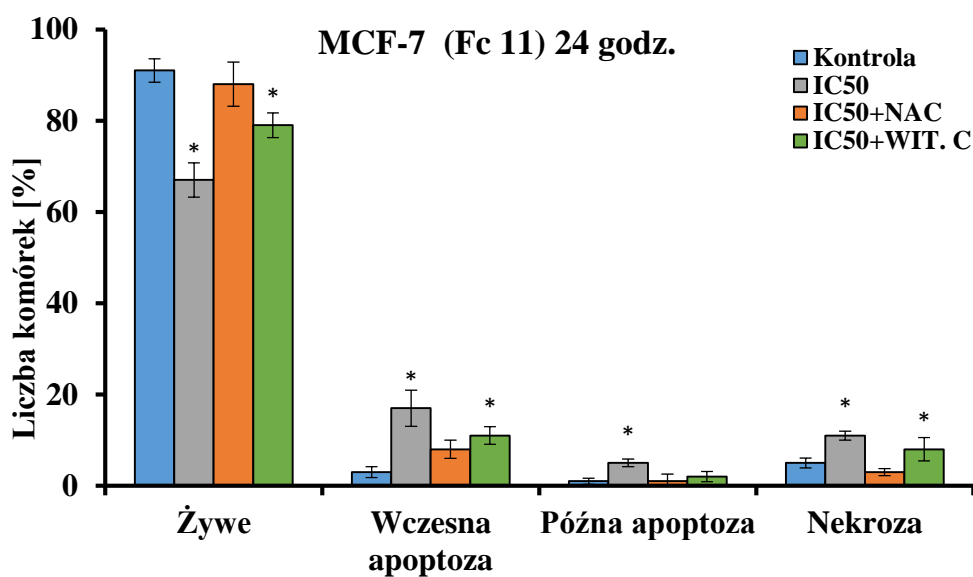
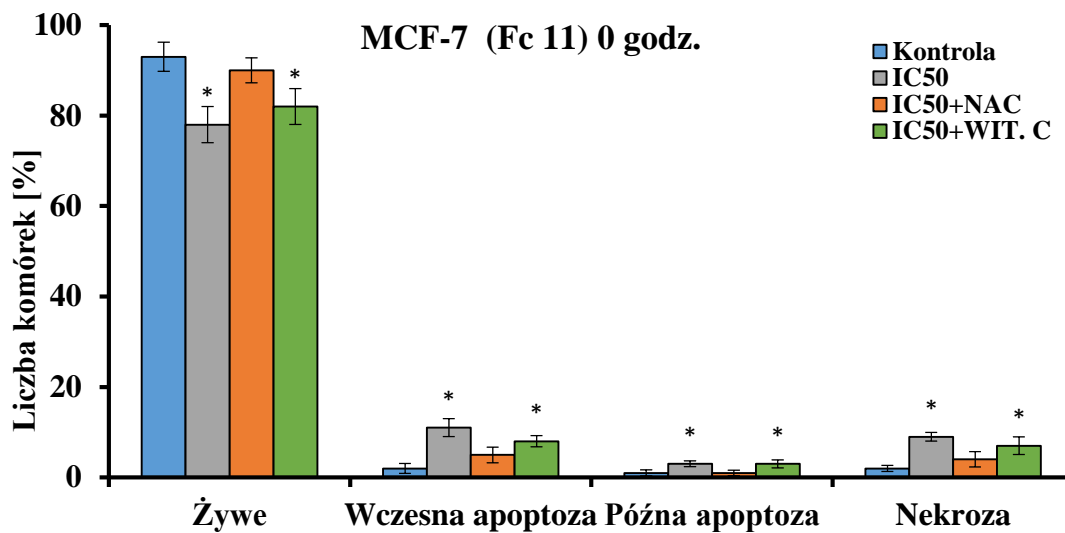
**Rysunek 22b.** Indukcja apoptozy komórek CCRF-CEM i MCF-7, eksponowanych na działanie ferrocenylovej pochodnej **10**. Komórki barwiono barwnikami fluorescencyjnymi – Hoechst 33258 oraz jodkiem propidyny w celu określenia frakcji komórek żywych (blada, niebieska fluorescencja), wczesnoapoptotycznych (jasna, niebieska fluorescencja), późnoapoptotycznych (fioletowa fluorescencja) oraz nekrotycznych (czerwona fluorescencja).



**Rysunek 23a.** Indukcja apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórek nowotworowych linii CCRF-CEM poddanych 24 godzinnej inkubacji z badanymi ferrocenyłowymi pochodnymi **10** w stężeniu IC<sub>50</sub> po preinkubacji przeciwutleniaczami – NAC lub witaminy C. Metoda mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem podwójnego barwienia komórek fluorochromami Hoechst 33258 i jodku propidyny. \*p<0,05 vs. kontrola (komórki traktowane PBS).



**Rysunek 23b.** Indukcja apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórek nowotworowych linii MCF-7 poddanych 24 godzinnej inkubacji z badanymi ferrocenyłowymi pochodnymi **10** w stężeniu IC<sub>50</sub> po preinkubacji przeciwutleniaczami – NAC lub witaminy C. Metoda mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem podwójnego barwienia komórek fluorochromami Hoechst 33258 i jodku propidyny. \*p<0,05 vs. kontrola (komórki traktowane PBS).



**Rysunek 23c.** Indukcja apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórek nowotworowych linii MCF-7 poddanych 24 godzinnej inkubacji z badanymi ferrocenyłowymi pochodnymi **11** w stężeniu IC<sub>50</sub> po preinkubacji przeciwutleniaczami – NAC lub witaminy C. Metoda mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem podwójnego barwienia komórek fluorochromami Hoechst 33258 i jodku propidyny. \*p<0,05 vs. kontrola (komórki traktowane PBS)

### 11.3.6. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej

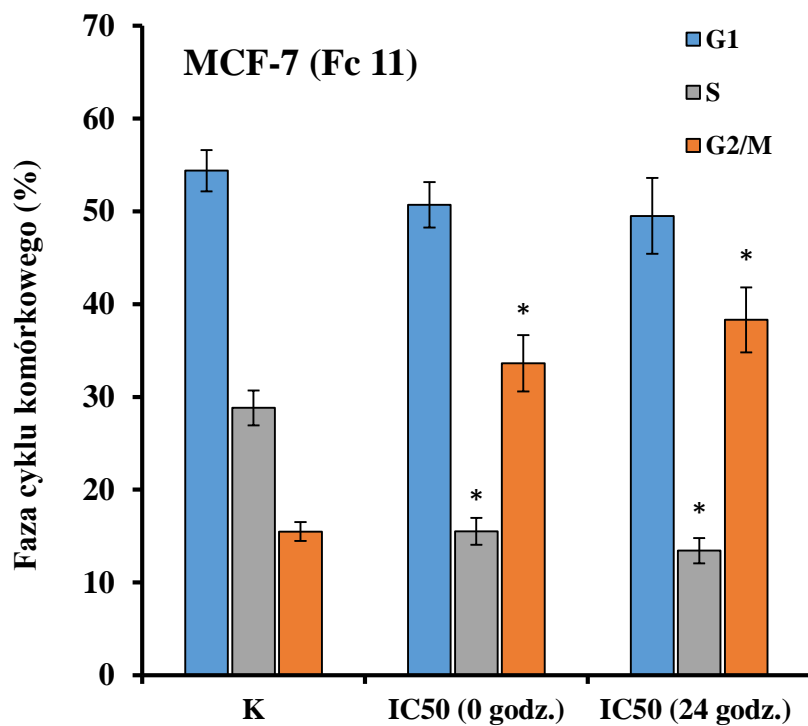
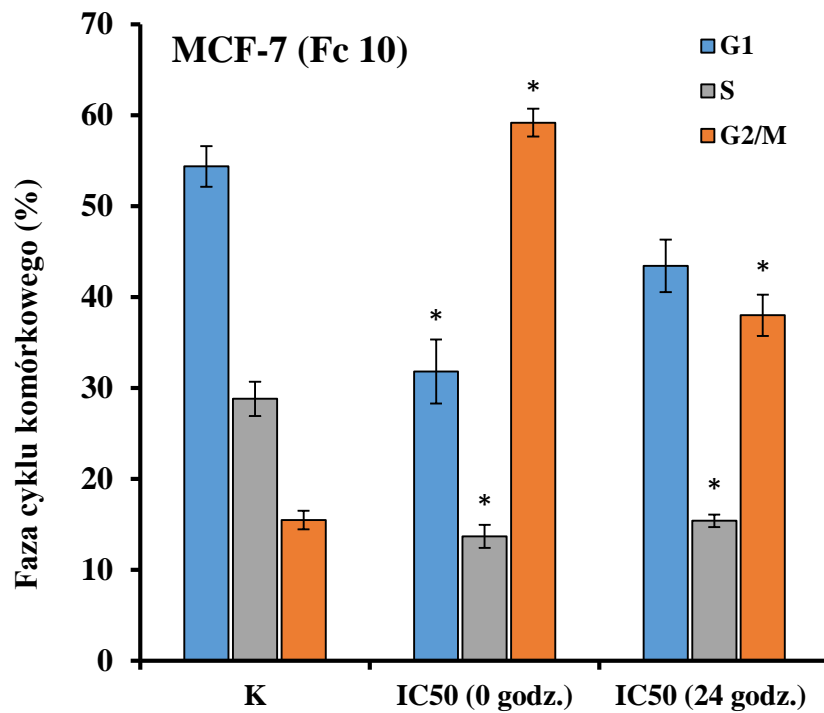
Właściwości cytostatyczne leków przeciwnowotworowych lub związków o właściwościach antyproliferacyjnych wynikają przede wszystkim z ich zdolności do hamowania cyklu podziałowego komórek nowotworowych. Komórki linii HepG2, MCF-7 oraz CCRF-CEM inkubowano przez 24 godziny ze stężeniem  $IC_{50}$  badanych ferrocenyłowych pochodnych. Rozkład cyklu komórkowego analizowano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji ze związkami (0 godz.) oraz po 24-godzinnej hodowli komórek w medium nie zawierającym badanych związków (hodowla poinkubacyjna). Wpływ metaloorganicznych pochodnych na cykl komórkowy wyżej wymienionych linii nowotworowych przedstawiono w postaci wykresów na Rys. 24a-b. Histogramy DNA uzyskane w wyniku cytometrycznej analizy zaprezentowano na Rys. 25.

W komórkach nowotworowych, inkubowanych z badanymi ferrocenyłowymi pochodnymi, obserwowano zaburzenia przebiegu ich cyklu podziałowego. Stwierdzono zablokowanie cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym fazy G2/M, co sugeruje właściwości cytostatyczne analizowanych ferrocenów.

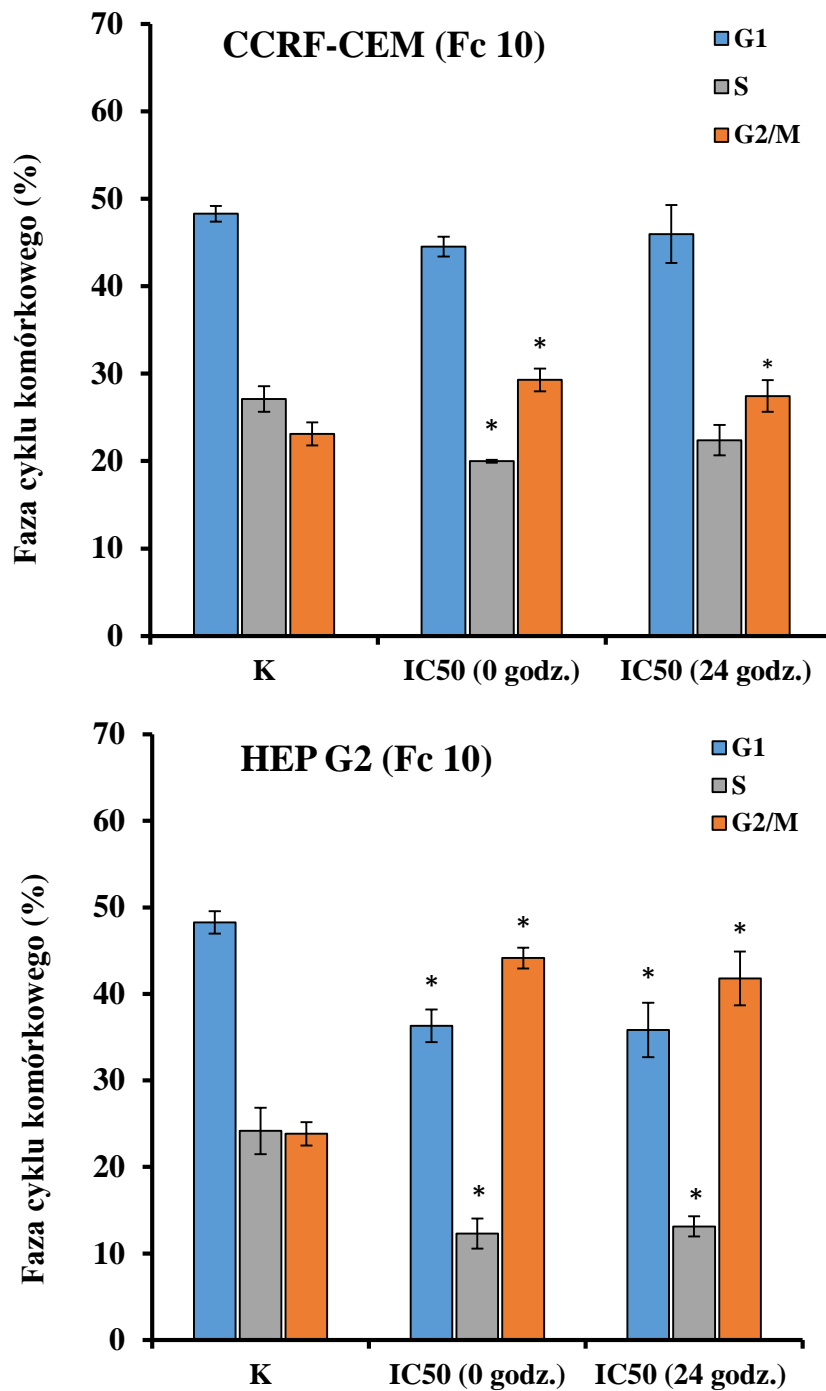
Zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M występowało we wszystkich liniach komórkowych bezpośrednio po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji (czas 0 godz.) z ferrocenami. Największe zmiany obserwowano w komórkach linii MCF-7 raka piersi, po ich potraktowaniu związkiem **10**. Wykazano, że około 55% komórek MCF-7 zostało zatrzymanych w punkcie kontrolnym G2/M cyklu podziałowego. Najmniejsze zmiany (ok. 10% wzrost frakcji G2/M) odnotowano w populacji komórek białaczkowych CCRF-CEM, inkubowanych z ferrocenem **10**.

Zastosowanie 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej, podczas której komórki nowotworowe rosły w medium hodowlanym pozbawionym ferrocenów, spowodowało zmniejszeniem frakcji komórek z blokadą cyklu komórkowego, prawie we wszystkich badanych próbach, z wyjątkiem komórek linii MCF-7 poddanych działaniu związku **11**. W tym przypadku, obserwowano dalszy (około 7%) wzrost frakcji komórek z blokiem G2/M cyklu podziałowego. Wyniki te sugerują, że podczas 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej, większość komórek zdolna była do naprawy uszkodzeń DNA, indukowanych na skutek genotoksycznego działania badanych ferrocenów. Naprawa uszkodzeń DNA umożliwiła komórkom przejście przez punkt kontrolny G2/M i podział mitotyczny.

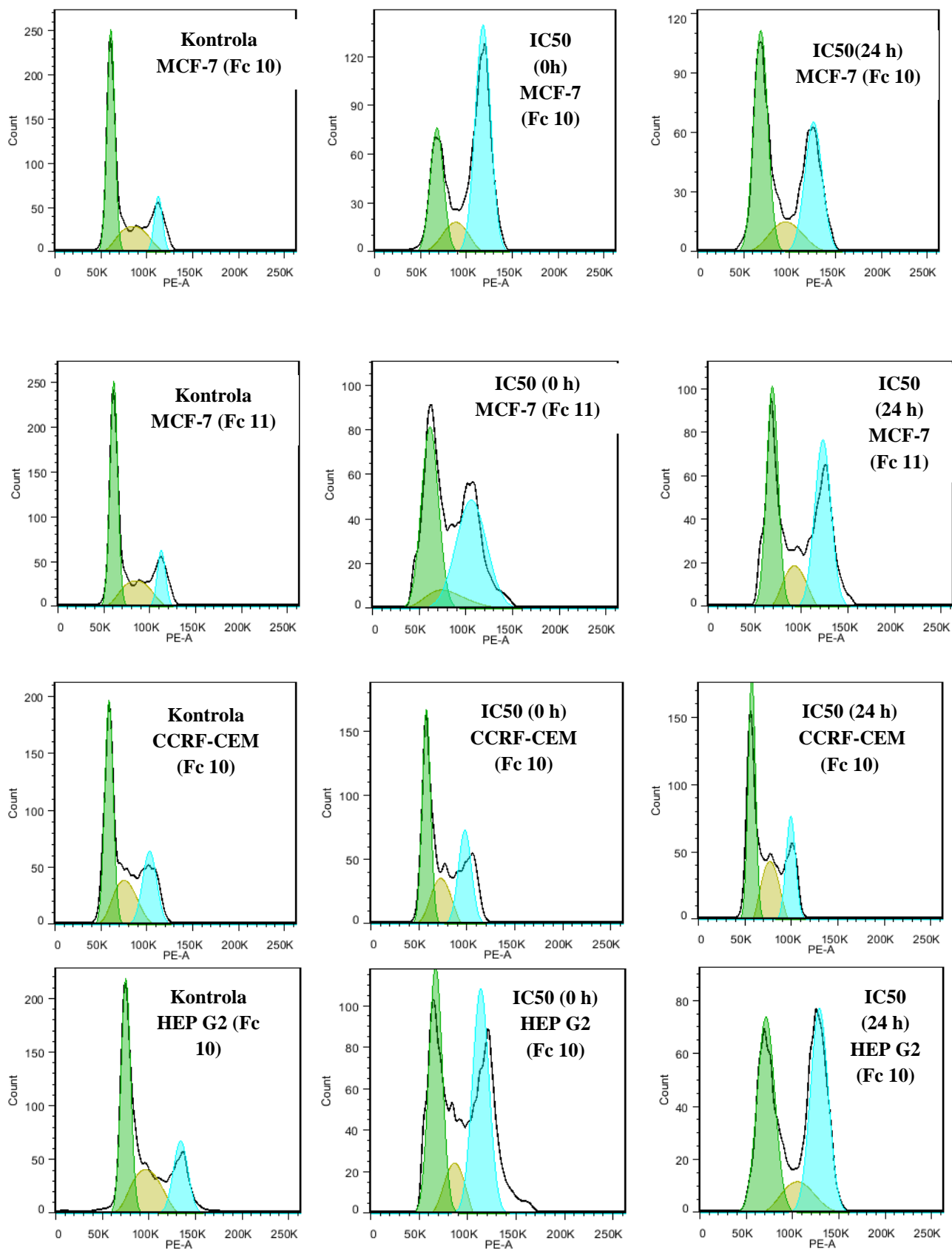




**Rysunek 24a.** Frakcja komórek nowotworowych linii MCF-7 znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Komórki inkubowano z metaloorganicznymi pochodnymi **10** oraz **11** przez 24 godziny. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).



**Rysunek 24b.** Frakcja komórek nowotworowych linii CCRF-CEM oraz HepG2 znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Komórki inkubowano z metaloorganiczną pochodną **10** przez 24 godziny. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

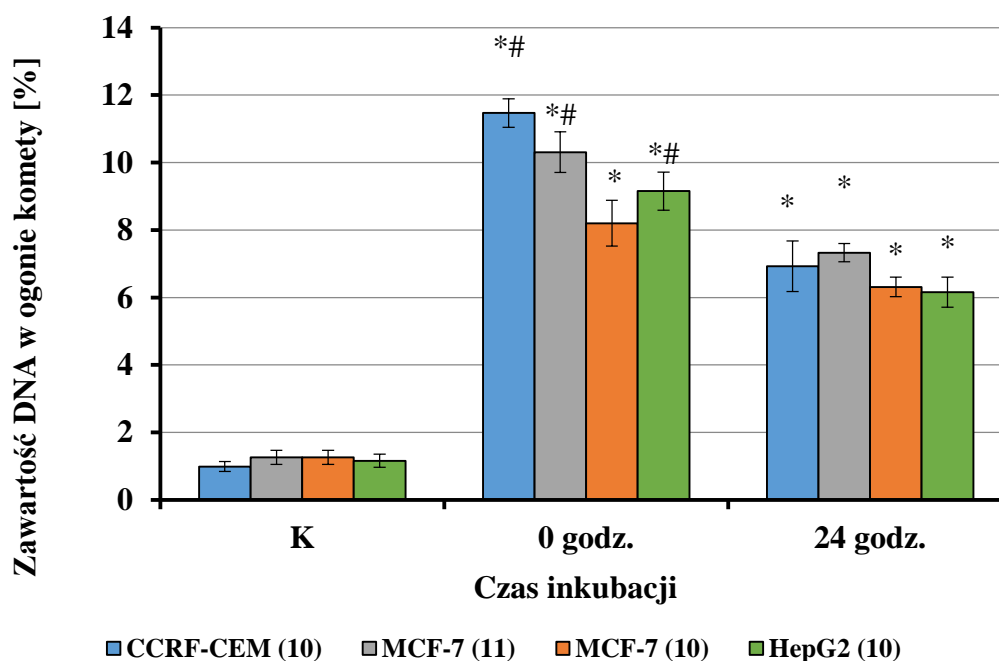


**Rysunek 25.** Histogramy DNA komórek nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7, HepG2, uzyskane z cytometrycznej analizy cyklu podziałowego. Komórki inkubowano z metaloorganicznymi pochodnymi **10** lub **11** przez 24 godziny.

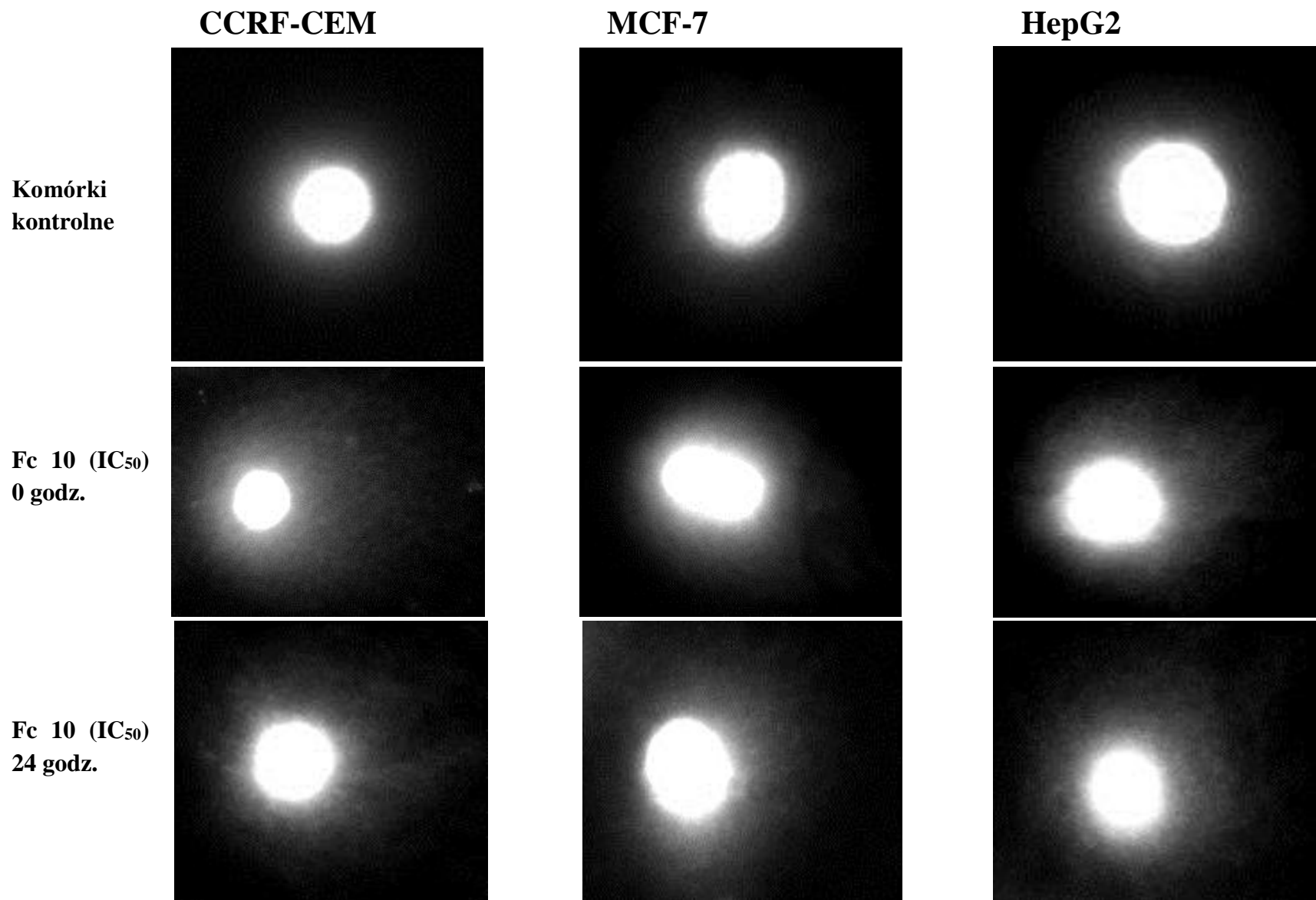
### 11.3.7. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową

W komórkach nowotworowych inkubowanych z badanymi ferrocenami, obserwowano istotny wzrost poziomu uszkodzeń DNA, przejawiający się zwiększoną zawartością DNA w ogonie komety. Najbardziej podatna na uszkodzenia było DNA linii białaczkowych CCRF-CEM, w których odnotowano ok. 10-krotny wzrost uszkodzeń DNA w komórkach traktowanych ferrocenem **10**, w porównaniu z kontrolą. Komórki MCF-7 raka piersi inkubowane z pochodnymi **10** lub **11** wykazywały większą wrażliwość na działanie drugiego z wymienionych powyżej związków.

Zastosowanie 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej, podczas której komórki namnażały się w medium pozbawionym pochodnych metaloorganicznych, spowodowało spadek uszkodzeń DNA. Zjawisko to obserwowano w przypadku wszystkich badanych linii komórkowych, jak również dla każdego związku poddanego analizie. Prawdopodobnym jest więc, że komórki nowotworowe usunęły część powstałych uszkodzeń DNA przez sprawne mechanizmy naprawcze. Procent uszkodzonego DNA w komórkach MCF-7, HepG2 oraz CCRF-CEM po 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej był mniejszy o około 1/3 w stosunku do czasu 0 godzin. Kinetyka procesu naprawczego przebiegała jednak różnie w poszczególnych typach komórek nowotworowych.



**Rysunek 26.** Uszkodzenia DNA generowane w komórkach nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7, oraz HepG2 przez metaloorganiczne pochodne **10** lub **11**. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS), # $p < 0,05$  0 godz. vs. 24 godz..



**Rysunek 27.** Zdjęcia komet DNA, uzyskanych z ludzkich komórek nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7 i HepG2, poddanych działaniu metaloorganicznych pochodnych **10** i **11**. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse, Tokyo, Japan.

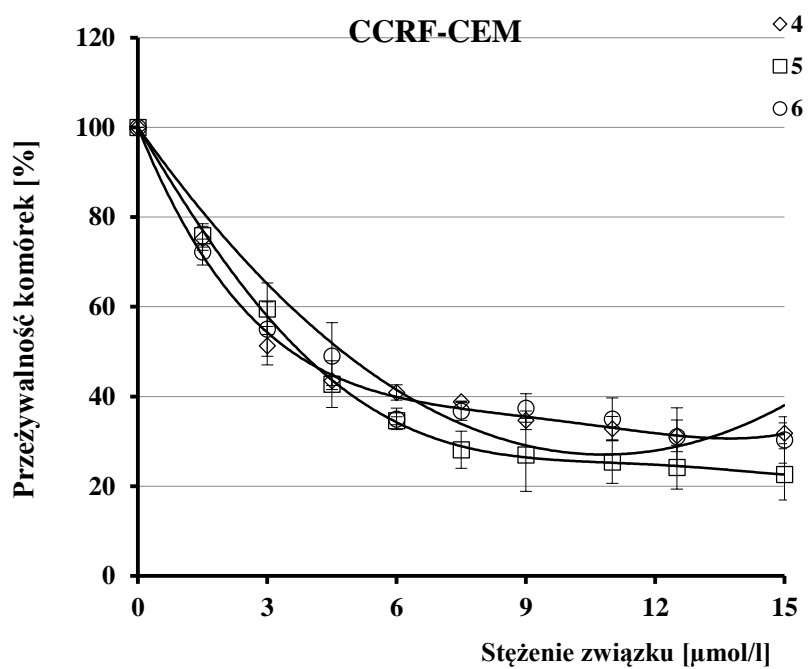
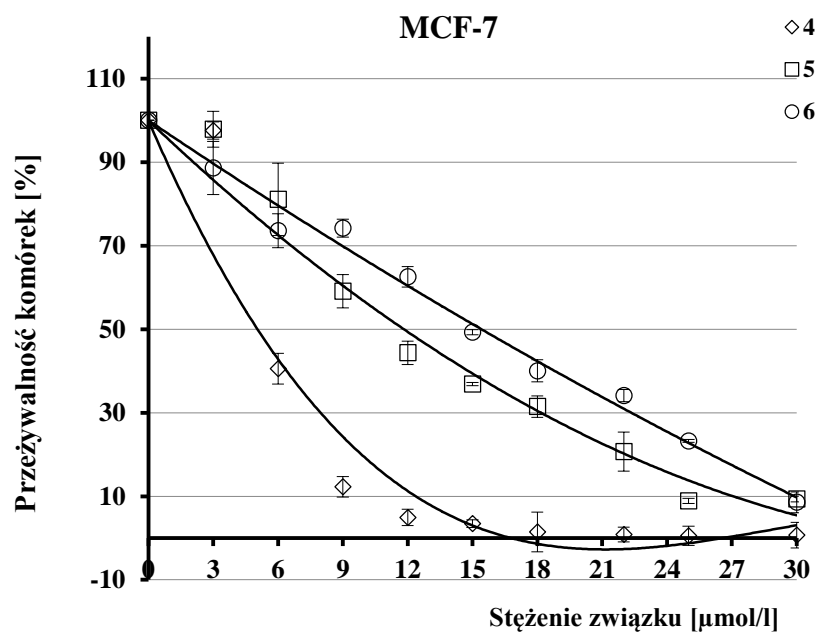
## 11.4. METALOORGANICZNE POCHODNE ALKILOWE ZAWIERAJĄCE PIERŚCIEN CHROMONOWY ORAZ ATOM ZŁOTA

### 11.4.1. Cytotoksyczność pochodnych ferrocenyłowych

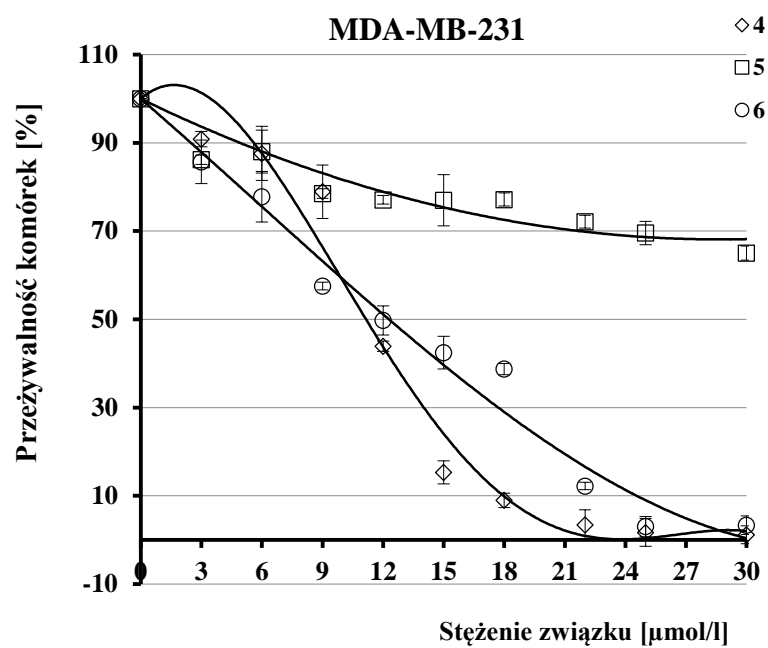
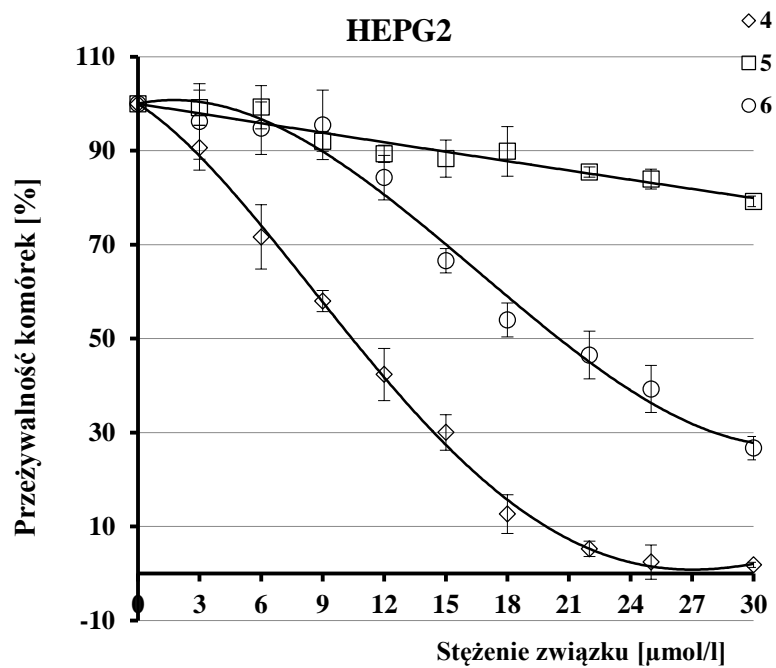
Cytotoksyczne właściwości ww. metaloorganicznych pochodnych oraz auranofiny zbadano w warunkach *in vitro* na podstawie ich zdolności do hamowania proliferacji komórek nowotworowych czterech linii: HepG2, MCF-7, MDA-MB-231 i CCRF-CEM. Żywotność komórek określono metodą spektrofotometryczną (test MTT). Odsetek żywych komórek w próbce przeliczono na procent kontroli (komórki inkubowane w PBS), których żywotność arbitralnie przyjęto za 100%. Zastosowano szeroki zakres stężeń badanych związków mieszczący się w zakresie 0,5 – 120  $\mu\text{mol/L}$ . Wyliczone na podstawie krzywych przeżywalności stężenia  $\text{IC}_{50}$  charakterystyczne dla każdego związku metaloorganicznego oraz auranofiny przedstawiono w tabeli 8.

**Tabela 8.** Wartości stężenia  $\text{IC}_{50}$  pochodnych **4-6** oraz **auranofiny** wyznaczone dla linii komórek MCF-7, MDA-MB-231, HepG2 oraz CCRF-CEM. Komórki inkubowano ze związkami metaloorganicznymi przez 24 godziny (efekt cytotoksyczny).

Linia komórkowa	Cytotoksyczne właściwości pochodnych alkilowych oraz auranofiny			
	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]			
	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Auranofina</b>
<b>HepG2</b>	10.0 $\pm$ 1.3	>120	19.5 $\pm$ 1.9	50.0 $\pm$ 2.7
<b>MCF-7</b>	5.5 $\pm$ 0.7	11.0 $\pm$ 0.8	13.0 $\pm$ 2.3	13.1 $\pm$ 0.9
<b>MDA-MB-231</b>	9.7 $\pm$ 2.5	49.7 $\pm$ 1,7	10.0 $\pm$ 3.4	3.0 $\pm$ 0.6
<b>CCRF-CEM</b>	3.5 $\pm$ 1.1	3.8 $\pm$ 0.9	4.2 $\pm$ 0.9	6.0 $\pm$ 1.2



**Rysunek 28a.** Krzywe przeżywalności komórek linii MCF-7, CCRF-CEM inkubowanych przez 24 godziny z pochodnymi alkilowymi 4-6.



**Rysunek 28b.** Krzywe przeżywalności komórek linii HepG2, oraz MDA-MB-231 inkubowanych przez 24 godziny z pochodnymi alkilowymi 4-6.



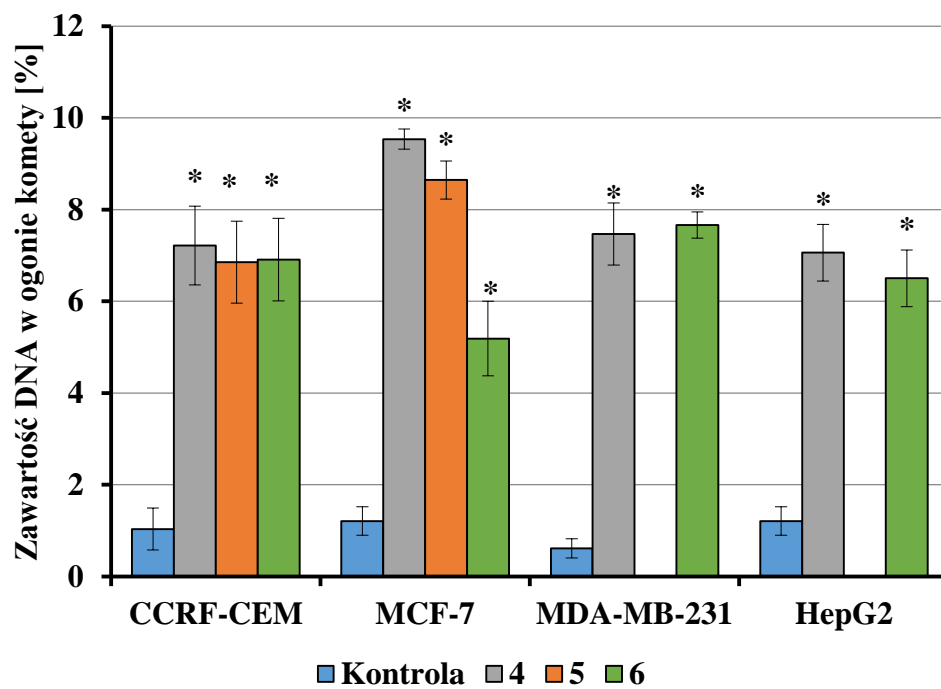
Wszystkie badane związki z tej grupy charakteryzowały się dużą efektywnością hamowania proliferacji komórek nowotworowych. Metaloorganiczne pochodne już w niskich, mikromolowych stężeniach przejawiały cytotoksyczne właściwości. Warto podkreślić, że obliczone dla analizowanych związków wartości stężenia  $IC_{50}$  są zbliżone do stężenia  $IC_{50}$  związku referencyjnego auranofiny. W niektórych przypadkach obserwowano nawet większą skuteczność działania nowo zsyntetyzowanych pochodnych. Najbardziej aktywną biologicznie cząsteczką był związek **4**, który powodował spadek przeżywalności 50% populacji komórek badanych linii nowotworowych już w zakresie 3,5 – 10  $\mu\text{mol/L}$ . Nieco mniej efektywną była pochodna **6**, natomiast ostatni z badanych związków **5** nie wykazywał cytotoksycznych właściwości w zakresie 0,5 – 120  $\mu\text{mol/L}$  wobec komórek linii HepG2. Zawieszona linia komórek białaczkowych CCRF-CEM pozostawała najbardziej wrażliwa na wszystkie pochodne metaloorganiczne.

Na podstawie uzyskanych wyników przeżywalności komórek eksponowanych na działanie analizowanych metaloorganicznych pochodnych oraz krzywych przeżywalności, do dalszych badań molekularnych mechanizmów aktywności przeciwnowotworowych wybrano związki **4**, **5**, **6** dla linii CCRF-CEM i MCF-7 oraz **4**, **6** dla HepG2 i MDA-MB-231.

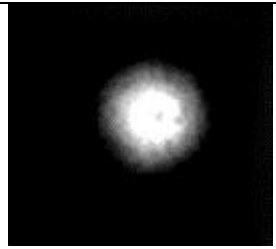
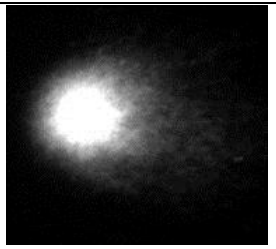
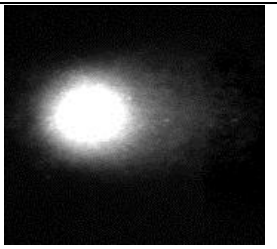



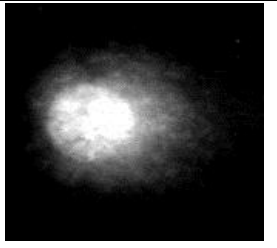


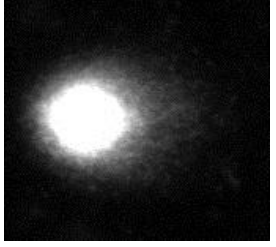


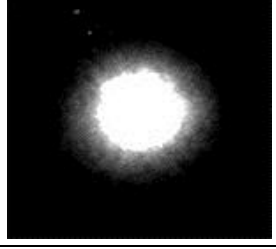
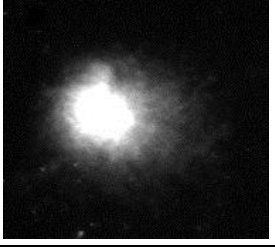


#### **11.4.2. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową**

W komórkach nowotworowych linii zawieszonych CCRF-CEM oraz adherentnych HepG2, MCF-7, MDA-MB-231, eksponowanych na działanie metaloorganicznych pochodnych obserwowano wzrost uszkodzeń materiału genetycznego w porównaniu z kontrolą. Skutkiem genotoksycznego działania alkilowych pochodnych złota był kilkakrotny wzrost zawartości DNA w ogonie komet. Wielkość zmian uwarunkowana była rodzajem linii komórkowej jak i rodzajem zastosowanego związku. Prawdopodobnym jest fakt, iż aktywność genotoksyczna poszczególnych pochodnych może warunkować w sposób pośredni ich właściwości cytotoksyczne i antyproliferacyjne.

Największe zmiany poziomu uszkodzeń DNA obserwowano dla linii komórek MCF-7 estrogenozależnego raka piersi traktowanych związkami **4** oraz **5** (odpowiednio około 9,5 i 8,5%). Co ciekawe, wysoka aktywność cytotoksyczna i antyproliferacyjna związku **6** względem wyżej wymienionej linii komórkowej ( $IC_{50}=13,1 \mu\text{mol/L}$ ), nie była skorelowana z równie wysoką efektywnością indukcji uszkodzeń DNA. Procentowa zawartość DNA w ogonie komety, uzyskanej po elektroforezie pojedynczych komórek MCF-7 traktowanych związkiem **6**, była najniższa i wynosiła ok. 5%. Wynik ten świadczyć może, iż za cytotoksyczne właściwości wspomnianej metaloorganicznej pochodnej odpowiadać mogą inne mechanizmy, niezwiązane z genotoksycznością i uszkodzeniem materiału genetycznego komórek nowotworowych. W przypadku pozostałych linii komórkowych, zawartość DNA w ogonie była zbliżona i wynosiła około 7-8% względem kontroli.



**Rysunek 29.** Uszkodzenia DNA, generowane w komórkach nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7, MDA-MB-231 oraz HepG2 przez metaloorganiczne pochodne złota 4-6. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

				Pochodne metaloorganiczne		
Komórki kontrolne	Fc 4	Fc 5	Fc 6			
<b>CCRF-CEM</b>						
						
<b>MCF-7</b>						
						
<b>HEPG2</b>						
						
<b>MDA-MB-231</b>						
						

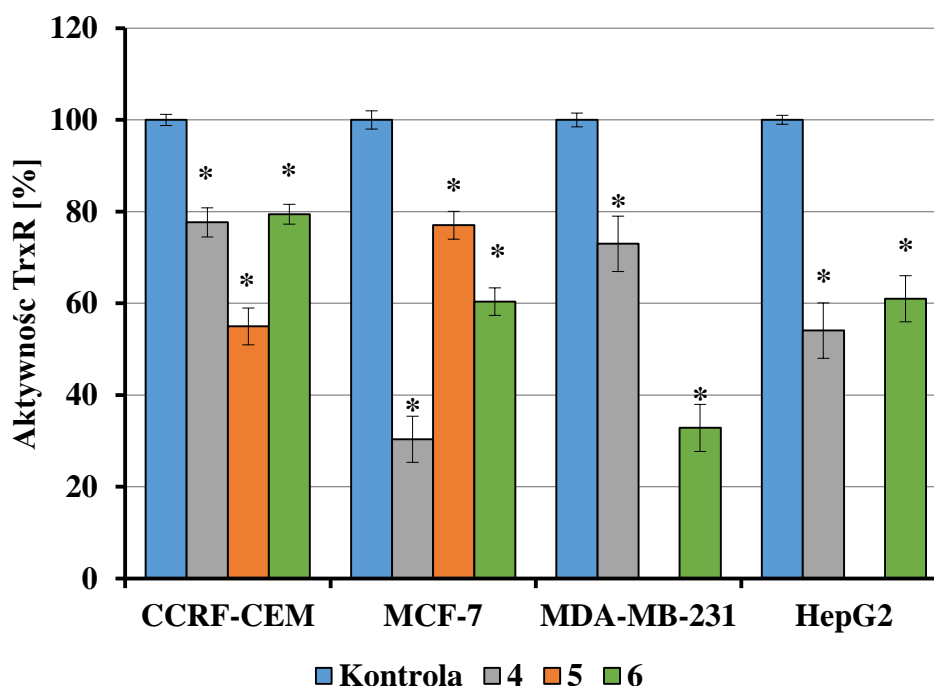
**Rysunek 30.** Zdjęcia komet DNA uzyskanych z ludzkich komórek nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7, MDA-MB-231 i HepG2, poddanych działaniu analizowanych metaloorganicznych pochodnych złota 4-6. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse, Tokyo, Japan.

### 11.4.3. Analiza aktywności reduktazy tioredoksyny (TrxR)

Enzymatyczny układ białek tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny pełni w organizmie człowieka szereg istotnych funkcji, niezbędnych do zachowania homeostazy. Jednym z ważniejszych biologicznych działań jest kontrola wzrostu oraz proliferacji komórek, regulacja procesów uczestniczących w indukcji apoptozy oraz ochrona przed stresem oksydacyjnym. Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się roli układu tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny w kancerogenezie. Jak wykazano podwyższony poziom ekspresji genów, kodujących białka tego układu, sprzyja zwiększonej proliferacji komórek nowotworowych. Dużą nadzieję pokłada się w m.in. w kompleksach i związkach złota, które mogą działać jako inhibitory TrxR, powodując tym samym wzrost apoptozy komórek nowotworowych i zahamowanie ich proliferacji (Szokalska, 2008).

W celu oceny wpływu badanych pochodnych metaloorganicznych na aktywność reduktazy tioredoksyny w komórkach nowotworowych zastosowano komercyjnie dostępny zestaw odczynników Thioredoxin Reductase Activity Colorimetric Assay Kit. Komórki inkubowano przez 24 godziny z pochodnymi zawierającymi złoto, a następnie dokonano oznaczenia aktywności TrxR. Wyniki przedstawiono na Rys. 31.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że każdy z badanych związków złota powodował istotny statystycznie spadek aktywności TrxR w komórkach nowotworowych linii HepG2, MCF-7, MDA-MB-231 oraz CCRF-CEM. Procent inhibicji aktywności enzymu zawarty był w granicach 20-70% w zależności od rodzaju linii komórkowej oraz rodzaju badanego związku. Najmniejszy wpływ hamujący wykazywały związki złota **4** i **6** (20%) w białaczkowej linii CCRF-CEM, gdzie obserwowano najmniejsze hamowanie aktywności enzymatycznej TrxR przez wszystkie badane związki złota. Wynik ten uzyskano zarówno dla związku **4** jak i **6**. Lepszą efektywność wobec ww. linii komórek nowotworowych wykazywała natomiast pochodna **5**, która powodowała około 50% spadek aktywności TrxR. Brak wyraźnych różnic w działaniu związków złota **4** i **6** na aktywność reduktazy odnotowano również w przypadku linii HepG2, w której aktywność enzymu w komórkach eksponowanych na działanie związków **4** lub **6** wynosiła około 60%. Największy wpływ na aktywność TrxR (hamowanie 70%) obserwowano dla związków **4** i **6** w liniach estrogenozależnego MCF-7 i estrogenoniezależnego raka piersi MDA-MB-231. Otrzymane wyniki świadczą iż jednym z celów molekularnych ścieżek aktywności przeciwnowotworowej badanych metaloorganicznych cząsteczek złota jest enzym reduktaza tioredoksyny. Obniżenie aktywności tego enzymu może powodować wzrost hamowania proliferacji komórek nowotworowych. Ciekawym jest jednak fakt, iż efektywność hamowania aktywności TrxR przez związki **4** – **6** nie była bezpośrednio skorelowana z ich właściwościami cytotoksycznymi (stężenie IC<sub>50</sub>), co świadczyć może o dodatkowych mechanizmach, warunkujących cytotoksyczne działanie badanych pochodnych metaloorganicznych.



**Rysunek 31.** Względna aktywność reduktazy tioredoksyny (TrxR) w komórkach nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7, MDA-MB-231 i HepG2, poddanych działaniu analizowanych metaloorganicznych pochodnych złota 4-6. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

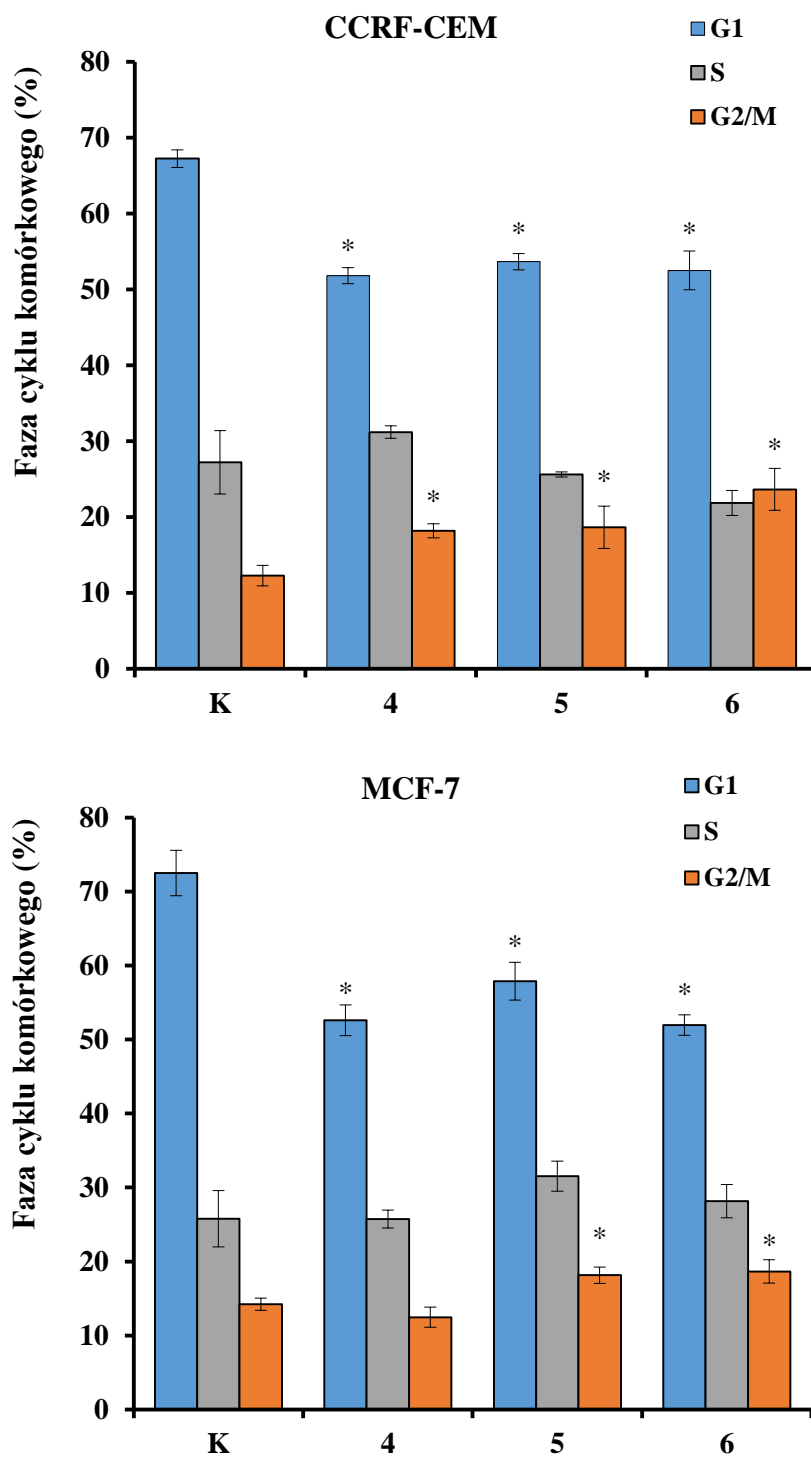
#### 11.4.4. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej

Cytometryczna analiza cyklu podziałowego komórek HepG2, MCF-7, MDA-MB-231 oraz CCRF-CEM wykazała iż badane związki złota nie powodują, jak to miało miejsce w przypadku kobaltowych pochodnych ferrocenyłowych, zahamowanie cyklu w fazie G2/M. Istotnie statystyczny wzrost frakcji komórek w punkcie kontrolnym G2/M obserwowano jedynie w linii CCRF-CEM. Był on jednak stosunkowo niewielki (6-11%) względem komórek kontrolnych. Dla wszystkich zastosowanych związków, niezależnie od linii komórkowej, obserwowano ok. 15-20% spadek frakcji komórek w fazie G1. Warto podkreślić jest pojawienie się na histogramach DNA charakterystycznego piku sub-G1 zawierającego apoptotyczne komórki hipodiploidalne. Wynik ten uzyskano dla wszystkich zastosowanych metaloorganicznych pochodnych oraz linii komórek nowotworowych, eksponowanych na ich działanie. Największy wzrost (ok. 20%) frakcji komórek w piku sub-G1 obserwowano w komórkach estrogenozależnego raka piersi MCF-7, traktowanych związkiem 4. Procent apoptotycznych hipodiploidalnych komórek nowotworowych we frakcji sub-G1 przedstawiono w tabeli 9.

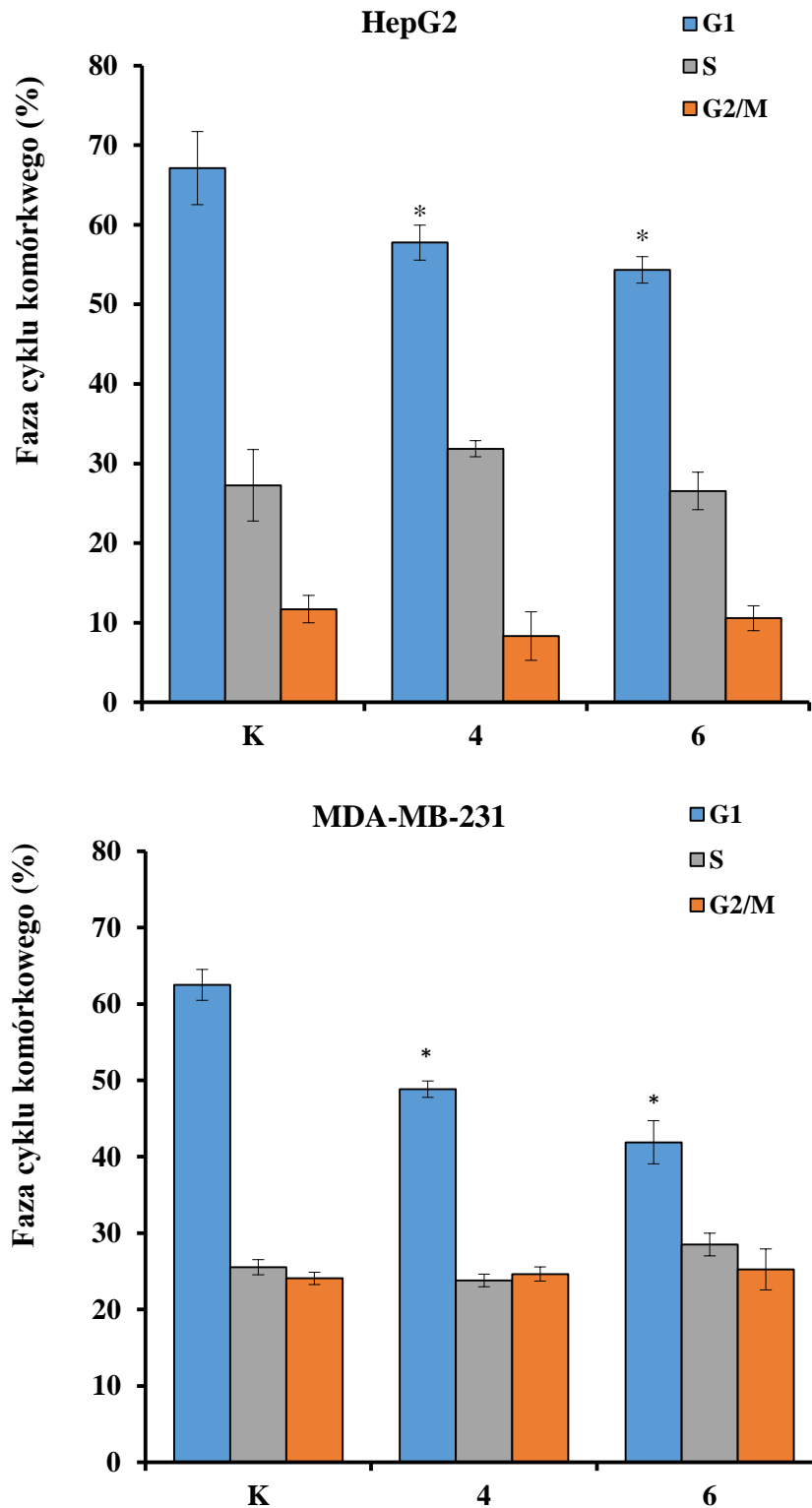
Cytometryczna analiza cyklu podziałowego komórek traktowanych badanymi metaloorganicznymi pochodnymi potwierdziła ich właściwości genotoksyczne powodujące uszkodzenia materiału genetycznego. Pojawienie się piku sub-G1 na histogramach DNA uzyskanych metodą cytometryczną, świadczy również o uruchomieniu szlaku programowanej śmierci komórki przez analizowane związki złota.

**Tabela 9.** Odsetek komórek sub-G1 histogramu DNA, uzyskanego z cytometrycznej analizy cyklu podziałowego komórek nowotworowych linii HepG2, MCF-7, MDA-MB-231 oraz CCRF-CEM, poddanych działaniu metaloorganicznych pochodnych **4**, **5** oraz **6**. \*p<0,05 w stosunku do kontroli (komórki traktowane PBS).

<b>Linia komórkowa</b>	<b>Odsetek komórek sub-G1 histogramu DNA</b>			
	<b>Kontrola</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>HepG2</b>	1,95 ± 0,23	15,31 ± 1,64*	-	12,46 ± 1*
<b>MCF-7</b>	2,39 ± 0,64	13,32 ± 1,39*	-	5 ± 2.51
<b>MDA-MB-231</b>	2,81 ± 0,51	13,33 ± 1,37*	6,18 ± 1,1	9,64 ± 1,12*
<b>CCRF-CEM</b>	2,87 ± 0,9	18,58 ± 2,27*	9,42 ± 1*	10,48 ± 0,6*



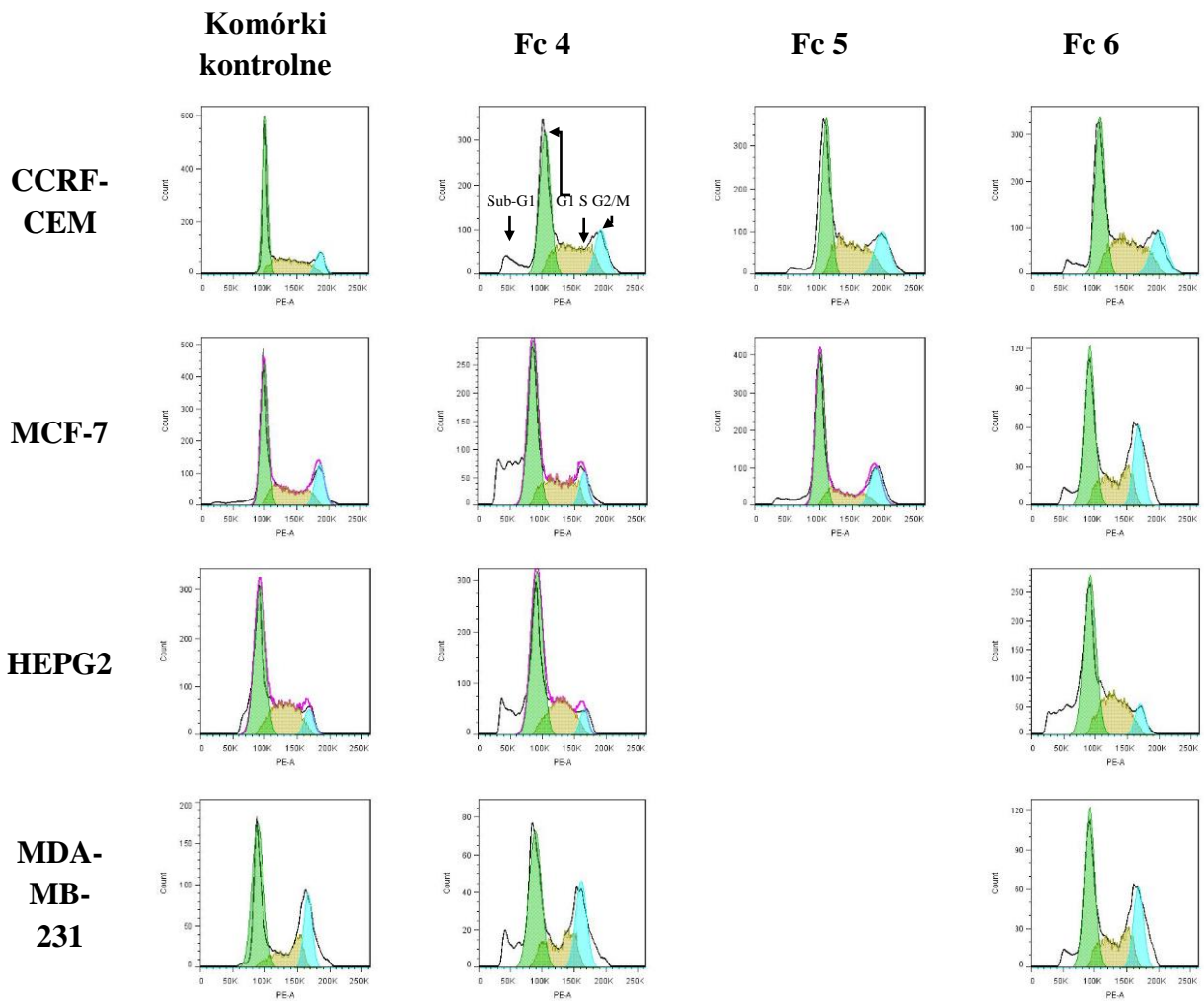
**Rysunek 32a.** Frakcja komórek nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7 znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Komórki inkubowano z metaloorganicznymi pochodnymi 4-6 przez 24 godziny. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).



**Rysunek 32b.** Frakcja komórek nowotworowych linii MDA-MB-231, HepG2 znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Komórki inkubowano z metaloorganicznymi pochodnymi 4-6 przez 24 godziny. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).



## Pochodna metaloorganiczna



**Rysunek 33.** Histogramy DNA komórek nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7, MDA-MB-231 i HepG2 uzyskane z cytometrycznej analizy cyklu podziałowego. Komórki inkubowano przez 24 godz. z analizowanymi metaloorganicznymi pochodnymi **4 – 6** przez 24 godz..

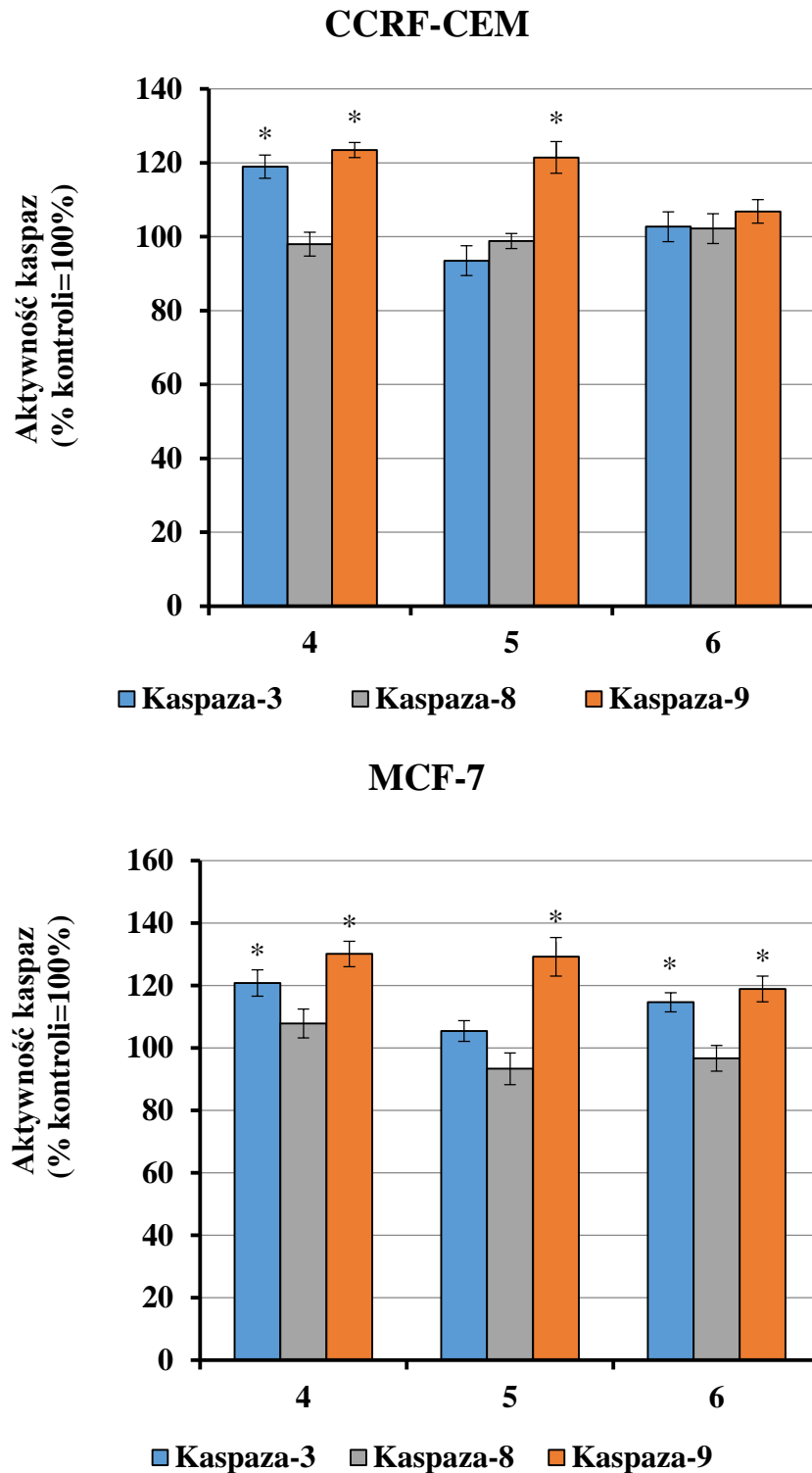
#### 11.4.5. Zmiany aktywności kaspaz 8, 9 i 3

Kaspazy, enzymy należące do proteaz serynowych, pełnią kluczową funkcję w najważniejszych etapach szlaku programowanej śmierci komórki. Aktywacja kaspazy 8 zachodzi głównie podczas inicjacji PCD na szlaku receptorowym (zewnątrzpochodnym), natomiast kaspaza 9 zaangażowana jest w szlak mitochondrialny (wewnątrzpochodny). Oba białka należą do grupy kaspaz inicjatorowych szlaku apoptotycznego. Ostatnia z badanych proteaz, kaspaza 3, określana jest jako kaspaza efektorowa ze względu na udział w końcowym etapie obu szlaków PCD.

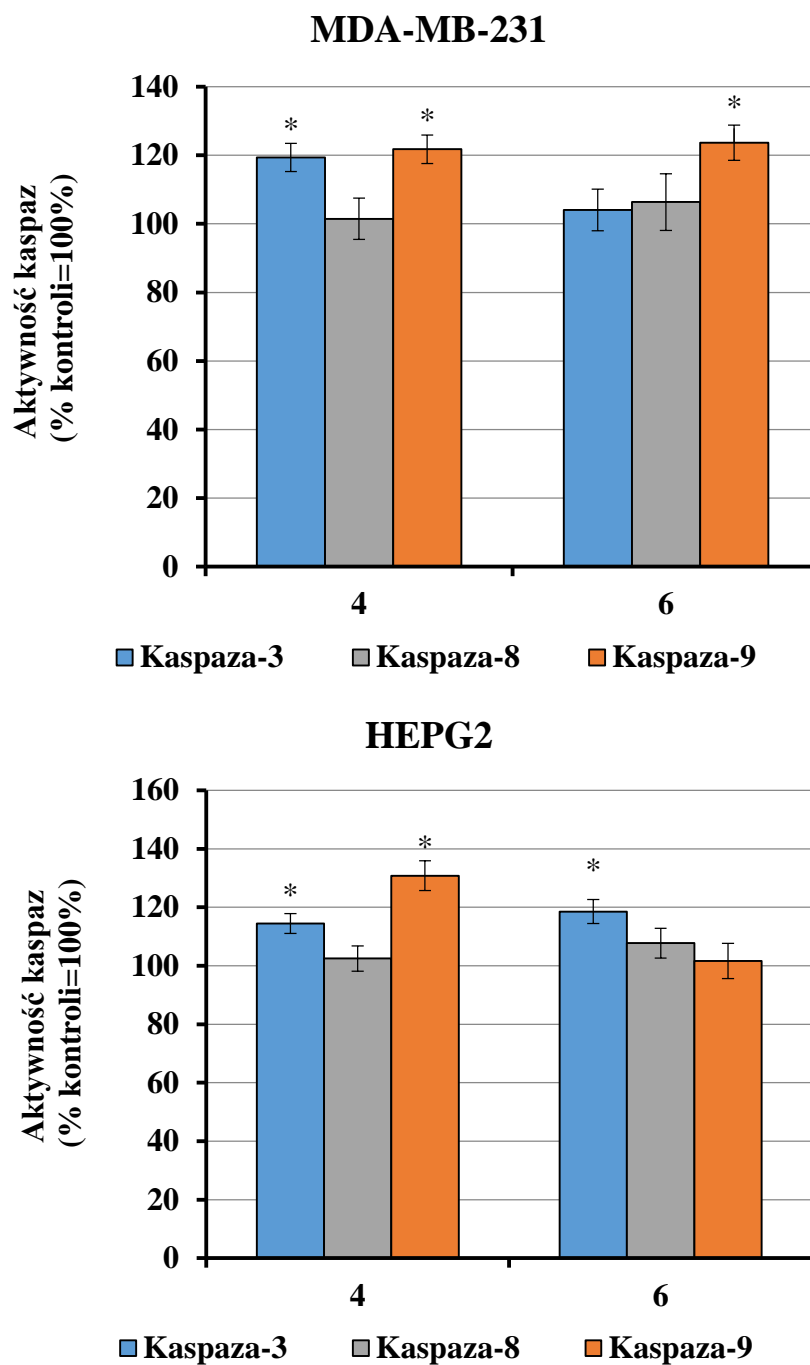
W celu oceny proapoptotycznych właściwość badanych metaloorganicznych pochodnych złota oraz szlaków PCD inicjowanych przez nie w badanych liniach komórek nowotworowych, eksponowanych na ich działanie, zastosowano komercyjnie dostępne testy analizy aktywności trzech ww. kaspaz. Uzyskane wyniki zamieszczono na Rys. 34a-b.

Wykonane badania nie wykazały istotnych statystycznie zmian aktywności kaspazy 8 we wszystkich zastosowanych wariantach eksperymentu. Wydaje się więc wysoce prawdopodobne, iż apoptoza indukowana przez analizowane metaloorganiczne pochodne złota, nie przebiega na szlaku receptorowym (zewnątrzpochodnym). Za tą hipotezę przemawia także wzrost aktywności dwóch pozostałych proteaz serynowych – kaspazy 9 oraz 3. Największe zmiany stwierdzono w komórkach traktowanych związkiem 4. Powodował on we wszystkich czterech liniach komórek nowotworowych wzrost aktywności kaspaz 3 i 9, mieszczący się w granicach odpowiednio 15-20% oraz 25-30%. W przypadku metaloorganicznych pochodnych 5 oraz 6 obserwowano głównie wzrost aktywności inicjatorowej kaspazy 9. Brak istotnych statystycznie zmian aktywności enzymu wykazano jedynie dla linii HepG2. W pozostałych liniach komórkowych (MCF-7, MDA-MB-231, CCRF-CEM) wzrost aktywności kaspazy 9 mieścił się w granicach 10-25%.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż badane metaloorganiczne pochodne złota mogą indukować apoptozę ludzkich komórek nowotworowych głównie na szlaku wewnątrzpochodnym (mitochondrialnym), w którym zaangażowane są kaspaza 9 oraz 3. Za hipotezą tą przemawia dodatkowo fakt, iż związki te nie powodowały zmian aktywności inicjatorowej proteazy serynowej (kaspazy 8), zaangażowanej we wczesne etapy procesu programowanej śmierci komórki, przebiegającej przy udziale receptorów śmierci (szlak receptorowy; zewnątrzpochodny).



**Rysunek 34a.** Aktywność kaspaz 3, 8 i 9 w komórkach nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7, inkubowanych z metaloorganicznymi pochodnymi 4-6 przez 24 godz.. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).



**Rysunek 34b.** Aktywność kaspaz 3, 8 i 9 w komórkach nowotworowych linii MDA-MB-231, HepG2 inkubowanych z metaloorganicznymi pochodnymi 4-6 przez 24 godz.. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

## 11.5. POCHODNA DIRUTENU-1 (DiRu-1)

### 11.5.1. Cytotoksyczność pochodnej dirutenu-1

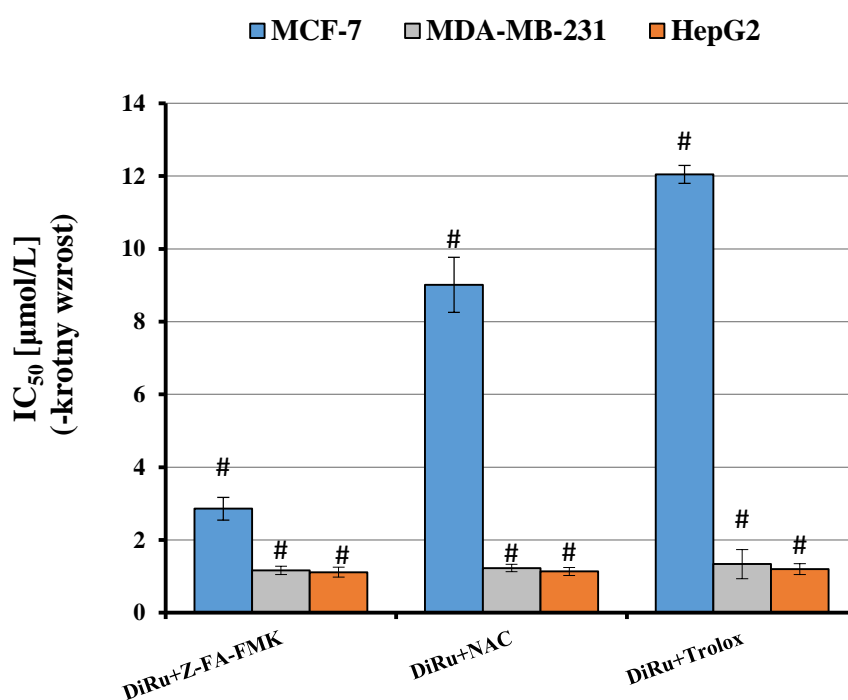
Pierwszym etapem badań nad molekularnymi mechanizmami aktywności przeciwnowotworowych pochodnej dirutenu-1 (**DiRu-1**) była ocena *in vitro* jej działania cytotoksycznego oraz antyproliferacyjnego wobec linii komórek ludzkiego raka HepG2, MDA-MB-231 i MCF-7. Żywotność komórek określono metodą spektrofotometryczną (test MTT). Odsetek żywych komórek w próbie przeliczono na procent kontroli (komórki inkubowane w PBS), których żywotność arbitralnie przyjęto za 100%. Zgodnie z oczekiwaniami, obserwowano hamowanie wzrostu komórek oraz znaczny spadek ich żywotności przy wzrastającym stężeniu **DiRu-1** dla wszystkich linii komórkowych. Pochodna rutenu już w niskich, nanomolowym zakresie stężeń, wykazywała wysoką cytotoksyczność wobec wszystkich badanych linii komórek nowotworowych. Komórki MDA-MB-231 i HepG2 charakteryzowały się stosunkowo podobną wrażliwością na **DiRu-1** (odpowiednio  $IC_{50} = 228,1 \pm 8,1$  i  $268,2 \pm 4,4$  nmol/L). Komórki MCF 7 były natomiast około 3-krotnie bardziej czułe ( $IC_{50} = 77$  nmol/L) na cytotoksyczne działanie analizowanej cząsteczki. Do dalszej analizy wyselekcjonowano linię najbardziej wrażliwą – MCF-7.

W celu oceny udziału RFT powstających w wyniku działania **DiRu-1** na całkowitą cytotoksyczność cząsteczki, komórki przed inkubacją ze związkiem preinkubowano przez 1 godzinę z przeciwutleniaczami: N-acetylocysteiną (NAC), lub Troloxem oraz inhibitorem kaspaz Z-FA-FMK. Zarówno przeciwutleniacze, jak i inhibitor znacznie osłabiały cytotoksyczności **DiRu-1**, co odzwierciedla zmniejszenie jego wartości  $IC_{50}$  (tabela 10). 1-godzinna preinkubacja komórek z-FA-FMK, NAC lub Troloxem, powodowała odpowiednio, 3-, 9- i 12-krotny wzrost  $IC_{50}$  **DiRu-1**. Pochodna witaminy E wykazała najwyższą wydajność hamowania cytotoksycznych właściwości metaloorganicznej cząsteczki.

Wyniki te wskazują na znaczenie stresu oksydacyjnego generowanego przez **DiRu-1** w kształtowaniu całkowitej aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych.

**Tabela 10.** Wartości stężenia IC<sub>50</sub> pochodnej dirutenu-1 **DiRu-1** wyznaczone dla linii komórek MCF-7, MDA-MB-231 oraz HepG2. Komórki inkubowano ze związkiem metaloorganicznym przez 24 godziny (efekt cytotoksyczny). Wpływ przeciwutleniaczy (1-godzinna preinkubacja) NAC (3 mmol/l), Troloxu (50 µmol/L) oraz inhibitora kaspaz Z-FA-FMK na cytotoksyczność **DiRu-1**.

Linia komórkowa	Cytotoksyczne właściwości pochodnej dirutenu-1 , IC <sub>50</sub> [nmol/L]			
	DiRu-1	DiRu-1+Z-FA-FMK	DiRu-1+NAC	DiRu-1+Trolox
MCF-7	77,2 ± 1,4	226,3 ± 7,3	713,1 ± 9,8	953,3 ± 11,5
MDA-MB-231	228,1 ± 8,1	264,7 ± 6,3	280,3 ± 5,9	305,1 ± 4,7
HepG2	268,2 ± 4,4	298,2 ± 5,2	304,1 ± 3,7	321,1 ± 6,5



**Rysunek 35.** Wpływ przeciwutleniaczy NAC (3 mmol/l), Troloxu (50 µmol/l) oraz inhibitora kaspaz Z-FA-FMK na właściwości cytotoksyczne **DiRu-1** względem komórek linii MCF-7, MDA-MB-231 oraz HepG2. Komórki przed inkubacją ze związkiem metaloorganicznym preinkubowano przez 1 godzinę z inhibitorami. Komórki traktowano **DiRu-1** w szerokim zakresie stężeń (0-1000 nmol/L) przez 24 godziny. Frakcję żywych komórek oceniano metodą MTT. IC<sub>50</sub> **DiRu-1** przyjęto jako 1. #p<0,05 vs. **DiRu-1**.

### 11.5.2. Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem podwójnego barwienia komórek barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst 33258 i jodkiem propidyny (PI)

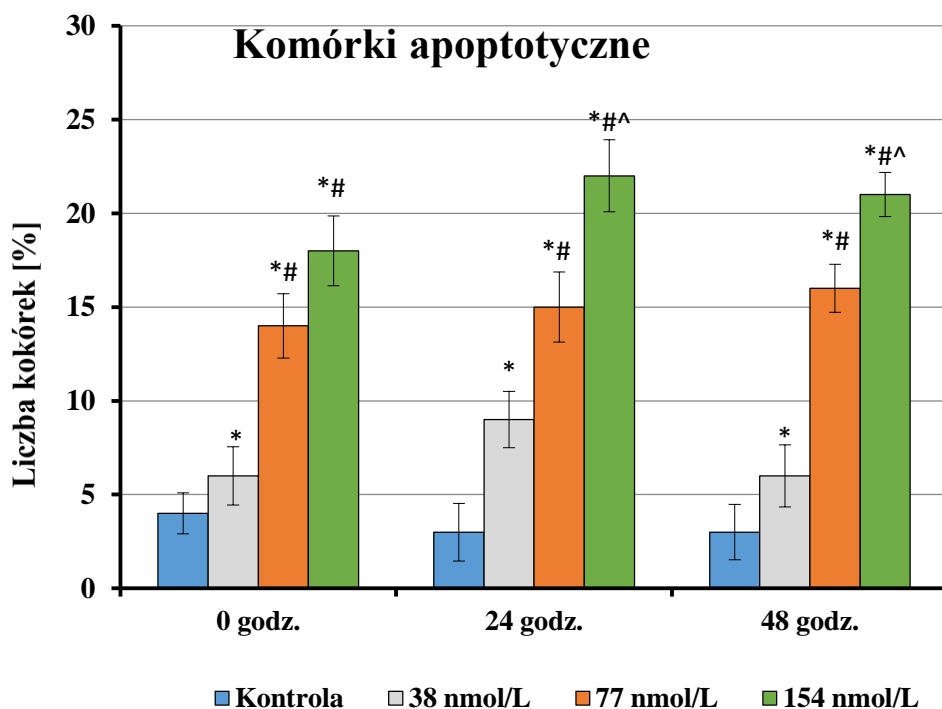
Ocenę proapoptotycznych właściwości pochodnej rutenu przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Analiza umożliwiła ocenę ilościową oraz jakościową typu śmierci komórek nowotworowych oraz procentowego rozkładu frakcji poszczególnych populacji komórek.

Komórki MCF-7 inkubowano z badaną pochodną metaloorganiczną w stężeniach  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (38 nmol/L), IC<sub>50</sub> (77 nmol/L) oraz 2xIC<sub>50</sub> (154 nmol/L) przez 24 godz., a następnie zmieniano medium i hodowano komórki przez następne 24 lub 48 godz. (hodowla poinkubacyjna). Oznaczenia apoptozy oraz nekrozy wykonywano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji z **DiRu-1** (0 godz.) oraz po 24- (24 godz.) i 48-godzinnej (48 godz.) hodowli komórek w medium nie zawierającym **DiRu-1**.

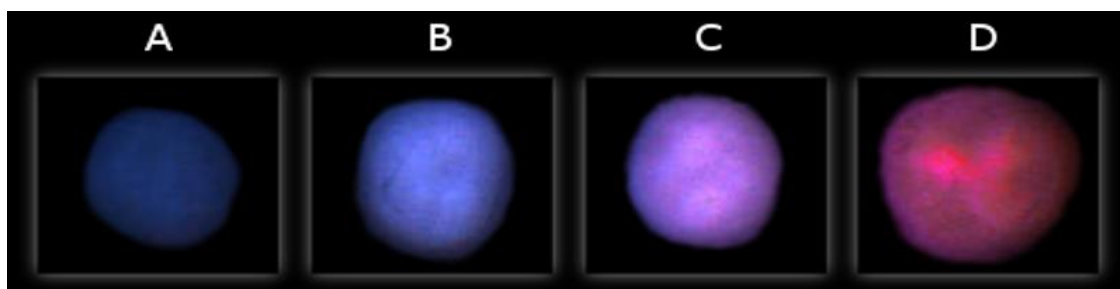
Uzyskane wyniki wskazują, iż pochodna **DiRu-1** powoduje w komórkach nowotworowych MCF-7 indukcję zarówno apoptozy, jak i nekrozy. Odsetek komórek nekrotycznych w całkowitej populacji komórek traktowanych ww. związkami był szczególnie widoczny w przypadku najwyższego zastosowanego stężenia (154 nmol/L) dla wszystkich czasów inkubacji. Indukcja PCD połączona była z charakterystycznymi dla tego procesu zmianami morfologii komórek takimi jak kondensacja chromatyny i jej dalsza marginalizacja oraz obkurczanie jądra komórkowego.

Poziom indukcji śmierci komórek MCF-7 obu rodzajów pozytywnie skorelowany był z zastosowanym stężeniem metaloorganicznej pochodnej. Z drugiej strony, nie obserwowano takiej zależności dla poszczególnych czasów hodowli poinkubacyjnej. W przypadku 24- i 48 godz. hodowli komórek w medium pozbawionym **DiRu-1**, nie obserwowano istotnego statystycznie zmniejszenia populacji komórek objętych PCD lub nekrozą, w stosunku do czasu 0 godz.

W wyniku traktowania komórek pochodną **DiRu-1** w najniższym stężeniu (38 nmol/L), obserwowano wzrost puli komórek apoptotycznych (wczesna oraz późna apoptoza) o ok. 1,5 razy (6-8% całkowitej populacji) w stosunku do komórek kontrolnych nietraktowanych metaloorganiczną pochodną. Wyższe stężenia **DiRu-1**, jakie zastosowano w eksperymencie powodowały zwiększenie frakcji komórek objętych szlakiem PCD względem kontroli i wynosiły odpowiednio 15-17% oraz 18-21% całkowitej populacji komórek. Wyniki uzyskane z analizy identyfikacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych z zastosowaniem podwójnego barwienia przedstawiono na Rys 38. Odsetek apoptotycznych komórek MCF-7 raka piersi po ich 24-godzinnej inkubacji z **DiRu-1** w stężeniach 38 nmol/L, 77 nmol/L i 154 nmol/L oraz 24- i 48-godzinnej hodowli komórek w medium nie zawierającym DiRu-1 przedstawiono na Rys 36.

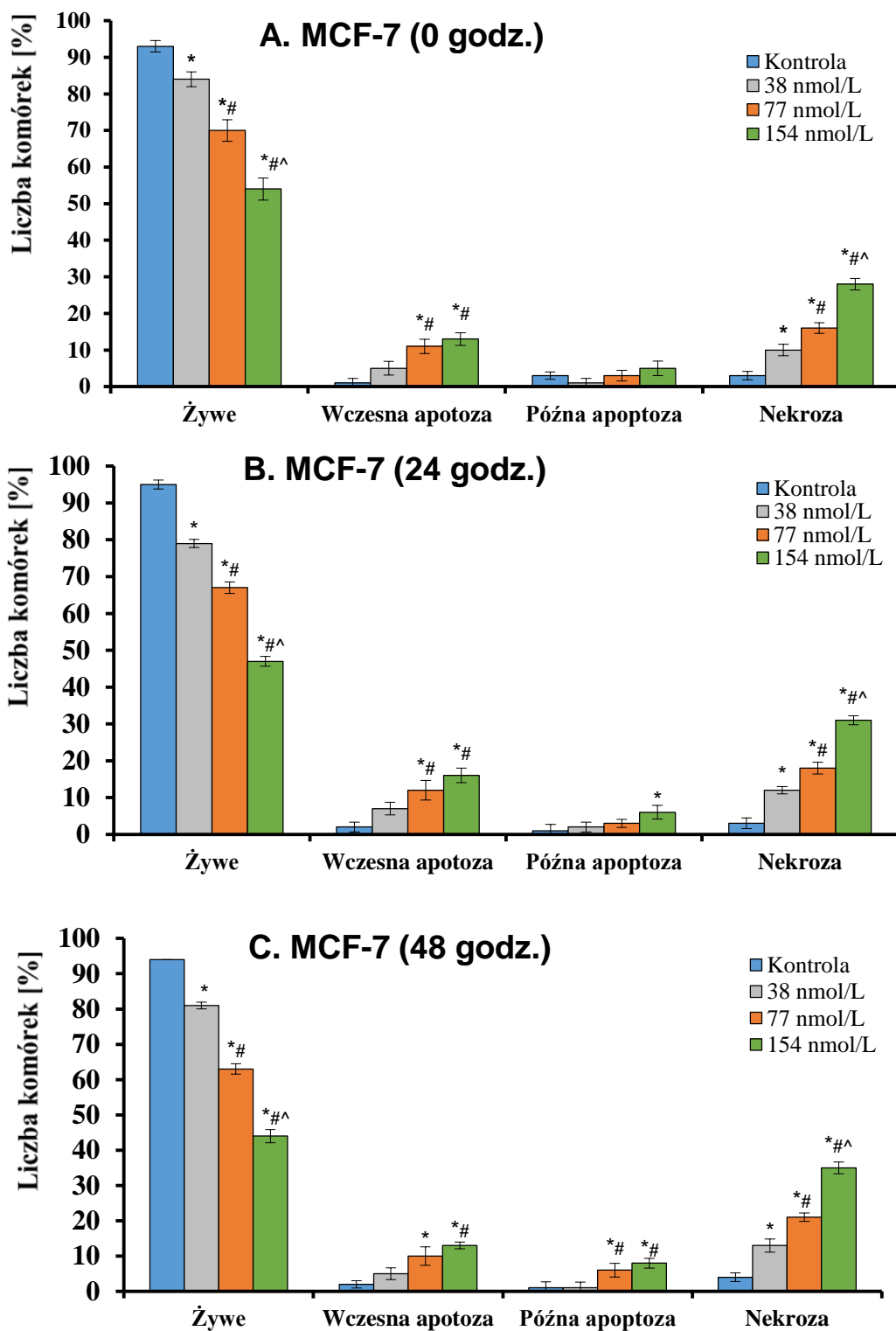


**Rysunek 36.** Odsetek apoptotycznych komórek MCF-7 raka piersi po ich 24-godzinnej inkubacji z **DiRu-1** w stężeniach  $\frac{1}{2}$   $IC_{50}$  (38 nmol/L),  $IC_{50}$  (77 nmol/L) oraz  $2xIC_{50}$  (154 nmol/L) oraz 24- i 48-godzinnej hodowli komórek w medium nie zawierającym **DiRu-1**. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS); # $p < 0,05$  vs. 38 nmol/L **DiRu-1**; ^ $p < 0,05$  vs. 77 nmol/L **DiRu-1**.

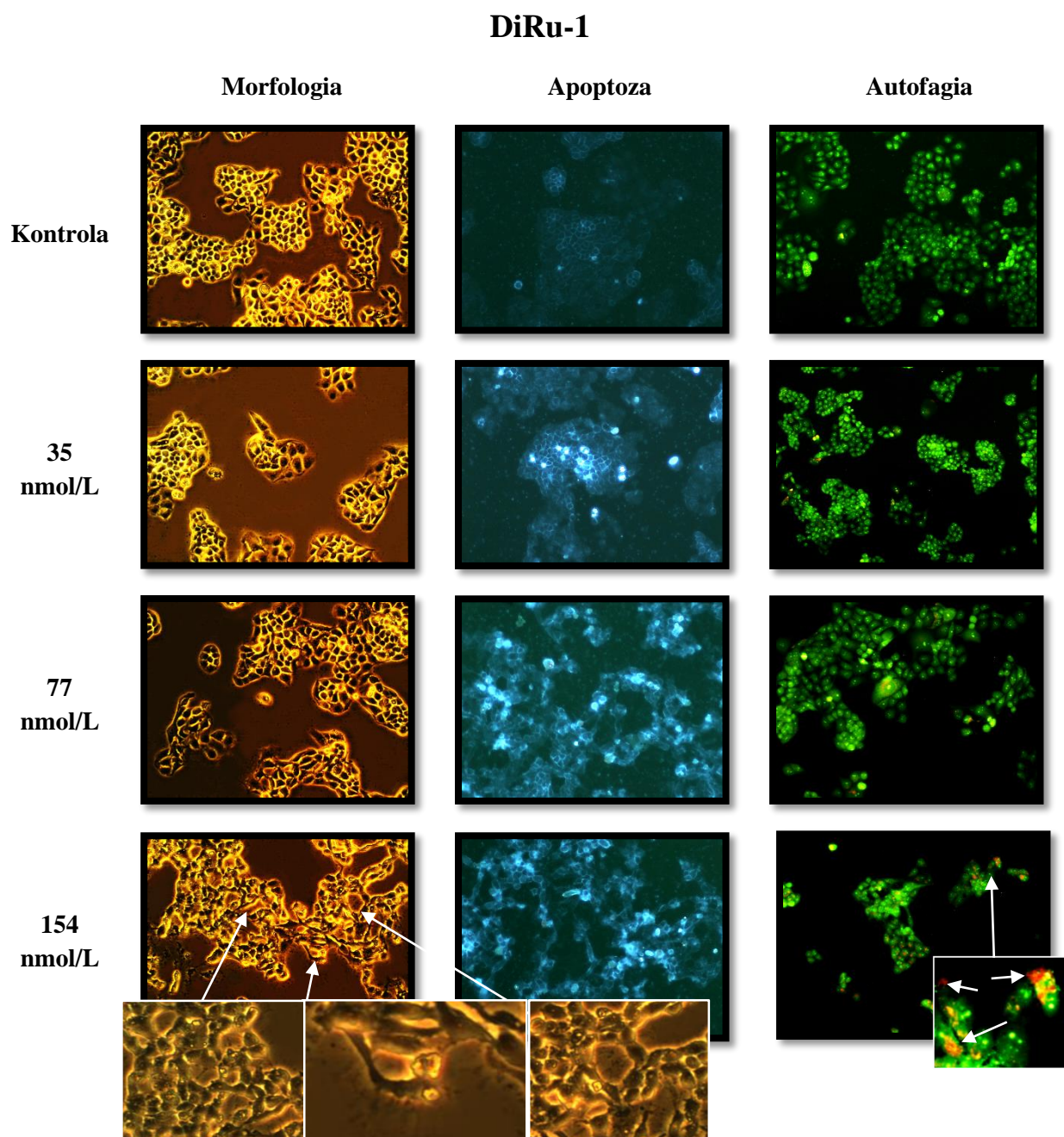


**Rysunek 37.** Morfologia żywych (A), wczesno-apoptotycznych (B), późno-apoptotycznych (C) i nekrotycznych (D) komórek MCF-7 raka piersi, barwionych podwójnie fluorochromami Hoechst 33258 oraz jodek propidyny. Zdjęcia wykonano pod mikroskopem fluorescencyjnym z odwróconym obiektywem (Olympus IX70, Japonia), przy  $400\times$  powiększeniu.

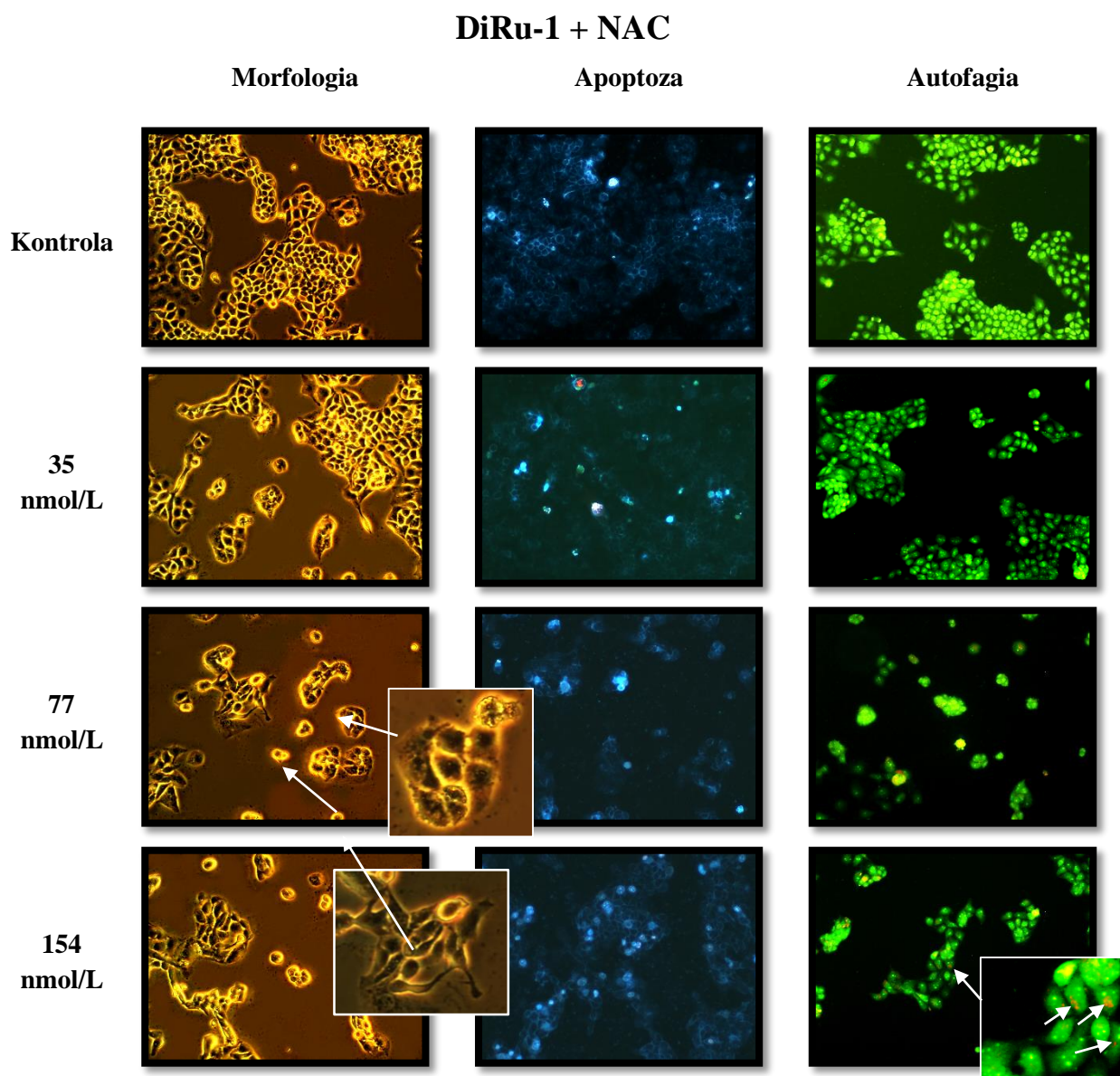




**Rysunek 38.** Indukcja apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórek nowotworowych linii MCF-7 poddanych 24 godzinnej inkubacji z **DiRu-1** w stężeniach 38 nmol/L ( $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>), 77 nmol/L (IC<sub>50</sub>) i 154 nmol/L ( $2 \times$  IC<sub>50</sub>). Metoda mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem podwójnego barwienia komórek fluorochromami Hoechst 33258 i jodku propidyny. \*p<0,05 vs. kontrola (komórki traktowane PBS); #p<0,05 vs. 38 nmol/L **DiRu-1**; ^p<0,05 vs. 77 nmol/L **DiRu-1**.

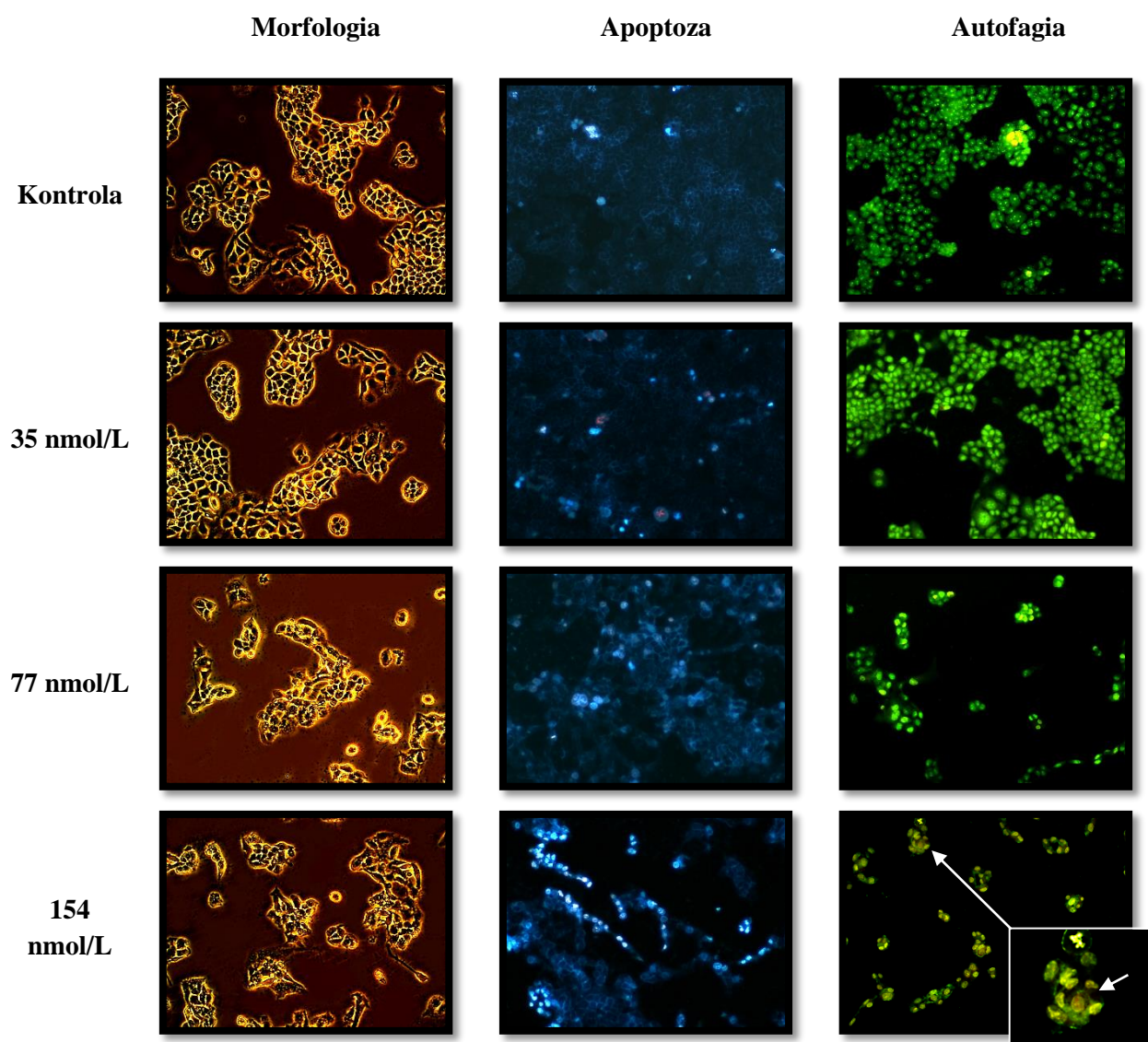


**Rysunek 39a.** Morfologia, indukcja apoptozy oraz autofagii komórek MCF-7, eksponowanych na działanie pochodnej **DiR-1**. Dla oceny apoptozy, komórki barwiono barwnikami fluorescencyjnymi – Hoechst 33258 oraz jodkiem propidyny w celu określenia frakcji komórek żywych (błada, niebieska fluorescencja), wczesnoapoptotycznych (jasna, niebieska fluorescencja), późnoapoptotycznych (fioletowa fluorescencja) oraz nekrotycznych (czerwona fluorescencja). Dla oceny autofagii, komórki barwiono barwnikiem fluorescencyjnym – oranżem akrydyny. Kolor zielony – jądra komórkowe, kolor czerwony – autofagosomy.



**Rysunek 39b.** Morfologia, indukcja apoptozy oraz autofagii komórek MCF-7, eksponowanych na działanie pochodnej **DiR-1** po 1-godzinnej preinkubacji z NAC (3 mmol/L). Dla oceny apoptozy, komórki barwiono barwnikami fluorescencyjnymi – Hoechst 33258 oraz jodkiem propidyny w celu określenia frakcji komórek żywych (błada, niebieska fluorescencja), wczesnoapoptotycznych (jasna, niebieska fluorescencja), późnoapoptotycznych (fioletowa fluorescencja) oraz nekrotycznych (czerwona fluorescencja). Dla oceny autofagii, komórki barwiono barwnikiem fluorescencyjnym – oranżem akrydyny. Kolor zielony – jądra komórkowe, kolor czerwony – autofagosomy.

## DiRu-1 + TROLOX



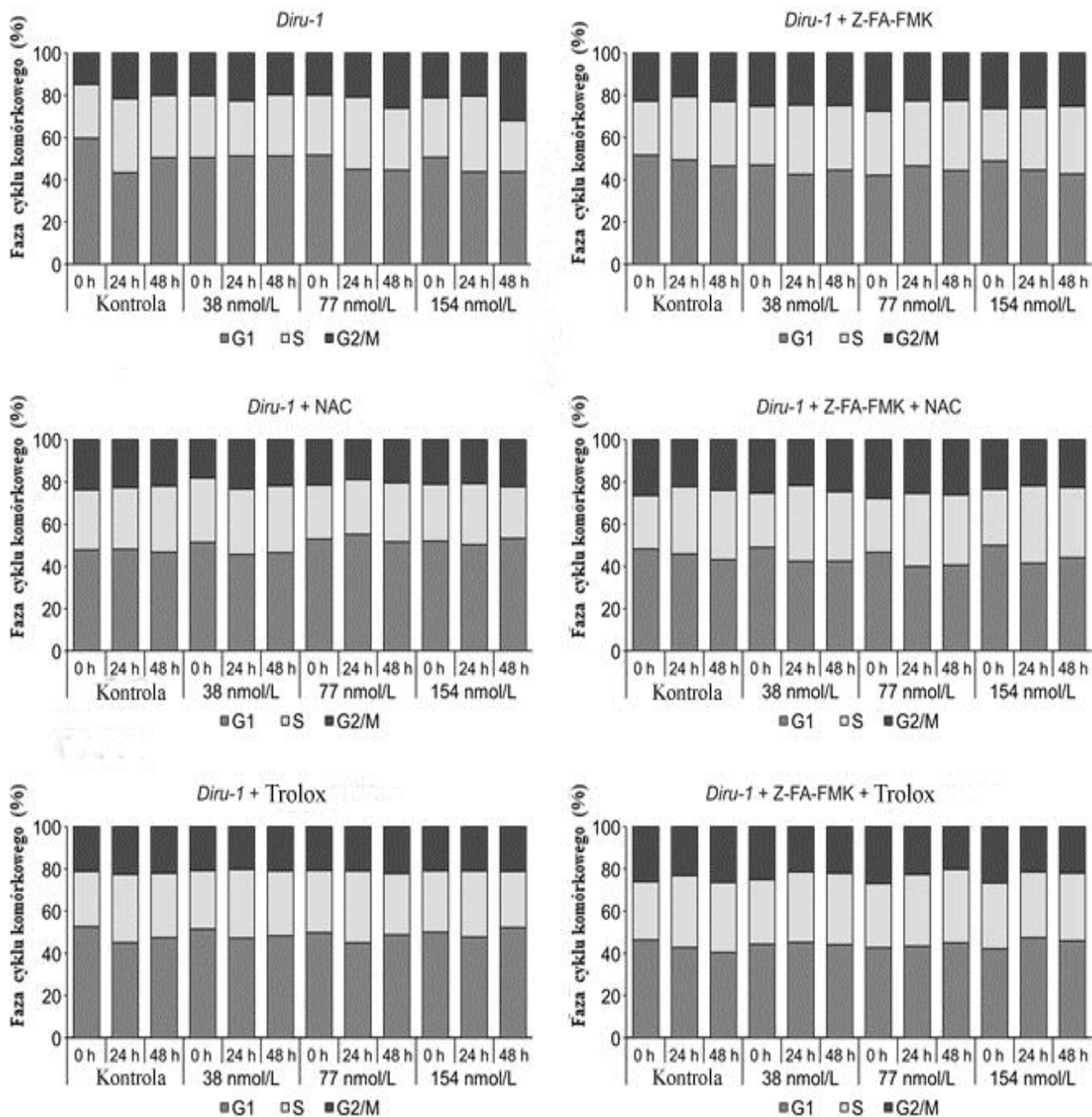
**Rysunek 39c.** Morfologia, indukcja apoptozy oraz autofagii komórek MCF-7, eksponowanych na działanie pochodnej **DiR-1** po 1-godzinnej preinkubacji z Troloxem (50  $\mu\text{mol/L}$ ). Dla oceny apoptozy, komórki barwiono barwnikami fluorescencyjnymi – Hoechst 33258 oraz jodkiem propidyny w celu określenia frakcji komórek żywych (błada, niebieska fluorescencja), wczesnoapoptotycznych (jasna, niebieska fluorescencja), późnoapoptotycznych (fioletowa fluorescencja) oraz nekrotycznych (czerwona fluorescencja). Dla oceny autofagii, komórki barwiono barwnikiem fluorescencyjnym – oranżem akrydyny. Kolor zielony – jądra komórkowe, kolor czerwony – autofagosomy.

### 11.5.3. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej

Cytometryczna analiza cyklu komórkowego wykazała, że pochodna **DiRu-1** powodowała blokadę cyklu podziałowego MCF-7 w fazie G2/M. Efekt ten obserwowany był jednak przede wszystkim w komórkach inkubowanych z najwyższym stężeniem metaloorganicznej cząsteczki (157 nmol/L) oraz przy dłuższym czasie hodowli postinkubacyjnej (48 godz.). Nieznaczna blokada cyklu w fazie G2/M była poprzedzona przejściowym zatrzymaniem komórek w fazie S cyklu. Wszystkie obserwowane zmiany były pozytywnie skorelowane ze stężeniem **DiRu-1**.

Zastosowanie pre-inkubacji z przeciwutleniaczami NAC/Trolox lub inhibitora kaspaz Z-FA-FMK nie wpłynęło znacząco na cykl komórkowy MCF-7.

Uzyskane wyniki pozostają spójne z genotoksycznymi właściwościami **DiRu-1** i zdolności metaloorganicznej cząsteczki do generowania obszernych uszkodzeń DNA komórek nowotworowych MCF-7. Zaburzenia te odpowiedzialne mogą być m.in. za hamowanie cyklu komórkowego. Ponadto, w przypadku dłuższego czasu hodowli pookubacyjnej (48 godz.), część komórek niezdolnych do skutecznej naprawy wszystkich uszkodzeń DNA pozostawała w fazie G2/M cyklu podziałowego, a ich proliferacja została zahamowana.



**Rysunek 40.** Frakcja komórek nowotworowych linii MCF-7 znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Komórki inkubowano z metaloorganiczną pochodną **DiRu-1** przez 24 godziny w stężeniach 38 nmol/L ( $1/2$   $IC_{50}$ ), 77 nmol/L ( $IC_{50}$ ) i 154 nmol/L ( $2 \times IC_{50}$ ). Komórki przed inkubacją ze związkiem metaloorganicznym preinkubowano przez 1 godzinę z przeciwutleniaczami NAC (3 mmol/l), Troloxem (50  $\mu$ mol/l) oraz inhibitorem kaspaz Z-FA-FMK.

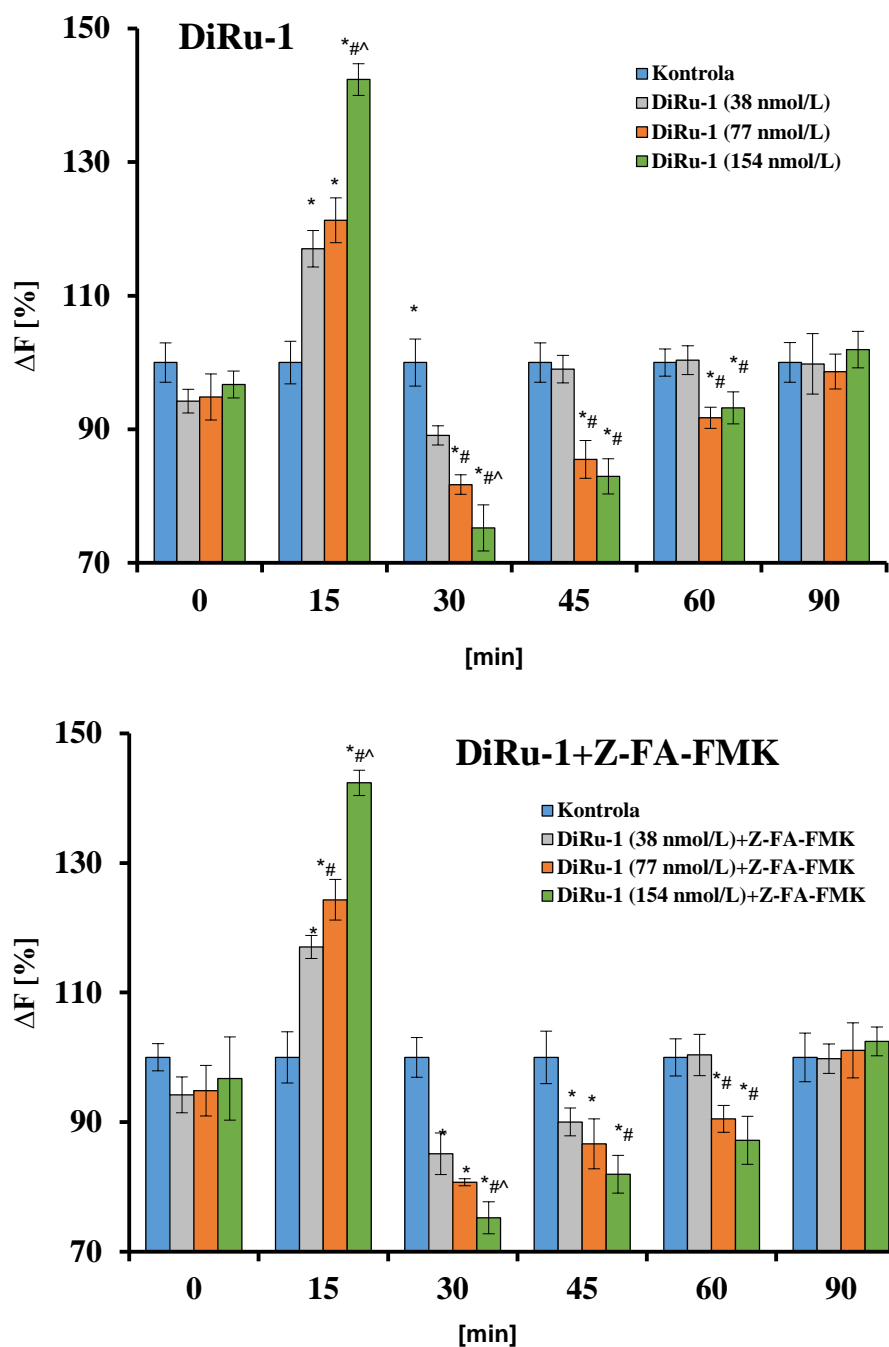
#### 11.5.4. Wpływ metaloorganicznej pochodnej na potencjał mitochondrialny

Proces apoptozy może zostać zainicjowany na dwóch głównych szlakach - zewnętrznym obejmujących domeny receptorów śmierci i wewnętrznym (mitochondrialnym) Mitochondria uważane są za niezwykle ważny cel aktywności przeciwnowotworowej pochodnych rutenu. Większość tych związków indukuje apoptozę komórek nowotworowych na drodze wewnętrznej powodując często dysfunkcję mitochondriów, jako organelli kluczowych dla tego procesu. W celu oceny zmian potencjału mitochondrialnego komórek MCF-7 eksponowanych na działanie **DiRu-1** zastosowano fluorescencyjną sondę JC-1. Komórki MCF-7 inkubowano z badaną pochodną metaloorganiczną w stężeniach  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (38 nmol/L), IC<sub>50</sub> (77 nmol/L) oraz 2xIC<sub>50</sub> (154 nmol/L) przez 24 godz., a następnie dokonano oznaczenia zmian potencjału mitochondrialnego.

Właściwości proapoptotyczne pochodnej rutenu **DiRu-1** zostały potwierdzone w analizie potencjału mitochondrialnego komórek MCF-7 traktowanych ww. związkiem. Po 24-godzinnej inkubacji, obserwowano zaburzenie potencjału błonowego mitochondriów. Wielkość zmian była wprost proporcjonalna do stosowanego stężenia metaloorganicznej pochodnej – największe obserwowano dla najwyższego stężenia 157 nmol/L.

W ciągu pierwszych 15 min. pomiaru obserwowano ok. 20-40% wzrost  $\Delta\Psi_m$  (hiperpolaryzacja błony mitochondrialnej). W dalszym etapie pomiaru (30 min) zanotowano szybki spadek  $\Delta\Psi_m$  odzwierciedlający stan depolaryzacji, a następnie stopniowy powrót do stanu  $\Delta\Psi_m$  charakterystycznego dla komórek kontrolnych.

1-godzinna preinkubacja komórek z inhibitorem kaspaz Z-FA-FMK nie wpływała w istotny sposób na zmiany potencjału mitochondrialnego. Wynik ten potwierdza, iż zależna od **DiRu-1** depolaryzacja błon mitochondrialnych komórek MCF-7 jest wczesnym etapem szlaku wewnętrznego apoptozy, poprzedzającym aktywację kaspaz.



**Rysunek 41.** Zmiany potencjału mitochondrialnego komórek MCF-7 eksponowanych na działanie pochodnej **DiRu-1**. Komórki inkubowano z metaloorganiczną pochodną przez 24 godziny w stężeniach 38 nmol/L ( $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>), 77 nmol/L (IC<sub>50</sub>) i 154 nmol/L ( $2 \times$  IC<sub>50</sub>). Komórki przed inkubacją ze związkiem metaloorganicznym preinkubowano przez 1 godzinę z inhibitorem kaspaz Z-FA-FMK. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS), # $p < 0,05$  vs. 38 nmol/L **DiRu-1**; ^ $p < 0,05$  vs. 77 nmol/L **DiRu-1**.



### 11.5.5. Zmiany aktywności kaspaz 8, 9 i 3

W celu dokładniejszego poznania mechanizmów indukcji apoptozy w komórkach MCF-7 traktowanych **DiRu-1**, dokonano analizy aktywacji trzech kaspaz zaangażowanych w szlak receptorowy (kaspaza 8) lub mitochondrialny (kaspaza 3 i 9). Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych testów analizy aktywności ww. enzymów. Dodatkowo, w celu weryfikacji indukcji kaspazo-zależnej apoptozy w komórkach MCF-7, zastosowano inhibitor proteaz serynowych Z-FA-FMK (kontrola negatywna). Komórki MCF-7 inkubowano z badaną pochodną metaloorganiczną w stężeniach  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (38 nmol/L), IC<sub>50</sub> (77 nmol/L) oraz 2xIC<sub>50</sub> (154 nmol/L) przez 24 godz., a następnie dokonano oznaczenia aktywności kaspaz. Wyniki przedstawiono na Rys 42.

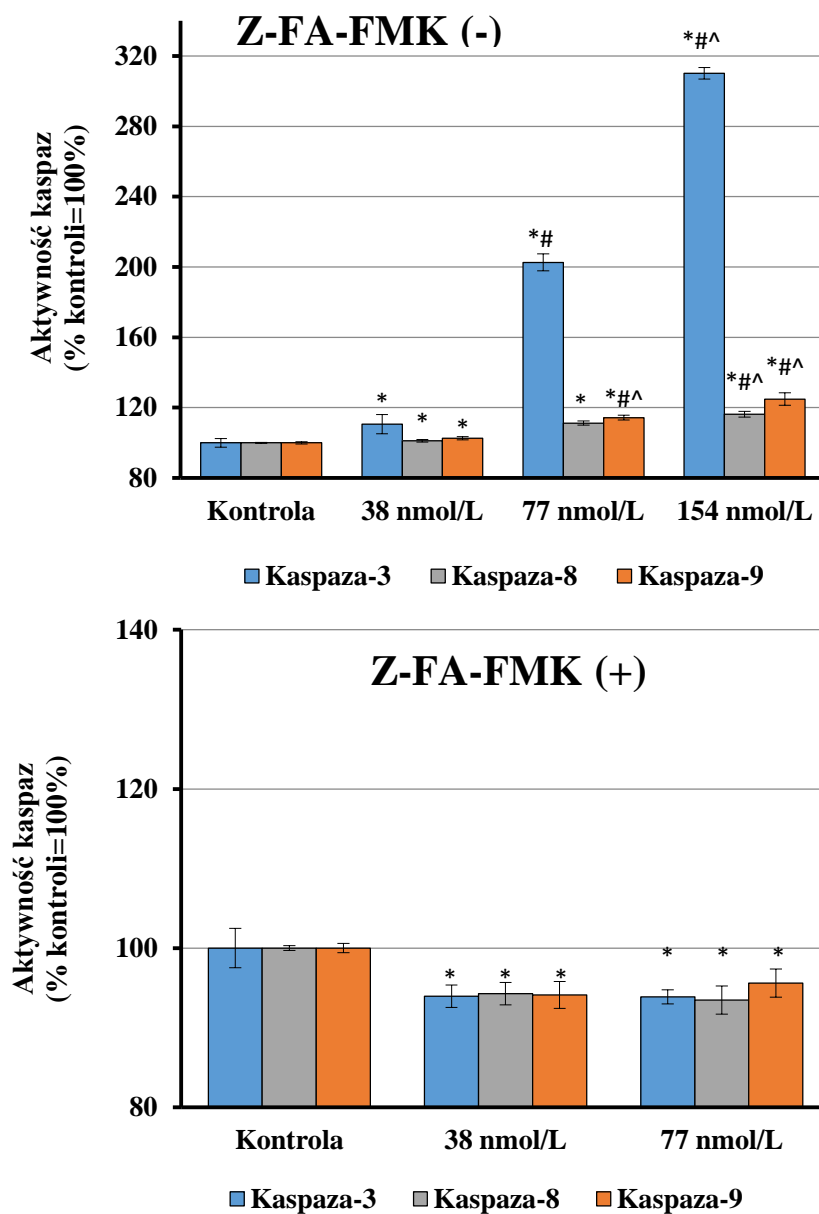
Analizowana pochodna rutenu **DiRu-1** indukowała wzrost aktywności kaspazy 3 w komórkach nowotworowych MCF-7. Poziom aktywności enzymu był wprost proporcjonalny do zastosowanego stężenia metaloorganicznej pochodnej. W przypadku najniższego stężenia, aktywacja białka była stosunkowo niewielka i wynosiła około 10% względem komórek kontrolnych. Znacznie większe zmiany obserwowano natomiast dla stężeń 77 nmol/L oraz 154 nmol/L – odpowiednio 2- i 3-krotny wzrost aktywności kaspazy 3.

W przypadku kolejnej proteazy serynowej zaangażowanej w szlak mitochondrialny – kaspazy 9 – nie obserwowano tak wyraźnego wzrostu jej aktywacji w komórkach MCF-7 traktowanych **DiRu-1**. Podobnie jednak, jak w przypadku kaspazy 3, obserwowana była pozytywna korelacja między zastosowanym stężeniem metaloorganicznej cząsteczki, a procentowym wzrostem aktywności enzymu w komórkach. Istotne zmiany w poziomie aktywności kaspazy 9 obserwowano dla stężeń 77 nmol/L oraz 154 nmol/L, które mieściły się w granicach 15%-25%.

Zależna od proapoptotycznych właściwości **DiRu-1** aktywacja kaspazy 8 przebiegała na niskim poziomie. W przypadku największego stężenia (154 nmol/L) związku, obserwowano zaledwie ok. 15% wzrost aktywności enzymu w komórkach MCF-7.

Zastosowanie specyficznego dla inhibitora proteaz serynowych Z-FA-FMK powodowało zahamowanie aktywacji wszystkich trzech analizowanych kaspaz. Uzyskany wynik świadczy więc o specyficzności proapoptotycznych właściwości **DiRu-1** i jego bezpośrednim udziale w indukcji aktywności kaspazy 3, 8 oraz 9.

Prawdopodobnym jest więc, iż podobnie, jak w przypadku wcześniej omawianej grupy metaloorganicznych pochodnych złota, pochodna **DiRu-1** indukuje apoptozę komórek nowotworowych przede wszystkim na szlaku mitochondrialnym, gdzie główną rolę odgrywają kaspazy 3 oraz 9.



**Rysunek 42.** Aktywność kaspaz 3, 8 i 9 w komórkach nowotworowych linii MCF-7, inkubowanych z metaloorganiczną pochodną **DiRu-1** przez 24 godz.. Wpływ inhibitora Z-FA-FMK (+). \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS); # $p < 0,05$  vs. 38 nmol/L **DiRu-1**; ^ $p < 0,05$  vs. 77 nmol/L **DiRu-1**.

### 11.5.6. Poziom reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach nowotworowych eksponowanych na działanie badanej metaloorganicznej pochodnej DiRu-1

Analiza poziomu RFT generowanych w komórkach MCF-7 eksponowanych na działanie pochodnej rutenu pozwoliła ocenić znaczenie stresu oksydacyjnego w cytotoksycznych i właściwościach **DiRu-1** oraz udziału metaloorganicznej cząsteczki w indukcji śmierci komórkowej. Zmiany poziomu RFT w komórkach eksponowanych na działanie rutenowej pochodnej przedstawiono na Rys. 43-44.

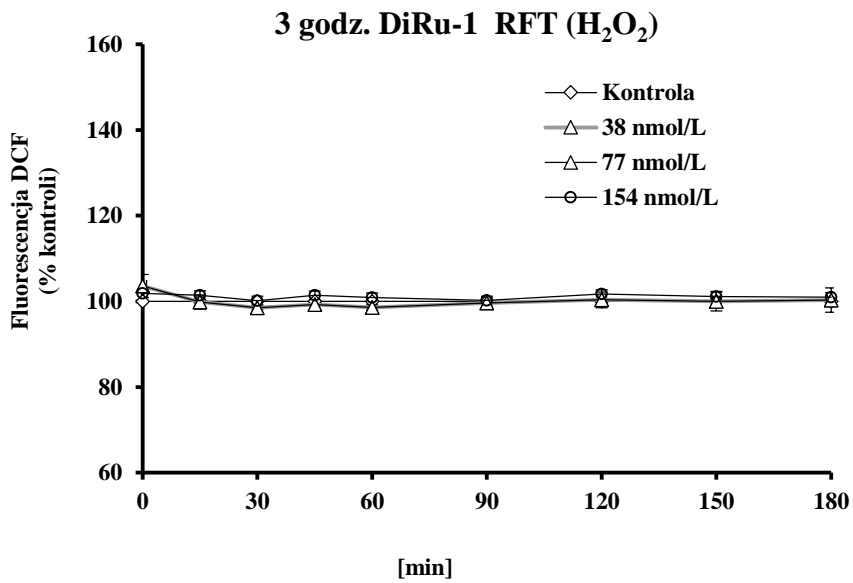
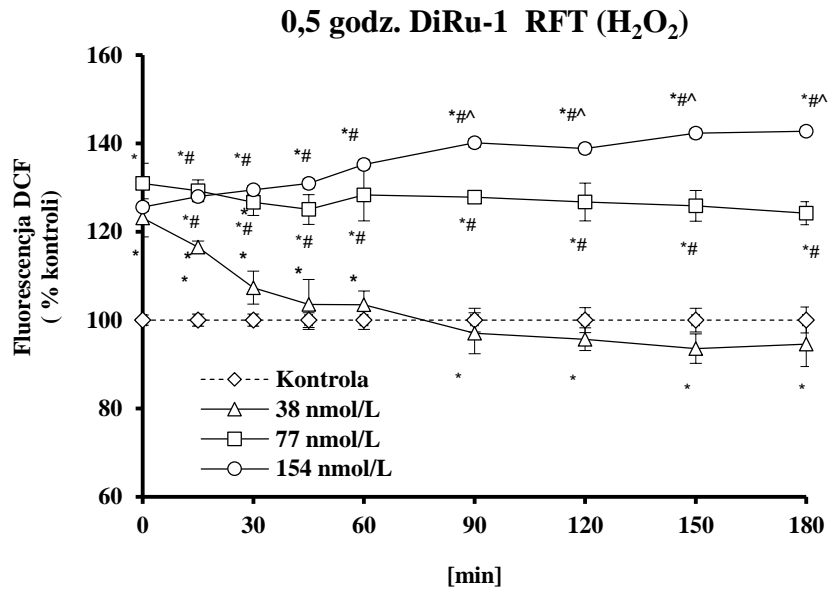
Do pomiaru RFT wykorzystano specyficzne, fluorescencyjne sondy: H<sub>2</sub>DCFD-DA oraz DHET. Sonda H<sub>2</sub>DCFD-DA pozwala na detekcję zmian poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, natomiast DHET wykrywa preferencyjnie zmiany przyrostu anionorodnika ponadtlenkowego O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Komórki MCF-7 inkubowano przez 0,5 godz. lub 3 godz. z **DiRu-1** w stężeniach ½ IC<sub>50</sub> (38 nmol/L), IC<sub>50</sub> (77 nmol/L) oraz 2xIC<sub>50</sub> (154 nmol/L), a następnie dokonywano pomiaru. W celu określenia udziału **DiRu-1** w generowaniu RFT w komórkach MCF-7, przed potraktowaniem ich analizowaną cząsteczką metaloorganiczną, wykonano 1 godzinną preinkubację z przeciwutleniaczami: N-acetylocysteina (NAC; 3 mmol/L), witaminą E (Trolox; 50 μmol/L). Następnie, do medium komórek dodawano odpowiednie stężenia związku i przeprowadzano detekcję RFT.

Uzyskane wyniki wskazują, iż analizowana pochodna rutenu **DiRu-1** powodowała wzrost poziomu RFT w komórkach MCF-7, który zależny był zarówno od zastosowanego stężenia związku, jak i czasu ekspozycji komórek na badaną substancję. W przypadku zastosowania sondy H<sub>2</sub>DCFD-DA, istotnie statystycznie zmiany poziomu RFT obserwowano jedynie dla krótszego czasu inkubacji komórek (0,5 godz.) z metaloorganiczną cząsteczką. Ponadto, najwyższy przyrost RFT obecny był w komórkach MCF-7 traktowanych najwyższym stężeniem (157 nmol/L) rutenowej pochodnej – około 45% wzrost RFT względem kontroli. Zastosowanie stężenia IC<sub>50</sub> (77 nmol/L) skutkowało mniejszymi zmianami poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych. Po początkowym około 30% wzroście stężenia RFT podczas pierwszych 60 min hodowli poinkubacyjnej, w dalszym etapie obserwowano stopniowy, minimalny jego spadek. Analogicznie przebiegała również kinetyka reakcji generowania RFT w komórkach MCF-7 traktowanych najniższym stężeniem – 38 nmol/L. Interesującym jest natomiast fakt, iż w przypadku dłuższego czasu inkubacji komórek z **DiRu-1** (3 godz.) dla wszystkich zastosowanych stężeń metaloorganicznej pochodnej, nie obserwowano wzrostu poziomu RFT. Uzyskane wyniki sugerują, iż wybuch tlenowy w komórkach MCF-7 eksponowanych na działanie **DiRu-1** może bezpośrednio poprzedzać inicjację apoptozy oraz przyczyniać się do jej promocji.

Zastosowanie godzinnej preinkubacji komórek MCF-7 z przeciwutleniaczami NAC oraz Troloxem skutkowało zahamowaniem generowania RFT zależnych od funkcjonowania badanej cząsteczki.

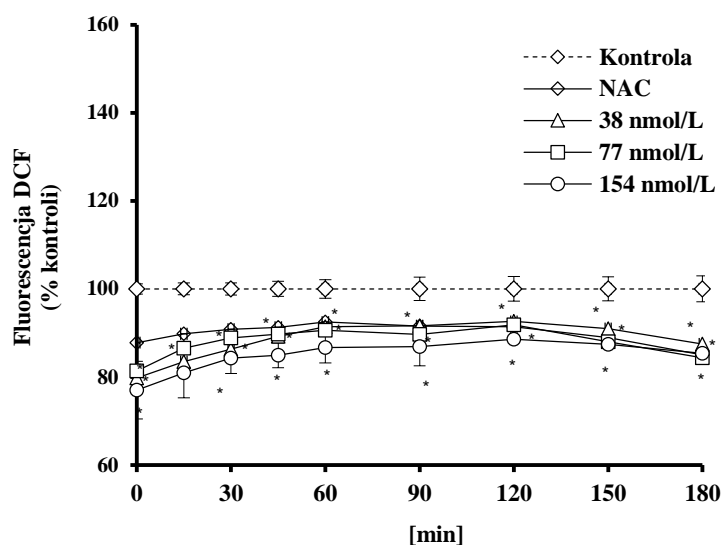
Podobnie, jak w przypadku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, analiza zmian poziomu anionorodnika ponadtlenkowego O<sub>2</sub><sup>-</sup> w komórkach MCF-7 traktowanych **DiRu-1** wykazała, iż poziom powstających RFT skorelowany był z czasem inkubacji komórek z metaloorganiczną pochodną oraz zastosowanym stężeniem. Największe zmiany obserwowano dla 3 godzinnej inkubacji komórek z analizowaną cząsteczką oraz największego jej stężenia 157 nmol/L.

Kinetyka reakcji przebiegała inaczej, niż w przypadku zmian poziomu  $H_2O_2$ . W trakcie 180 minut pomiaru, obserwowano minimalny, jednakże stopniowy wzrost poziomu  $O_2^{\bullet -}$  w komórkach MCF-7, który osiągał maksymalny poziom po 150-180 min. hodowli poinkubacyjnej.

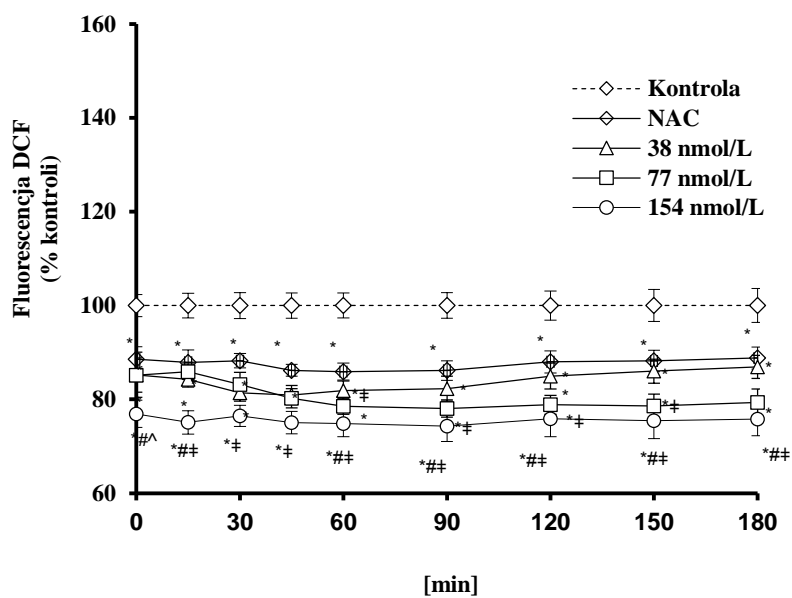


**Rysunek 43a.** Ilość reaktywnych form tlenu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generowanych w komórkach nowotworowych linii MCF-7 przez **DiRu-1** po zastosowaniu godzinnej preinkubacji z NAC. \*p<0,05 vs. kontrola (komórki traktowane PBS); #p<0,05 vs. 38 nmol/L **DiRu-1**; ^p<0,05 vs. 77 nmol/L **DiRu-1**, †p<0,05 vs. NAC lub Trolox.

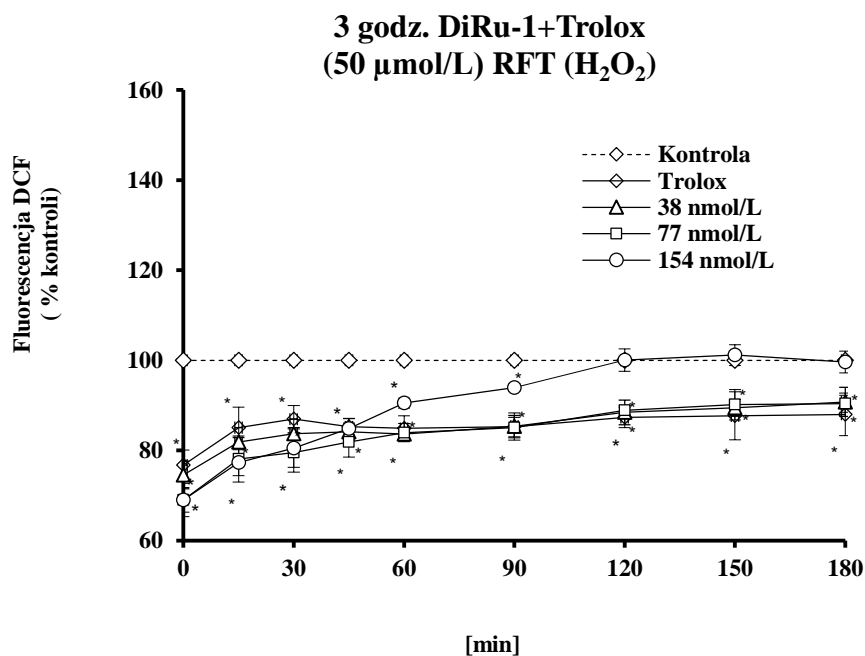
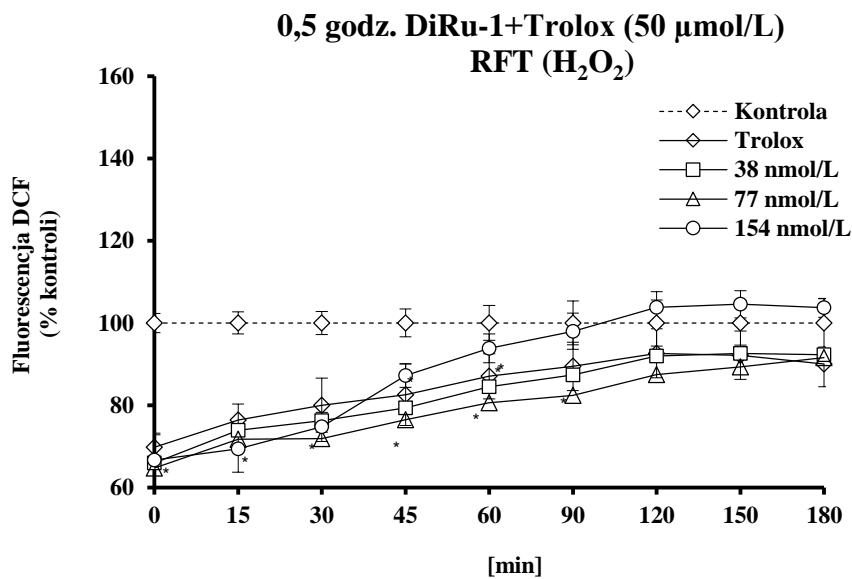
### 0,5 godz. DiRu-1+NAC (3 mmol/L) RFT (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



### 3 godz. DiRu-1+NAC (3 mmol/L) RFT (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

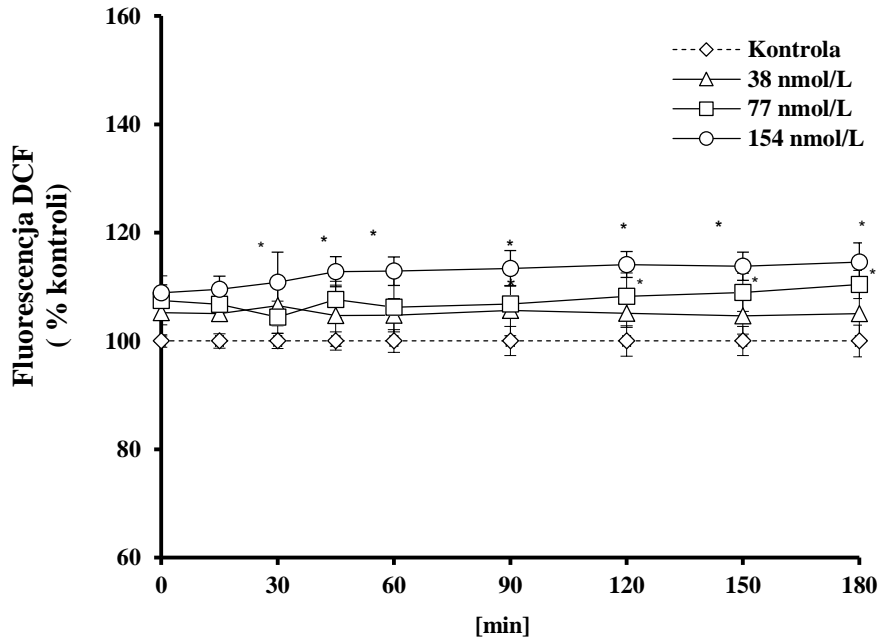


**Rysunek 43b.** Ilość reaktywnych form tlenu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generowanych w komórkach nowotworowych linii MCF-7 przez **DiRu-1** po zastosowaniu godzinnej preinkubacji z NAC. \*p<0,05 vs. kontrola (komórki traktowane PBS); #p<0,05 vs. 38 nmol/L **DiRu-1**; ^p<0,05 vs. 77 nmol/L **DiRu-1**, †p<0,05 vs. NAC lub Trolox.

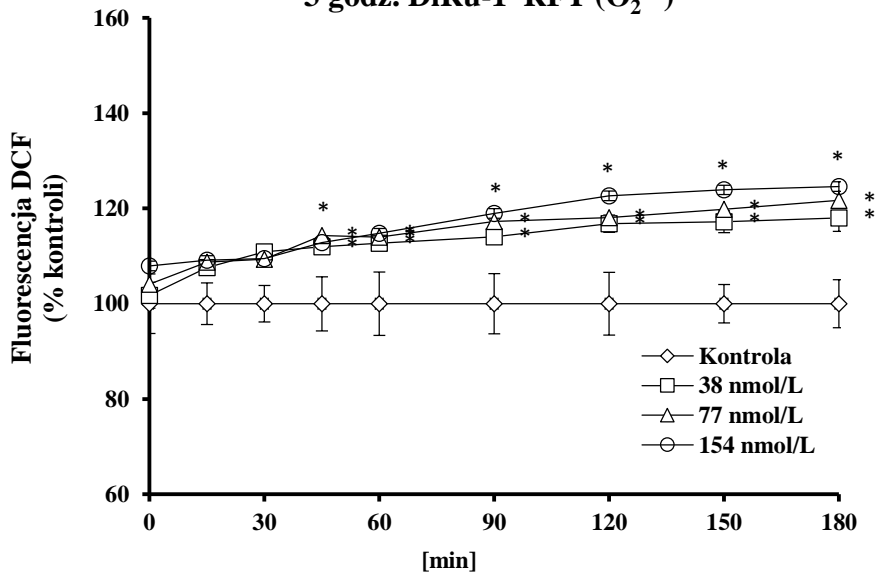


**Rysunek 43c.** Ilość reaktywnych form tlenu ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) generowanych w komórkach nowotworowych linii MCF-7 przez **DiRu-1** po zastosowaniu godzinnej preinkubacji z Troloxem. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS); # $p < 0,05$  vs. 38 nmol/L **DiRu-1**; ^ $p < 0,05$  vs. 77 nmol/L **DiRu-1**, † $p < 0,05$  vs. NAC lub Trolox.

0,5 godz. DiRu-1 RFT ( $O_2^{\cdot-}$ )

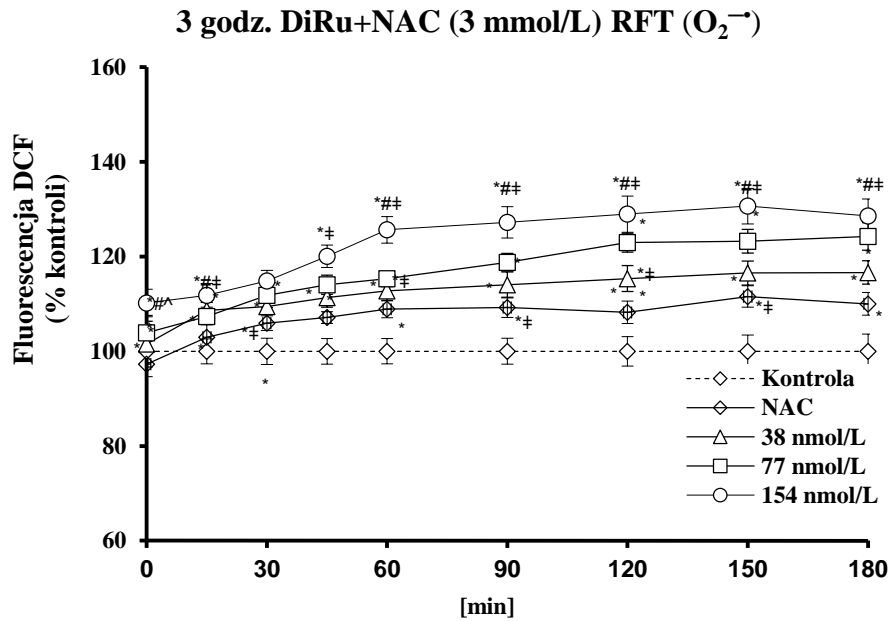
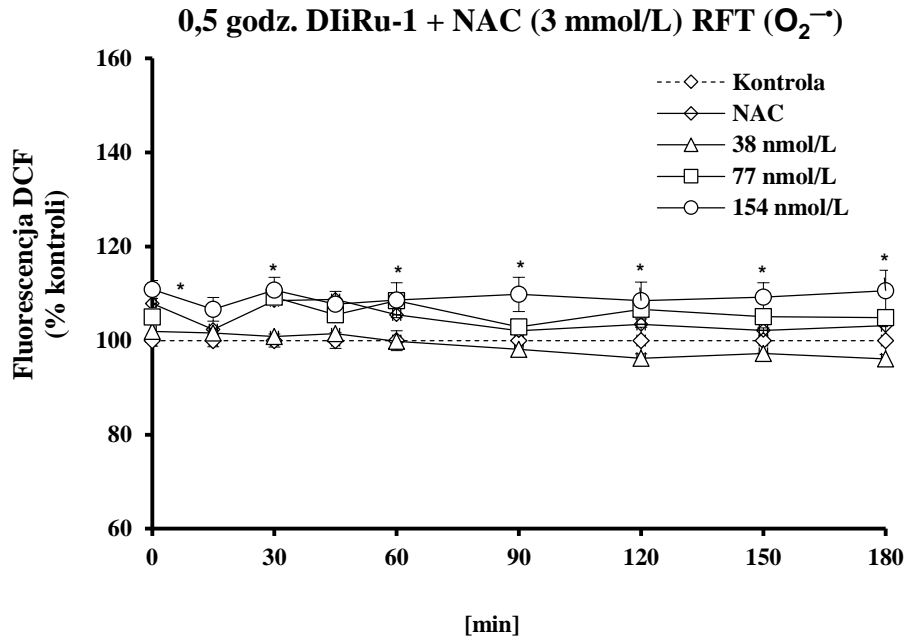


3 godz. DiRu-1 RFT ( $O_2^{\cdot-}$ )

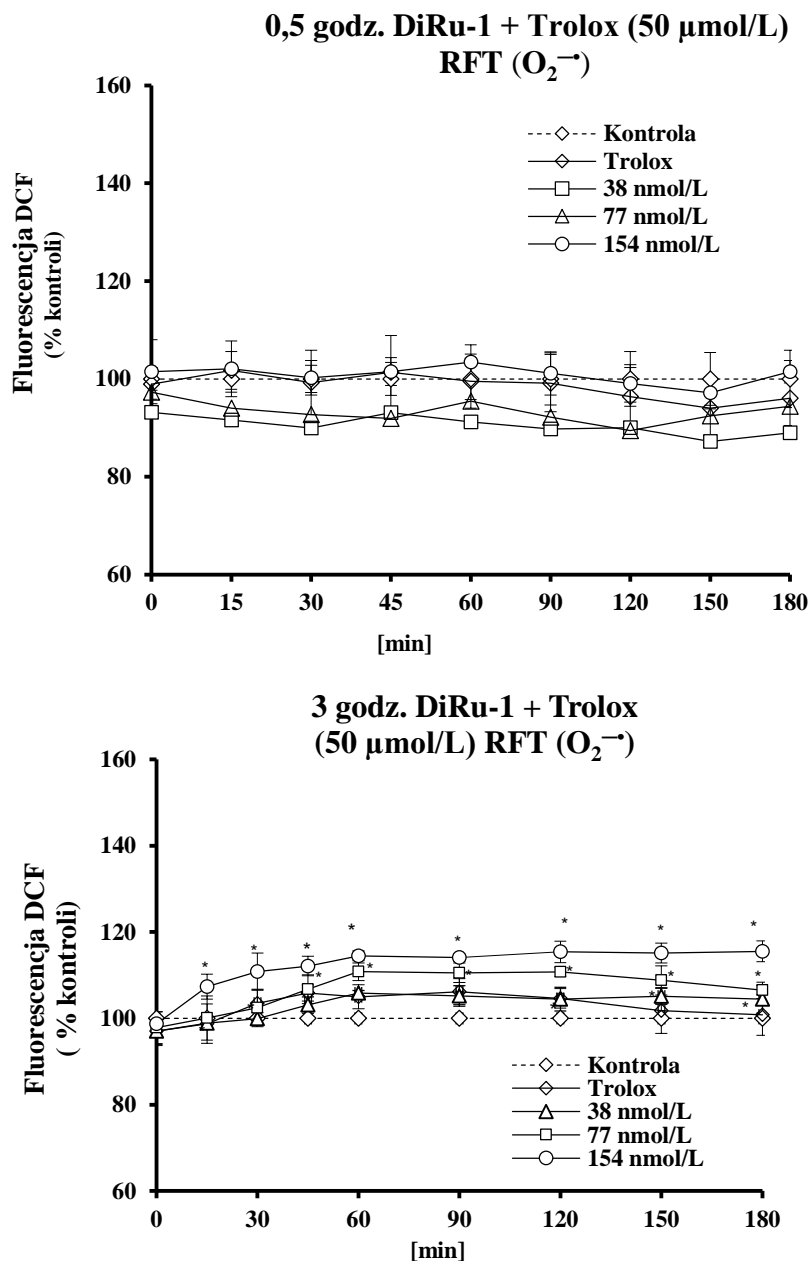


**Rysunek 44a.** Ilość reaktywnych form tlenu ( $O_2^{\cdot-}$ ) generowanych w komórkach nowotworowych linii MCF-7 przez DiRu-1. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS); # $p < 0,05$  vs. 38 nmol/L DiRu-1; ^ $p < 0,05$  vs. 77 nmol/L DiRu-1, † $p < 0,05$  vs. NAC lub Trolox.





**Rysunek 44b.** Ilość reaktywnych form tlenu ( $O_2^{\cdot-}$ ) generowanych w komórkach nowotworowych linii MCF-7 przez **DiRu-1** po zastosowaniu godzinnej preinkubacji z NAC. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS); # $p < 0,05$  vs. 38 nmol/L **DiRu-1**; ^ $p < 0,05$  vs. 77 nmol/L **DiRu-1**, † $p < 0,05$  vs. NAC lub Trolox.



**Rysunek 44c.** Ilość reaktywnych form tlenu ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) generowanych w komórkach nowotworowych linii MCF-7 przez **DiRu-1** po zastosowaniu godzinnej preinkubacji z Troloxem. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS); # $p < 0,05$  vs. 38 nmol/L **DiRu-1**; ^ $p < 0,05$  vs. 77 nmol/L **DiRu-1**, ‡  $p < 0,05$  vs. NAC lub Trolox.

### 11.5.7. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową

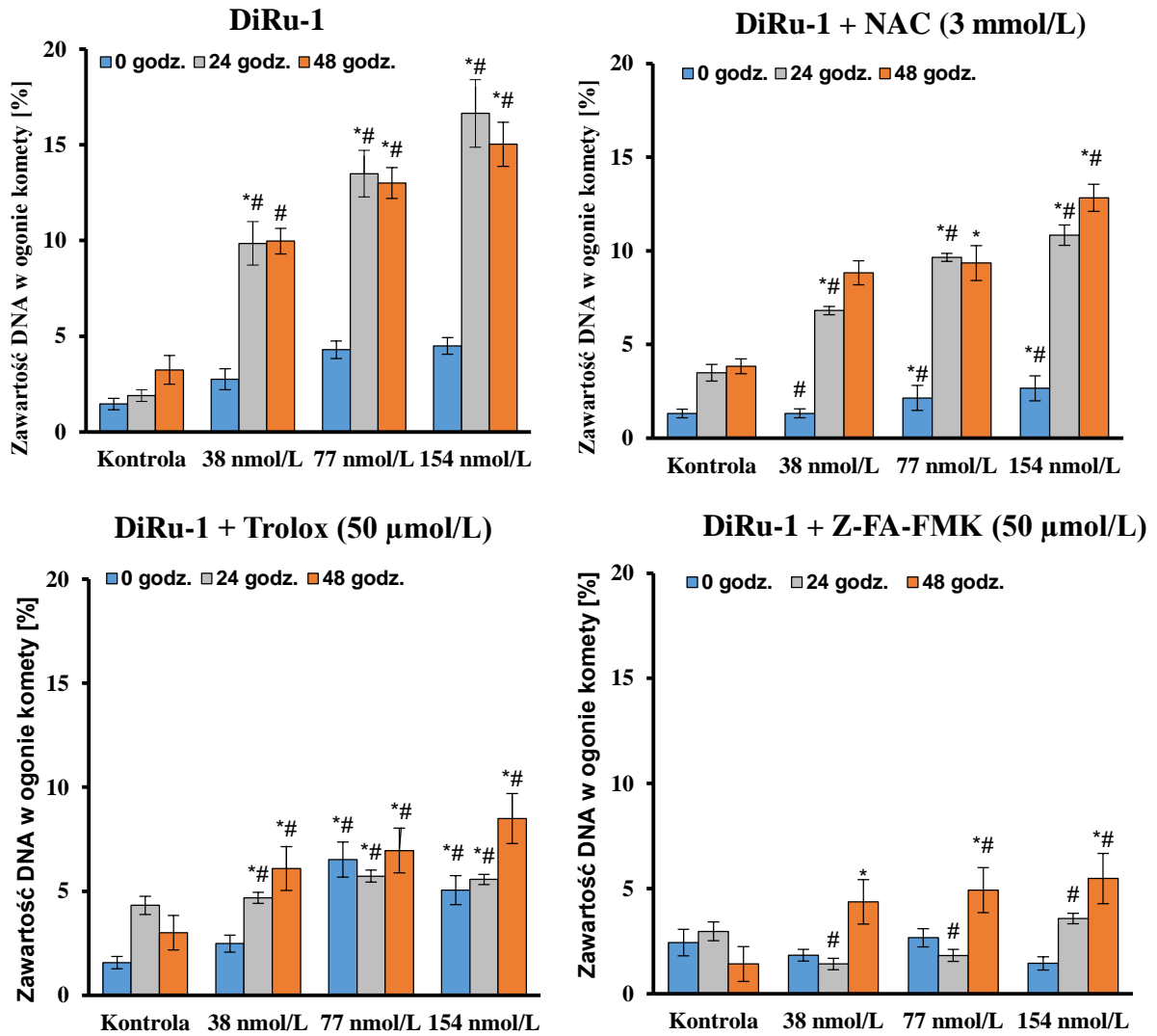
Proapoptyczna aktywność **DiRu-1** potwierdzona została przy pomocy cytometrii przepływowej w pomiarze cyklu podziałowego komórek MCF-7. Wzrost piku sub-G1, który składa się z hipodiploidalnych komórek apoptotycznych, zawierających mniej niż 2n DNA było widoczne na histogramach DNA. Najbardziej znaczący wzrost frakcji sub-G1 (ok. 17-18%) zaobserwowano po 24-48 godzinach hodowli poinkubacyjnej dla komórek MCF-7 traktowanych najwyższym stężeniem **DiRu-1** (154 nmol/L) (Tabela 11).

W celu oceny właściwości genotoksycznych rutenowej pochodnej przeprowadzono analizę uszkodzeń DNA komórek traktowanych ww. związkiem z wykorzystaniem alkalicznej (pH>13) wersji metody kometowej. Komórki MCF-7 inkubowano przez 24 godz. z **DiRu-1** w stężeniach  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (38 nmol/L), IC<sub>50</sub> (77 nmol/L) oraz 2xIC<sub>50</sub> (154 nmol/L), a następnie poddawano analizie lub hodowano przez dalsze 24/48 godz. w świeżym medium. Hodowla poinkubacyjna pozwoliła na naprawę części uszkodzeń DNA powstałych na skutek działania **DiRu-1**.

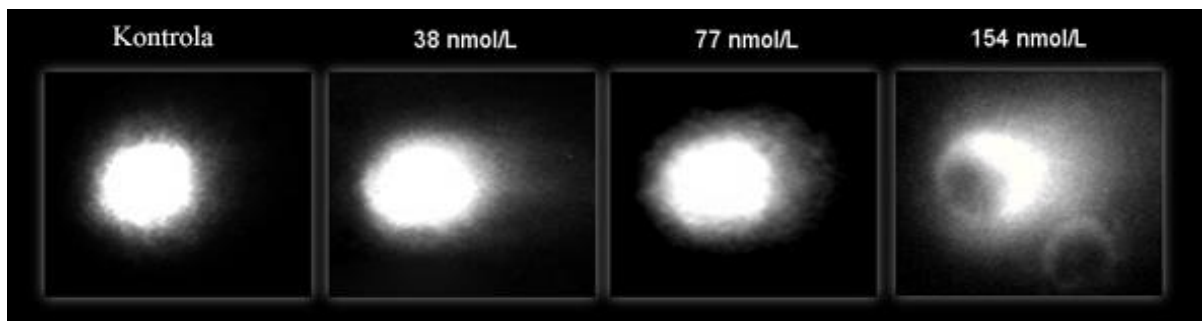
**DiRu-1** wykazuje silne, genotoksyczne działanie względem linii komórkowej MCF-7, co prawdopodobnie może być źródłem cytotoksycznego i antyproliferacyjnego działania metaloorganicznej pochodnej. Wyniki uzyskane w teście kometowym wskazują na bezpośredni związek pomiędzy poziomem uszkodzenia DNA komórek MCF-7, a wielkością zastosowanego stężenia **DiRu-1**. Większy procent zawartości DNA w ogonach komet komórek MCF-7 traktowanych **DiRu-1** obserwowany był dla wyższych stężeń (77 i 154 nM). Wartym podkreślenia jest również fakt, iż zawartość uszkodzonego DNA w ogonach komet nie zmienia się jednak znacząco w czasie, co wskazuje, że uszkodzenia występujące w ciągu 24-48 godzin po zakończeniu okresu inkubacji nie były efektywnie naprawiane przez systemy naprawcze komórek MCF-7.

1-godzinna preinkubacja komórek z NAC, lub Troloxem powodowała zmniejszenie procentowej wartości uszkodzonego DNA, co wskazuje, że znaczna jego część może być spowodowana działaniem RFT, a więc uszkodzeniami oksydacyjnymi. Najbardziej efektywny w hamowaniu genotoksycznych właściwości **DiRu-1** pozostał jednak inhibitor apoptozy Z-FA-FMK. 1-godzinna preinkubacja z Z-FA-FMK przyczyniła się do zmniejszenia odsetka uszkodzonego DNA o ponad połowę.

Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że uszkodzenia DNA komórek MCF-7 są nie są spowodowane bezpośrednim oddziaływaniem **DiRu-1** z DNA lecz prawdopodobnie przez RFT powstające na skutek działania oraz proapoptotycznych właściwości ww. związku. apoptozy fragmentacji DNA.



**Rysunek 45.** Uszkodzenia DNA generowane w komórkach nowotworowych linii MCF-7 przez metaloorganiczną pochodną **DiRu-1**. \* $p < 0,05$  vs. kontrola (komórki traktowane PBS); # $p < 0,05$  vs. 38 nmol/L **DiRu-1**.



**Rysunek 46.** Zdjęcia komet DNA, uzyskanych z ludzkich komórek nowotworowych linii MCF-7, poddanych działaniu metaloorganicznej pochodnej **DiRu-1**. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse, Tokyo, Japan.

**Tabela 11.** Odsetek komórek sub-G1 histogramu DNA, uzyskanego z cytometrycznej analizy cyklu podziałowego komórek nowotworowych MCF-7, poddanych działaniu metaloorganicznej pochodnej **DiRu-1**. \*p<0,05 vs. kontrola (komórki traktowane PBS).

<b>Czas hodowli poinkubacyjnej</b>	<b>Stężenie metaloorganicznej pochodnej rutenu [nmol/L]</b>			
	<b>Kontrola</b>	<b>38</b>	<b>77</b>	<b>154</b>
<b>0 godz.</b>	1,7 ± 0,09	5,0 ± 1,15	7,50 ± 0,43	12,80 ± 0,51*
<b>24 godz.</b>	1,35 ± 0,8	6,28 ± 1,32	11,62 ± 2,10*	17,70 ± 0,65*
<b>48 godz.</b>	1,14 ± 0,6	6,0 ± 1,20	9,60 ± 0,50*	16,0 ± 0,95*

## 12. DYSKUSJA

Znaczna część badań naukowych poświęcona jest prewencji, wczesnemu wykrywaniu i efektywnemu leczeniu chorób nowotworowych. Szacunkowe dane, pochodzące z projektu Europa Przeciw Nowotworom (*Europe Against Cancer*) wskazują, że liczba zgonów w krajach Unii Europejskiej z powodu nowotworów zmniejszyła się o prawie 10% w stosunku do roku 2000. Pomimo dużego postępu w zakresie leczenia chorób nowotworowych, intensywne badania naukowe oraz dynamicznego rozwoju farmakologii, współczesna medycyna wciąż nie dysponuje w pełni skuteczną i mało inwazyjną terapią przeciwnowotworową. Nieodłącznym problemem leków przeciwnowotworowych – cytostatyków, przeciwciał monoklonalnych czy związków alkilujących – jest ich mała specyficzność wobec komórek nowotworowych oraz towarzyszące niepożądane efekty uboczne, jak również konieczność podawania pacjentom zbyt wysokich (toksycznych dla zdrowych tkanek) lub zbyt niskich (niewystarczających dla osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego) dawek farmaceutyków. Najpoważniejsze powikłania, spowodowane chemioterapią, to myelosupresja, kardiotoxycywność, hepatotoxycywność, neurotoxycywność i nefrotoxycywność. Uboczne efekty leków przeciwnowotworowych mogą ujawnić się nawet po wielu latach od zakończenia chemioterapii.

Wielkim wyzwaniem nowoczesnej onkologii i sprawą priorytetową staje się więc synteza skutecznych i bezpiecznych dla pacjentów leków przeciwnowotworowych, które charakteryzować się będą:

- wysoką specyficznością działania na komórki nowotworowe, szybką eliminacją z organizmu chorego (wysoka reaktywność) w sposób najmniej obciążający organizm,
- niską toksycywnością ogólnoustrojową lub całkowitym jej brakiem,
- zminimalizowanymi efektami ubocznymi zarówno podczas stosowania terapii jak i po jej zakończeniu,
- brakiem immunogenności i mutagenności.

W ostatnich latach nastąpił istotny rozwój nowej gałęzi nauki określanej jako chemia biometaloorganiczna. Powstała ona poprzez połączenie chemii organicznej oraz biochemii, a głównymi obszarami jej działania są synteza nowych pochodnych metaloorganicznych oraz badania ich aktywności biologicznej i możliwości zastosowania w leczeniu chorób przewlekłych m.in. nowotworów. Atrakcyjne właściwości fizyko-chemiczne, łatwość modyfikacji chemicznej oraz znaczna aktywność biologiczna, przyczyniły się do zwiększenia zainteresowania współczesnej onkologii związkami metaloorganicznymi (Ornelas, 2011; Fouda i wsp., 2007; Gasser i wsp., 2012; Laini i wsp., 2012). Za najstarszego przedstawiciela tej grupy związków, który wciąż stosowany jest klinicznie, uważa się cisplatynę. Potencjał chemioterapeutyczny tego alkilującego DNA leku przeciwnowotworowego został po raz pierwszy opisany przez Rosenberga i wsp. (1969). Obecnie, cisplatyna stosowana jest w leczeniu różnych typów nowotworów, zwłaszcza raka jajników, jąder, szyi, głowy i płuc. Wysokiej przeciwnowotworowej aktywności tego leku towarzyszy jednak znaczna toksycywność wobec tkanek prawidłowych,

co przejawia się występowaniem licznych niepożądanych efektów ubocznych. Część pacjentów wykazuje ponadto, pierwotną lub nabytą oporność na ten lek. Mimo tak wyraźnych ograniczeń w chemioterapeutycznym stosowaniu cisplatyny, stała się ona prekursorem dla wielu nowych pochodnych metaloorganicznych. Potrzeba opracowania nowych związków, zawierających w swojej strukturze metal i powodujących mniej niepożądanych efektów niż cisplatyna, przy jednoczesnym zachowaniu jej szerokiego spektrum działania, stała się nową siłą napędową dla rozwoju badań nad nowymi przeciwnowotworowymi kompleksami metaloorganicznymi (Ornelas 2011; Fouda i wsp., 2007; Barry i Sadler 2013; Gasser i wsp., 2012; Kaluderovic 2012; Laine i wsp. 2012; Money i Albrecht 2013; Brujininx i Sadler, 2008).

Pochodne metaloorganiczne to stale zwiększająca się grupa związków. Większość z nich projektowana jest według określonego modelu – do biologicznie rozpoznawalnego wektora przyłączany jest fragment metaloorganiczny. Rolą wektora jest zapewnienie cząsteczce prawidłowego funkcjonowania w organizmie – tzw. „biokompatybilności” (biogodności), rozpoznawania i tolerancji przez struktury komórkowe, przez co nie jest ona traktowana jako antygen lub toksyna (brak wpływu na układ immunologiczny organizmu). Różnorodność stosowanych wektorów jest bardzo duża. Możliwe jest przyłączenie szeregu różnych związków takich jak zasady purynowe/pirymidynowe, aminokwasy, witaminy, polimery, dendrymery, czy polifenole, jak również komercyjnie dostępne i powszechnie stosowane leki (w tym przeciwnowotworowe). Fragment metaloorganiczny odpowiada za określone, zaprojektowane właściwości całego związku jak np. działanie terapeutyczne, antyproliferacyjne czy pro-apoptotyczne.

Poza związkami rutenu oraz złota coraz większą popularnością wśród naukowców cieszą się ferroceny – kompleksy, zawierające w swojej strukturze atom żelaza, który w pochodnych metaloorganicznych występuje w postaci podstawnika ferrocenyloвого. Chemiczna stabilność ferrocenów, łatwość modelowania ich właściwości biologicznych poprzez szerokie możliwości ich syntezy oraz silne właściwości redoks, to tylko niektóre z cech, które czynią te związki atrakcyjnymi kandydatami do opracowania nowych chemioterapeutyków. Rosnąca ilość literatury naukowej wskazuje na dużą atrakcyjność biologiczną ferrocenów oraz na możliwość ich wielowymiarowego zastosowania we współczesnej medycynie. Ferrocenyłowe pochodne z dużą skutecznością wykorzystywane są w leczeniu zakażeń bakteryjnych oraz wirusowych (Görmen i wsp., 2015; El Arbi i wsp., 2011; Tiwari i wsp., 2011; Liu i wsp., 2012). Obiecujące wyniki uzyskano w przypadku zastosowania pochodnych ferrocenyłowych w leczeniu niezwykle groźnej choroby jaką jest malaria (Chopra i wsp., 2015; Quirante i wsp., 2011; Kumar i wsp., 2014). Związek Ferroquine, będący ferrocenyłową pochodną dostępnych komercyjnie leków antymalarycznych, jest obecnie w drugiej fazie badań klinicznych dając bardzo obiecujące wyniki (Brown i Hyland, 2015). Niemniej jednak, głównym obszarem zainteresowania wielu naukowców pozostają właściwości przeciwnowotworowe pochodnych ferrocenyłowych i ich zastosowanie jako nowych chemioterapeutyków, konkurencyjnych dla cisplatyny. Szereg danych literaturowych wskazuje na cytotoksyczne działanie tych związków na różnego typu komórek nowotworowych *in vitro*. Wykazano, że ferroceny mogą indukować programowaną śmierć komórki oraz towarzyszące jej uszkodzenia DNA i blokadę cyklu podziałowego komórek nowotworowych. Ostatnio

prowadzone są intensywne badania na ferrocenylowej pochodnej tamoksifenu/hydroksytamoksifenu, która funkcjonuje pod nazwą generyczną Ferrocifen. Ze związkiem tym wiąże się bardzo duże nadzieje, gdyż, jak wykazały dotychczasowe badania, wykazuje on lepszą aktywność cytotoksyczną i cytostatyczną wobec komórek raka piersi niż macierzysty tamoksifen. Ferrocifen znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych (Jaoueni *wsp.*, 2015).

Pomimo intensywnego rozwoju chemii biometaloorganicznej, mnogości syntez nowych pochodnych, zawierających w swojej strukturze atom metalu (w tym również ferrocenów), oraz przeprowadzonych wstępnych analiz cytotoxyczności tych związków, ciągle jest niewiele informacji na temat molekularnych mechanizmów ich aktywności przeciwnowotworowej. Obszar ten pozostaje mało zbadany. Zrozumienie możliwych szlaków aktywności, związanych z generowaniem stresu oksydacyjnego, indukcją apoptozy, genotoksycznością, czy też hamowaniem proliferacji komórek nowotworowych poprzez wpływ na ich cykl podziałowy, jak również zrozumienie wzajemnych reakcji między tymi procesami, może przyczynić się do opracowania i syntezy nowych, jeszcze efektywniej działających na komórki nowotworowe związków metaloorganicznych jako nową alternatywą dla cisplatyny.

Przytoczone dane literaturowe, duża atrakcyjność metaloorganicznych pochodnych jako potencjalnych chemioterapeutyków oraz nowatorski charakter badań stały się istotną przesłanką do podjęcia niniejszej tematyki. Zaplanowane w ramach pracy doktorskiej badania dotyczyły oceny aktywności przeciwnowotworowej nowosyntetyzowanych i niebadanych dotychczas pochodnych metaloorganicznych w wybranych liniach komórek nowotworowych, wrażliwych i opornych na konwencjonalne chemioterapeutyki i wywodzących się z nowotworów hematologicznych oraz z nowotworów litych. Podjęta tematyka mieści się w zakresie badań podstawowych, mających na celu zdobycie nowej wiedzy na temat profilu aktywności przeciwnowotworowej wyselekcjonowanych pochodnych opisywanej grupy związków.

Znaczną uwagę i szczególnie aspekt poznania ukierunkowano na podstawowe molekularne mechanizmy aktywności związków metaloorganicznych, odpowiedzialnych za ich właściwości cytotoksyczne i cytostatyczne (hamowanie cyklu podziałowego), pro-oksydacyjne, pro-apoptotyczne i genotoksyczne.

Realizacja zadań badawczych umożliwiła wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych związków o najlepszym cytotoksycznym i cytostatycznym profilu w badanych liniach komórek nowotworowych oraz uzyskanie danych na temat relacji między strukturą związku a jego aktywnością. Pozwoliła także odpowiedzieć na następujące pytania: 1) na jakim szlaku przebiega apoptoza, indukowana przez badane pochodne metaloorganiczne; 2) jakiego typu uszkodzeń DNA komórek nowotworowych mogą one powodować; 3) czy analizowane związki działają specyficznie na określoną fazę cyklu podziałowego oraz 4) czy będą generować stres oksydacyjny w badanych liniach komórek nowotworowych, a jeśli tak, to jaki jest w nim udział nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego; 5) jaki jest udział stresu oksydacyjnego w procesach apoptozy i indukowania uszkodzeń DNA; 6) czy badane pochodne metaloorganiczne mogą, oprócz apoptozy, indukować także inny rodzaj śmierci komórek nowotworowych.



Porównanie otrzymanych wyników przyczyniło się do uzyskania podstawowych informacji na temat różnic w funkcjonowaniu poszczególnych pochodnych, w zależności od ich budowy chemicznej (zależność SAR) oraz typu komórek nowotworowych na które one działają. Szczegółowe poznanie ww. molekularnych mechanizmów funkcjonowania metaloorganicznych substancji w komórkach nowotworowych pozwoliło ponadto ocenić ich przydatność jako nowej klasy potencjalnych chemioterapeutyków.

### ***Właściwości cytotoksyczne i cytostatyczne badanych pochodnych metaloorganicznych***

W pierwszym etapie badań oznaczono cytotoksyczność i cytostatyczność badanych związków na podstawie stężenia IC<sub>50</sub>, redukującego przeżywalność komórek o 50% oraz stężenia IG<sub>50</sub>, hamującego wzrost i proliferację komórek o 50%. Na tej podstawie wyselekcjonowano związki o największej aktywności cytostatycznej i cytotoksycznej wobec wybranych linii ludzkich komórek nowotworowych.

#### *Pochodne kwasu akroleinowego oraz azaferroceny*

Przedmiotem badań pierwszej grupy substancji metaloorganicznych były pochodne kwasu akroleinowego oraz azaferroceny. Podstawnik akroleinowy C(O)CHCH<sub>2</sub>, obecny w ich strukturze, determinuje aktywność przeciwnowotworową naturalnych związków takich jak wernolepina, elefantopina czy helenalina (Jankowiak, 2014). Możliwość zastąpienia strukturalnie złożonych związków naturalnych przez wykazujące podobny profil aktywności związki syntetyczne o znacznie mniej skomplikowanej budowie, mniejszej masie cząsteczkowej oraz efektywniejszej przenikalności przez błonę komórkową stanowi duże wyzwanie dla współczesnej medycyny (Kowalski i wsp. 2005; 2007).

W pracy dokonano analizy biologicznych właściwości i molekularnych mechanizmów aktywności przeciwnowotworowej czterech pochodnych ferrocenyłowych o symbolach **12a**, **12b**, **15** i **15Cl**. Badania wykonano na dwóch liniach komórek nowotworowych – HepG2 raka wątroby i A549 niedrobnokomórkowego raka płuc. Uzyskane wyniki wykazały wysoki potencjał przeciwnowotworowy analizowanych koniugatów, które w zakresie stężeń 10-120 μmol/L hamowały w znacznym stopniu proliferację komórek nowotworowych. Warto podkreślić, że obecność atomu chloru w cząsteczce badanych pochodnych powodowało nasilenie właściwości cytotoksycznych związku w porównaniu z analogiem, niezawierającym Cl. Prawdopodobnym jest więc, iż pierwiastek ten odkrywa kluczową rolę w kształtowaniu aktywności cytotoksycznej analizowanych związków. Duży potencjał biologiczny wspomnianego pierwiastka widoczny był również w badaniach innych właściwości biologicznych tych związków, w których chlorowane pochodne wykazywały zawsze wyższą aktywność niż ich niechlorowane odpowiedniki.

Na podstawie cytotoksycznych właściwości związków do dalszych badań wyselekcjonowano trzy najbardziej aktywne pochodne – **12a**, **15** i **15Cl**. Ze względu na to, że komórki linii A549 niedrobnokomórkowego raka płuc okazały się mało wrażliwe na te związki, dalsze badania przeprowadzono jedynie na linii komórek HepG2 gruczolakoraka wątroby, która uważana jest za linię referencyjną w testowaniu cytotoksyczności różnych związków.

## *Flawonoidowe pochodne ferrocenyłowe*

Przedmiotem licznych badań w ostatnim czasie są naturalnie występujące związki roślinne określane jako fitozwiązki. Szczególna uwaga naukowców skupiona jest wokół związków polifenolowych – flawonoidów. Stanowią one złożoną chemicznie i funkcjonalnie grupę związków organicznych, pełniących szereg istotnych funkcji. Odpowiadają one za barwę liści, kwiatów i owoców. Ponadto, jako niezwykle efektywne naturalne przeciwutleniacze stanowią skuteczną ochronę dla organizmu przed destruktywnym działaniem stresu oksydacyjnego. W roślinach, flawonoidy pełnią również funkcje ochronne przed patologicznym atakiem owadów i grzybów (Grotewold E., 2006, Malikov i Yuldashev 2002). Związki te są szczególnie istotne w naszej codziennej diecie. W licznych publikacjach naukowych, podkreślana jest zdolność flawonoidów do „zmiatania” wolnych rodników, jak również ich właściwości przeciwzapalne, antyalergiczne, przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe (Yoon i wsp., 2006). Właściwości i aktywność biologiczna polifenoli stanowią dla współczesnej medycyny niezwykle atrakcyjny punkt wyjścia do opracowania i syntezy nowych związków, zawierających w swej strukturze flawonoidy.

Ostatnie lata to również wzrost zainteresowania ferrocenyłowymi pochodnymi flawonoidów w chemii biometaloorganicznej. Istotne z biologicznego punktu widzenia właściwości biokoniugatów flawonoidów z ferrocenami zostały udowodnione w szeregu badań. Zespół prof. Jaouen'a wykazał cytotoksyczne, antybakteryjne i przeciwnowotworowe działanie ferrocenyłowych kompleksów flawonoidów (Monserrat i wsp. 2011; Monserrat i wsp., 2013; Tiwari i wsp., 2011; Monserrat i wsp., 2011).

W niniejszej pracy dokonano analizy aktywności biologicznej czterech pochodnych metaloorganicznych, skoniugowanych ze związkami flawonowymi o symbolach **4**, **5**, **6** i **7**.

Analizę właściwości cytotoksycznych i cytostatycznych ww. koniugatów wykonano na rosnącej w zawiesinie linii komórek CCRF-CEM ostrej białaczki limfocytarnej oraz na trzech liniach adherentnych – komórek HepG2 raka wątroby oraz komórek MCF-7, estrogenozależnego gruczolakoraka piersi i komórek MDA-MB-231 potrójnie negatywnego gruczolakoraka piersi, opornego na chemioterapię. Najbardziej wrażliwe okazały się komórki linii CCRF-CEM, dla których wartości stężeń  $IC_{50}$ , w zależności od rodzaju koniugatu, zawarte były w przedziale 37,5  $\mu\text{mol/L}$  – 86,5  $\mu\text{mol/L}$ . Nie zaobserwowano istotnego wpływu koniugatów na przeżywalności pozostałych linii komórek nowotworowych. Dane te wskazują na występowanie zależności pomiędzy budową chemiczną cząsteczki, a jej właściwościami cytotoksycznymi wobec komórek nowotworowych. Analiza cytostatycznych właściwości badanej grupy koniugatów metaloorganicznych nie wykazała ścisłej zależności pomiędzy czasem inkubacji a zahamowaniem cyklu podziałowego. Co więcej, po zastosowaniu niskich stężeń koniugatów i wydłużonej inkubacji (48 lub 72 godz.) obserwowano wzrost proliferacji niektórych linii komórek nowotworowych. Jest to działanie niepożądane w kontekście potencjalnego zastosowania tych związków jako nowych chemioterapeutyków.

Aktualna wiedza na temat losu pochodnych ferrocenyłowych w komórce jest bardzo niewielka. Możliwe, że niektóre komórki nowotworowe zdolne są do szybkiego metabolizowania związku metaloorganicznego, zastosowanego w niskich stężeniach,

i wykorzystania wolnego żelaza do zwiększenia proliferacji. Weryfikacja tej hipotezy wymaga wykonania szeregu dodatkowych badań, m.in. analizy szybkości akumulacji i trwałości chemicznej ferrocenów w komórkach.

Istotnych danych na temat cytotoksycznych właściwości metaloorganicznych pochodnych flawonowych dostarczają prace badawcze zrealizowane przez zespół Elizabeth Hillard (Monserrat i wsp., 2013; Monserrat i wsp., 2010). Naukowcy wykazali iż cytotoksyczność opisywanych koniugatów skorelowana jest z ich budową chemiczną (efekt *Structure Activity Relationship, SAR*). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy korespondują dobrze z wynikami badań tych autorów. Przyłączenie grupy ferrocenylowej do flawonoidu potęgowało aktywność przeciwnowotworową koniugatu, i nasilało jego efekt antyproliferacyjny. Wymienieni powyżej autorzy zwracają również uwagę na możliwe molekularne drogi aktywności biologicznej ferrocenylowych pochodnych flawonoidów, które mogą być realizowane poprzez złożone szlaki przekazywania sygnałów w komórkach.

Ze względu na szeroki zakres aktywności biologicznej, flawonoidy stanowią niezwykle interesującą grupę związków. Ich struktura chemiczna i obecność licznych ugrupowań chemicznych warunkuje ich wysoką aktywność molekularną oraz różnorodny sposób oddziaływania na metabolizm komórek (prawidłowych i nowotworowych) (Rawson i wsp., 2014; Ravishankar D. i wsp., 2013). Zasadnym wydaje się więc projektowanie i synteza kolejnych ferrocenylowych pochodnych flawonoidów o aktywności przeciwnowotworowej jak również dokładne zbadanie molekularnych szlaków ich funkcjonowania w komórkach nowotworowych.

#### *Ferrocenylowe pochodne kromonu zawierające kobalt*

Jedną z najczęściej stosowanych strategii w projektowaniu aktywnych biologicznie pochodnych metaloorganicznych jest przyłączenie podstawnika ferrocenyloвого do biologicznie aktywnego ugrupowania, którego funkcja i molekularna aktywność jest dobrze poznana. Dostępna literatura naukowa wskazuje na dużą liczbę ferrocenylowych metaloorganicznych pochodnych, które znajdują szerokie zastosowanie w medycynie. W syntezie nowych koniugatów wykorzystywane są m.in. zasady azotowe (Kowalski i wsp., 2012; Kowalski i wsp., 2013), oligonukleotydy (Pike i wsp., 2005), antybiotyki (Patra i wsp., 2012; Skiba J., i wsp., 2012), witaminy (Vera i wsp., 2011) i peptydy (Siebler i wsp., 2011). Obecnie wzrasta zainteresowanie dikobaltowym ugrupowaniem heksakarbonylowym  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$  ze względu na jego właściwości biologiczne (Heffern i wsp., 2013). Znaczna ilość danych, jaka pojawiła się w ostatniej dekadzie, wskazuje na wysoki potencjał kobaltu w zakresie zastosowania medycznego. Chang i wsp. (2010) potwierdziły przeciwwirusowe i antybakteryjne działanie pochodnych kobaltowych. Wykazano, że przyłączenie tego metalu do biologicznie poznanych struktur chemicznych nasila właściwości cytotoksyczne całej cząsteczki (Sergeant i wsp., 2008; Schlenk i wsp., 2008; Hall i wsp., 2007). Poznanie specyficznych właściwości kobaltu oraz biologicznej roli jaki metal ten odgrywa w komórkach nowotworowych wydaje się być kluczowe dla syntezy efektywnych, pochodnych metaloorganicznych o wysokim potencjale przeciwnowotworowym.

W pracy badano aktywność przeciwnowotworową czterech ferrocenylowych pochodnych, zawierających heksakarbonylowy podstawnik dikobaltowy. Molekularne

mechanizmy aktywności biologicznej tych związków analizowano w warunkach *in vitro* na czterech liniach komórek nowotworowych – MCF-7, MDA-MB-231, HepG2 oraz CCRF-CEM. Związki różniły się między sobą budową chemiczną, natomiast tylko jeden z nich (**7**) nie posiadał żadnego atomu metalu. Pozostałe koniugaty zawierały podstawnik ferrocenyłowy lub/ oraz atom kobaltu.

Analizowane pochodne wykazywały różną cytotoksyczność względem poszczególnych linii komórek nowotworowych. Największą efektywnością hamowania proliferacji komórek odznaczał się związek o symbole **10**, który skutecznie hamował proliferację trzech spośród czterech badanych linii komórek nowotworowych, będąc jednocześnie całkowicie nieaktywny wobec komórek MDA-MB-231 potrójnie ujemnego raka piersi. Należy podkreślić, że nowotwory tego typu są również bardzo odporne na klinicznie stosowane cytostatyki. Z drugiej strony, najbardziej wrażliwe na wszystkie badane metaloorganiczne koniugaty tej grupy były komórki linii MCF-7 estrogeno-zależnego raka piersi. Właściwości cytotoksyczne i antyproliferacyjne koniugatów były ściśle skorelowane z ich budową chemiczną. W przypadku koniugatu **7**, który nie posiadał w swojej strukturze ani podstawnika ferrocenyłowego, ani atomu kobaltu, nie odnotowano żadnej aktywności antyproliferacyjnej wobec testowanych linii komórkowych. Zbliżone wyniki otrzymano dla koniugatów **8** i **9**, które w szerokim zakresie stężeń hamowały proliferację tylko jednej spośród badanych linii komórkowych – CCRF-CEM (związek **8**) lub MCF-7 (związek **9**). Należy wspomnieć, iż związek **8** zawierał jedynie atom kobaltu, natomiast związek **9** – podstawnik ferrocenyłowy, przyłączony do reszty alkinowej. Pozostałe dwa koniugaty (związki **10** i **11**) zawierały dwupierścieniowy układ winylowy ferrocenu przyłączony do pierścieni aromatycznych kromonu i/lub atomu kobaltu. Wydaje się więc, iż obecność wspomnianej grupy organicznej, zawierającej atom żelaza, jest kluczowe i niezwykle istotne dla aktywności przeciwnowotworowej tego biokoniugatu. Analizując budowę chemiczną badanych pochodnych, stwierdzono, iż obecność podstawnika ferrocenyłowego, przyłączonego za pośrednictwem grupy winylowej do węgla C6 szkieletu kromonu, zwiększa zarówno aktywność cytotoksyczną jak i cytostatyczną całej cząsteczki, tak jak w przypadku koniugatu **10**. Co ciekawe, dołączenie do potrójnego wiązania reszty alkinowej kompleksu dikobaltowego (związek **11**) powodowało spadek aktywności cytotoksycznej i antyproliferacyjnej tego związku w porównaniu z aktywnością niemal identycznej cząsteczki pochodnej **10**.

Podsumowując uzyskane wyniki, można stwierdzić, iż istnieje ścisła zależność pomiędzy budową chemiczną analizowanych metaloorganicznych pochodnych, a ich właściwościami cytotoksycznymi i antyproliferacyjnymi, co sugeruje występowanie efektu SAR, tak jak w przypadku innych pochodnych metaloorganicznych (de Jesus Cazares-Marinero i wsp., 2013, Noffke i wsp., 2012).

Na podstawie testu cytotoksyczności, do dalszej analizy molekularnych mechanizmów aktywności przeciwnowotworowej opisywanej grupy biokoniugatów wyselekcjonowano koniugaty **10** i **11**. Z badań wykluczono natomiast linię potrójnie negatywnych komórek MDA-MB-231, które były niewrażliwe na działanie tej grupy związków.

Cytostatyczne właściwości analizowanych koniugatów uwarunkowane są ich zdolnością do blokowania cyklu podziałowego komórek nowotworowych (Miao i wsp.,

2011). W komórkach linii HepG2 i MCF-7, traktowanych związkiem **10** obserwowano zależność efektu cytostatycznego od czasu inkubacji z koniugatem. Wydłużenie czasu inkubacji z 24 do 48 godzin nie powodowało istotnych zmian wartości  $IG_{50}$ , podczas gdy 72-godzinna inkubacja powodowała istotne zmiany. Wydłużenie ekspozycji komórek HepG2 i MCF-7 na związek **10** zwiększało znacznie jego cytostatyczne działanie, szczególnie wobec komórek linii HepG2 raka wątroby (spadek  $IG_{50}$  o ok. 10  $\mu\text{mol/L}$ ), nie wpływało natomiast na wartość parametru  $IG_{50}$  w komórkach CCRF-CEM oraz zwiększało 2-krotnie jego wartość w komórkach MCF-7.

#### *Metaloorganiczne kompleksy alkilowe zawierające pierścień chromanowy oraz atom złota*

Historia zastosowania związków zawierających złoto w medycynie sięga przełomu XIX i XX wieku, kiedy zastosowano z powodzeniem tiolanów złota (I) w leczeniu gruźlicy. W późniejszym okresie (1929 r.) wykazano, że złoto przejawia dużą efektywność w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (Forestier, 1935). Niezwykle istotnym wydarzeniem okazało się również wykrycie przeciwnowotworowych właściwości pochodnej złota – auranofiny (Mirabelli i wsp., 1985). Uzyskane wyniki stały się solidną podstawą do dalszych badań nad potencjalnym zastosowaniem koniugatów złota jako chemioterapeutyków oraz analizy ich molekularnych szlaków aktywności i wynikających z nich właściwości przeciwnowotworowych. Właśnie z powodu tych właściwości metaloorganiczne związki złota cieszą się ostatnio dużą popularnością wśród naukowców (Ott i wsp., 2009; Liu i wsp., 2013; Hackenberg i Tacke, 2014; Cisnetti i wsp., 2013). Związki te wykazują także silne właściwości bakteriobójcze (Glisic i Djuran, 2014; Tacke, 2015) i charakteryzują się wysoką reaktywnością w warunkach fizjologicznych, m.in. ze względu na indukcję szlaków komórkowych reakcji redoks. Zwraca się natomiast uwagę na stosunkowo niską stabilność tych pochodnych (Zou i wsp., 2015).

Szczególne zainteresowanie wzbudzają koniugaty jonów złota na +1 stopniu utleniania, które łączone są najczęściej z tiolanami, N-heterocyklicznymi karbenami (NHC) oraz alkenami. Znaczna część najnowszych badań poświęcona jest syntezie oraz molekularnym mechanizmom biologicznej aktywności kompleksów złoto (III)-NHC (Rana i wsp., 2014; Rubbiani i wsp., 2014; Zou i wsp., 2013). Za ich główny cel molekularny uważa się mitochondria i reduktaza tioredoksyny TrxR.

W pracy zbadano właściwości cytotoksyczne i cytostatyczne trzech kompleksów złota (I) połączonego z alkenami oraz pierścieniami kromonu. Wszystkie pochodne o nazwach **4**, **5** i **6** były wysoce cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych linii HepG2, MCF-7, MDA-MB-231 i CCRF-CEM, wykazując mikromolowe stężenie  $IC_{50}$ , zbliżone lub nawet niższe od stężenia  $IC_{50}$  auranofiny. Analizowane pochodne nie wykazywały selektywnej aktywności względem komórek nowotworowych i były cytotoksyczne również względem immortalizowanych komórek śródbłonna izolowanego z żyły pępowinowej (linia HUVEC-ST funkcjonujących, jako model komórek prawidłowych). Wyniki te wskazują na niezwykle istotny problem współczesnej onkologii – brak lub niska selektywność działania zarówno potencjalnych chemioterapeutyków, jak i dostępnych komercyjnie leków, charakteryzujących się wysoką aktywnością przeciwnowotworową.

Uzyskane dane znajdują potwierdzenie w badaniach innych autorów. Wysoka cytotoksyczność pochodnych metaloorganicznych, zawierających złoto połączona jest

często z ich proosydacyjnymi i proapoptotycznymi właściwościami (Zou i wsp., 2015; Cisnetti i wsp., 2013; Hickey i wsp., 2008; Cheng i wsp., 2014; Gautier i wsp., 2012; Holenya i wsp., 2014; Hackenberg i wsp., 2013; Rana i wsp., 2014; Hikiusz i wsp., 2014). Różnice w przeciwnowotworowym funkcjonowaniu trzech analizowanych koniugatów złota mogą wynikać z różnic w ich budowie chemicznej i właściwości z nich wynikających.

#### *Pochodna rutenu (DiRu-1)*

Pochodne rutenu ze względu na swoje obiecujące właściwości przeciwnowotworowe wzbudzają coraz większe zainteresowanie jako potencjalne chemioterapeutyki. Związki te ulegają często hydrolizie, a następnie wiążą się z szeregiem biomolekuł (Süss-Fink, 2010; Süss-Fink, 2014). Część z nich wykazuje wysoką cytotoksyczność względem komórek nowotworowych, na poziomie podobnym lub nawet wyższym niż cisplatyna. Jedną z pierwszych, prototypowych pochodnych rutenu wykazywała bardzo wysoką aktywność w warunkach *in vivo*, hamując proliferację komórek raka jelita grubego u myszy (Murray i wsp., 2016).

W pracy obserwowano zależny od stężenia związku spadek przeżywalności komórek nowotworowych raka piersi i raka wątroby. Najbardziej wrażliwa na działanie DiRu-1 była linia MCF-7. Warto podkreślić iż stężenie  $IC_{50}$  obliczone dla tych komórek zawarte było w zakresie niskich stężeń nanomolowych było o rząd wielkości niższe od stężeń  $IC_{50}$  wielu innych kompleksów rutenu, opisanych w literaturze (Xie i wsp., 2013; Schatzschneider i wsp., 2008; Schäfer i wsp., 2007). 24-godzinna inkubacja komórek MCF-7 z nanomolowymi stężeniami DiRu-1 redukowało o połowę populację komórek, podczas gdy podobny efekt *in vitro* dla innych pochodnych rutenu oraz cisplatyny osiągnąć można po znacznie dłuższej (48-96 godzinnej) ekspozycji komórek na stężenia wyższe o rząd wielkości od stężeń DiRu-1 stosowanych w niniejszej pracy.

Wysoka cytotoksyczność pochodnych rutenu znajduje potwierdzenie w badaniach innych autorów. Związki te hamują skutecznie proliferację komórek nowotworowych różnego typu (Xie i wsp., 2013; Schatzschneider i wsp., 2008; Schäfer i wsp., 2007; Zhao i wsp., 2014; Du i wsp., 2015). Co więcej, badania Zao i wsp. (2014) wykazały selektywne działanie tych związków na komórki nowotworowe i ich niską toksyczność w stosunku do komórek prawidłowych. Wykazano, że żywotność prawidłowych komórek endotelialnych HUVEC-ST, ekspozowanych na pochodne rutenu, była zbliżona do żywotności nietraktowanych komórek kontrolnych. Fakt, iż wiele spośród pochodnych rutenu wykazuje wyższą aktywność cytotoksyczną i antyproliferacyjną od cisplatyny czyni je niezwykle atrakcyjną grupę związków o potencjalnym zastosowaniu chemioterapeutycznym (Zhao i wsp., 2014; Xie i wsp., 2013).

#### ***Proosydacyjne właściwości pochodnych metaloorganicznych***

Niezwykle istotnym pierwiastkiem warunkującym molekularne aktywności ferrocenów jest atom żelaza. W organizmie bierze on udział w licznych procesach, istotnych dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu, takich jak wzrost komórek i ich podziały, czy kontrola nad metabolizmem energetycznym. Żelazo stanowi ponadto elementarny składnik budulcowy białek zaangażowanych w transport tlenu (hemoglobina)

czy enzymatycznych polipeptydów, regulujących złożone procesy metaboliczne np. cytochromu, peroksydaz.

Z drugiej strony zwraca się również uwagę na destrukcyjne działanie tego pierwiastka w ustroju.  $Fe^{2+}$  przyczyniać się może do generowania reaktywnych form tlenu, głównie na drodze przemian chemicznych, określanych jako reakcja Fentona, w której powstaje niezwykle reaktywny rodnik hydroksylowy  $\cdot OH$ . Proces ten powoduje uruchomienie w organizmie patologicznych reakcji, związanych z licznymi jednostkami chorobowymi takimi jak marskość wątroby, choroby serca, cukrzycę. Niepożądane działanie żelaza w naszym organizmie szczególnie często łączone również jest z ontogenezą, będącej wynikiem destrukcyjnego działania RFT. Powstające wolne rodniki działają szkodliwie na szereg niezwykle ważnych struktur takich jak białka, lipidy czy DNA, powodując zaburzenia ich prawidłowego funkcjonowania.

Należy zaznaczyć, że prooksydacyjne właściwości żelaza wykorzystywane są również jako potencjalna broń do walki z komórkami nowotworowymi. Dotychczasowe badania wskazują, że kontrola nad prawidłową gospodarką żelaza w organizmie może stanowić doskonałą broń do zwalczania nowotworów, jak również być ważnym czynnikiem prewencyjnym (Bystrom L. M., Rivella S., 2015, Foy S. P, Labhasetwar V., 2011). Kiessling i wsp. (2009) w swoich badaniach wykorzystali agresywne komórki chłoniaka (limfocyty T). Poprzez zablokowanie szlaku NF- $\kappa$ B spowodowały zahamowanie ferrytyny, kluczowego dla gospodarki żelaza białka, które kompleksując jony  $Fe^{3+}$  warunkuje ich odpowiedni poziom w ustroju. Skutkiem dysfunkcji ferrytyny był znaczny wzrost poziomu wolnego  $Fe^{2+}$  i reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych. Powstające w komórkach nowotworowych wolne rodniki przyczyniały się do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych oraz ich śmierci na drodze apoptozy. W prawidłowych komórkach nie obserwowano natomiast wzrostu RFT zależnych od  $Fe^{2+}$  (Kiessling M. K., i wsp. 2009). Kolejny zespół badawczy (Kalinowski D. S., Richardson 2007) wykorzystał w swoich badaniach związki chelatujące żelazo, które po związaniu z metalem powodowały w komórkach nowotworowych wzrost reaktywnych form tlenu zależny od funkcjonowania żelaza. Dane te wskazują na istotną rolę RFT w niszczeniu komórek nowotworowych oraz na cytotoksyczne i przeciwnowotworowe właściwości żelaza oraz związków metaloorganicznych zawierających w swojej strukturze ten metal.

Przyjmuje się, że generowanie RFT przez dostępne komercyjnie chemioterapeutyki jest jednym z głównych i istotnych mechanizmów ich aktywności przeciwnowotworowej (Kovacic, 2007). Zastosowanie ferrocenyłowych pochodnych związane jest bardzo często z generowaniem stresu oksydacyjnego, pojawiającego się w komórkach w wyniku uruchomienia reakcji wolnorodnikowych przez te związki. W pracy oznaczano poziom RFT (nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego) w komórkach nowotworowych poddanych działaniu metaloorganicznych biokoniugatów.

#### *Azzaferroceny i pochodne kwasu akroleinowego*

W komórkach nowotworowych linii HepG2, poddanych działaniu trzech pochodnych ferrocenyłowych (związki **15**, **15Cl** oraz **12a**) obserwowano wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (głównie nadtlenku wodoru). Istotnie statystyczne zmiany obserwowano głównie po dłuższych czasach inkubacji komórek ze związkami.

Obserwowano korelację pomiędzy budową związku, a jego prooksydacyjnymi właściwościami. Analogicznie, jak w przypadku cytotoksycznego działania biokoniugatów, najwyższą aktywność pro-oksydacyjną wykazywały chlorowane pochodne. Wydaje się więc prawdopodobne, że pierwiastek ten wzmacnia aktywność całej cząsteczki w całym zakresie jej aktywności przeciwnowotworowej.

W celu określenia udziału RFT w cytotoksyczności badanych koniugatów wykonano test cytotoksyczności po stosując 1-godziną preinkubację komórek HepG2 z dwoma przeciwutleniaczami – N-acetylocysteiną (NAC), kwasem askorbinowym oraz rozpuszczalnym w wodzie analogiem witaminy E (Trolox). Zastosowanie zmiataczy wolnych rodników powodowało redukcję cytotoksyczności biokoniugatów i wzrost przeżywalności komórek nowotworowych. Znacznie lepsze właściwości hamowania cytotoksycznego działania metaloorganicznych związków przejawiała NAC, co wskazywać może na pewną preferencyjną lokalizację działania analizowanych biokoniugatów w cytoplazmie komórek. Uzyskane wyniki wskazują, że u podstaw aktywności przeciwnowotworowej pochodnych kwasu akroleinowego oraz azaferrocenów znajduje się atom żelaza oraz zależny od niego szlak indukowania stresu oksydacyjnego. Generowanie RFT jest niezwykle istotnym mechanizmem odpowiedzialnym za cytotoksyczność oraz genotoksyczność wielu chemioterapeutyków oraz związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym (Dunn i wsp., 2015, Tong i wsp., 2015).

#### *Ferrocenyłowe pochodne kromonu zawierające kobalt*

W komórkach nowotworowych linii MCF-7, HepG2 oraz CCRF-CEM, poddanych działaniu dwóch związków metaloorganicznych (**10** i **11**), odnotowano wzrost poziomu RFT. Obserwowane zmiany były skorelowane zarówno z czasem inkubacji z ferrocenyłowymi pochodnymi jak i z ich stężeniem. Największe zmiany obserwowano po 6-godzinnej inkubacji komórek z koniugatami (około 50% wzrost względem kontroli). Proces generowania RFT przebiegał dwuetapowo w prawie każdym wariancie eksperymentu (wyjątek stanowiły komórki MCF-7 traktowane związkiem **11**). W początkowym etapie widoczny był stopniowy wzrost poziomu RFT, który trwał do około 45-60 minuty pomiaru, po czym następował spadek poziomu RFT aż do ustalenia ich względnie stałego poziomu na końcu 180-minutowego pomiaru. Zastosowanie zmiataczy wolnych rodników (NAC, wit. C, Trolox) powodowało redukcję cytotoksyczności wszystkich analizowanych pochodnych. Komórki nowotworowe zdolne były do proliferacji nawet po 24-godzinnej inkubacji z metaloorganicznymi pochodnymi. Wyliczone na podstawie uzyskanych krzywych przeżywalności wartości stężeń  $IC_{50}$  były od 2 do 4 razy wyższe niż w przypadku samodzielnie zastosowanych pochodnych ferrocenyłowych. Wyjątek stanowiła linia MCF-7 traktowana związkiem **10**, po godzinnej preinkubacji z witaminą C, dla której nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w proliferacji komórek. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami innych autorów i wskazują na istotny udział RFT w aktywności przeciwnowotworowej i cytotoksyczności badanych pochodnych ferrocenyłowych.

Dostępne dane literaturowe podkreślają wpływ prooksydacyjnych właściwości pochodnych ferrocenyłowych na kształtowanie całkowitego potencjału przeciwnowotworowego oraz cytotoksycznego związków metaloorganicznych (Neuse,



2005, Jaouen G. i wsp., 2015). Perez i wsp. (2015) wykazali, że ferrocenyłowe pochodne estradiolu generowały RFT w komórkach linii MCF-7, które wpływały także na genotoksyczne właściwości całej cząsteczki. Wzajemna korelacja pomiędzy RFT, powstającymi w komórkach nowotworowych traktowanych ferrocenyłowymi pochodnymi, a cytotoksycznymi właściwościami całej cząsteczki badana była również przez zespół Acevedo-Morantes'a (Acevedo-Moranes i wsp., 2012), który wykazał prooksydacyjne właściwości soli ferrocenyłowych wobec komórek MCF-7 estrogenozależnego raka piersi. Co więcej, zastosowanie przeciwutleniacza (NAC) powodowało istotny spadek poziomu RFT w komórkach nowotworowych oraz skutkowało obniżeniem efektywności cytotoksycznego działania cząsteczki metaloorganicznej. Godzinna preinkubacja komórek z 10 mmol/L NAC umożliwiała natomiast swobodną proliferację komórek nowotworowych, nawet wówczas, gdy traktowano je wysokimi stężeniami związków metaloorganicznych.

#### *Pochodna rutenu (DiRu-1)*

O tym, jak niezwykle istotna jest rola RFT jako mediatorów procesu apoptozy świadczy fakt dużej ilości badań prowadzonych w tym zakresie. Liczne chemioterapeutyki realizują swoją aktywność przeciwnowotworową właśnie poprzez generowanie stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych, którego skutkiem jest m.in. uruchomienie PCD (Yang i wsp., 2013).

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza oksydacyjnych właściwości pochodnej rutenu DiRu-1 wykazała, iż związek ten powodował wzrost reaktywnych form tlenu ( $H_2O_2$  i  $O_2^{\bullet-}$ ) w komórkach MCF-7. Indukcja stresu oksydacyjnego skorelowana była z czasem inkubacji komórek z analizowaną pochodną metaloorganiczną oraz jej stężeniem. Największy wzrost poziomu RFT zanotowano dla najwyższego stężenia związku (154 nmol/L) oraz 0,5 godz. czasu inkubacji. Ciekawym jest fakt, iż w przypadku 3 godz. ekspozycji komórek MCF-7 na działanie **DiRu-1** nie obserwowano istotnego statystycznie wzrostu nadtlenu wodoru w komórkach nowotworowych.

**DiRu-1** powodował również wzrost poziomu anionorodnika ponadtlenkowego. Jego poziom w komórkach MCF-7 był proporcjonalny do zastosowanego stężenia metaloorganicznej pochodnej oraz wzrastał w miarę upływu czasu hodowli poinkubacyjnej. Co ciekawe, w przeciwieństwie do kinetyki reakcji charakterystycznej dla  $H_2O_2$  w przypadku tego rodniaka, zastosowanie dłuższej, 3-godzinnej inkubacji z **DiRu-1**, powodowało wzrost ilości zwiększoną ilością  $O_2^{\bullet-}$  w komórkach MCF-7 w porównaniu z inkubacją 0,5-godzinną.

Uzyskane wyniki korelują z wynikami publikacji naukowych, w których udowodniono, że wzrost poziomu wewnątrzkomórkowych RFT związany był z indukcją uszkodzeń mitochondriów oraz uruchomieniem szlaku PCD w komórkach nowotworowych. Stres oksydacyjny powodowany działaniem pochodnych rutenu skutkowało amplifikacją sygnałów apoptotycznych, realizowanych na wielu szlakach sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, w której zaangażowanych jest wiele białek, takich jak p53 oraz szlak kinaz MAPK (Zhao i wsp., 2014; Jiang i wsp., 2014).

#### ***Genotoksyczne właściwości pochodnych metaloorganicznych***

Materiał genetyczny każdego organizmu narażony jest na uszkodzenia, które spowodowane mogą być wieloma różnorodnymi procesami i czynnikami fizjologicznymi. Jednym z najważniejszych zadań komórki jest efektywna ochrona informacji genetycznej, zawartej w DNA oraz szybka i skuteczna naprawa wszelkich uszkodzeń i nieprawidłowości, jakie pojawiają się w obrębie struktury DNA. Komórki eukariotyczne wykształciły system monitorujący integralność genomu, który określany jest jako szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR). Jednym z jego kluczowych elementów jest białko p53 określane jako „strażnik genomu”. Od jego działania uzależniony jest m.in. los komórki który prowadzi może do jej przeżycia lub śmierci. Decyzja o wyborze aktywacji określonej ścieżki zależy przede wszystkim od poziomu uszkodzeń DNA (Korwek i Alster, 2014).

Większość dostępnych i stosowanych w onkoterapii chemioterapeutyków wpływa na DNA komórek nowotworowych powodując zahamowanie jego syntezy lub jego uszkodzenia. Najbardziej efektywne związki o dużej genotoksyczności indukują zmiany w DNA niemożliwe do reperacji przez dostępne w komórkach molekularne systemy naprawcze. Ponieważ komórki nowotworowe charakteryzują się szybką i niekontrolowaną proliferacją, ich materiał genetyczny jest szczególnie wrażliwy na działanie wszelkich czynników genotoksycznych oraz mutagennych. Wśród najczęściej stosowanych leków cytostatycznych, uszkadzających DNA, wymienia się związki alkilujące (np. cisplatyna) oraz inhibitory topoizomeraz I i II.

Publikacje naukowe wskazują na genotoksyczne właściwości pochodnych ferrocenylowych (Kowalski i wsp., 2007). W nawiązaniu do tych informacji w niniejszej pracy postanowiono zbadać zdolność analizowanych grup koniugatów ferrocenylowych do indukcji uszkodzeń w materiale genetycznym komórek nowotworowych określonych typów nowotworów.

#### *Azzaferroceny i pochodne kwasu akroleinowego*

Analiza uszkodzeń DNA wykazała, że wszystkie badane w pracy azaferroceny i pochodne kwasu akroleinowego powodują uszkodzenia materiału genetycznego komórek nowotworowych linii HepG2. Zauważono dwie prawidłowości, charakterystyczne dla genotoksycznego działania opisywanych związków. Uszkodzenia DNA były największe bezpośrednio po zakończeniu inkubacji komórek ze związkami (0 godz.), natomiast już po 24-godzinnym okresie hodowli komórek w medium pozbawionym ferrocenów, następował spadek procentowej zawartości uszkodzonego DNA. Tendencja ta utrzymywała się w przypadku wszystkich badanych związków z opisywanej grupy. Świadczyć może to o sprawnie działających systemach naprawczych DNA w testowanych komórkach nowotworowych, w wyniku których, były one zdolne do naprawy części z powstałych uszkodzeń. Potwierdzenie genotoksycznych właściwości azaferrocenów znaleźć można w badaniach innych autorów. Kowalski i wsp. (Kowalski i wsp., 2007) wykazali, iż związki te zdolne były do indukcji uszkodzeń DNA. Badania wskazują, iż aktywność genotoksyczna ferrocenylowych związków metaloorganicznych wynika głównie z generowania w komórkach nowotworowych stresu oksydacyjnego (RFT), powstającego w wyniku funkcjonowania metalu żelaza.

Istotnym jest również fakt występowania korelacji pomiędzy budową związków, a efektywnością ich genotoksycznego działania na komórki nowotworowe linii HepG2.

Podobnie, jak w przypadku właściwości cytotoksycznych i pro-oksydacyjnych, właściwości genotoksyczne tych pochodnych wydają się być zależne od obecności w cząsteczce metaloorganicznej atomu chloru. Dla wszystkich związków, które w swej strukturze zawierały oprócz atomu żelaza dodatkowy metal (chlor), obserwowano zwiększoną zawartość uszkodzonego DNA w ogonie komety. Sugeruje się, że genotoksyczne działanie atomu chloru prawdopodobnie nie wynika z jego bezpośredniego oddziaływania z cząsteczką DNA oraz, że może on zwiększać genotoksyczne właściwości całej cząsteczki poprzez wchodzenie w interakcje z białkami związanymi z DNA, lub pośrednio poprzez generowanie reaktywnych form tlenu uszkadzających szereg struktur komórkowych, w tym materiału genetycznego (Ververde i wsp., 2001, Wada i wsp., 2015).

Wcześniej opisana analiza wyników generowania RFT w komórkach HepG2 eksponowanych na działanie badanych metaloorganicznych pochodnych oraz dane innych autorów, pozwalają skłaniać się ku hipotezie udziału RFT, generowanych z udziałem m.in. chloru i żelaza, w kształtowaniu właściwości genotoksycznych cząsteczki metaloorganicznej.

#### *Pochodne ferrocenyłowe zawierające atom kobaltu*

Wynikiem aktywności opisywanej grupy pochodnych ferrocenyłowych w komórkach nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7 oraz HepG2 były uszkodzenia ich materiału genetycznego. Najbardziej wrażliwa na działanie pochodnej metaloorganicznej **10** pozostała zawieszinowa linia białaczkowa CCRF-CEM. Warto podkreślić, że w przypadku wszystkich związków i zastosowanych linii komórek nowotworowych, po 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej obserwowano spadek zawartości uszkodzonego DNA w ogonie komety, co prawdopodobnie jest wynikiem naprawy uszkodzeń DNA przez systemy naprawcze komórek.

Z powodu zastosowania selekcji badanych pochodnych ferrocenyłowych, trudno jest bezpośrednio odnieść poziom uszkodzeń DNA do właściwości metaloorganicznych pochodnych, wynikających z ich struktury chemicznej. Linia MCF-7 estrogenozależnego nowotworu piersi, jako jedyna testowana była na dwóch metaloorganicznych związkach (**10** oraz **11**), natomiast pozostałe dwie linie eksponowane były jedynie na działanie pochodnej **10**. Różnica w strukturze chemicznej kompleksów metaloorganicznych polegała jedynie na obecności w związku **11** dikobaltowo heksakarbonyłowej grupy funkcyjnej  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ , która często przyłączana jest do alkinów warunkując ich molekularne aktywności. W dostępnej literaturze naukowej pojawia się coraz więcej informacji na temat właściwości wspomnianego ugrupowania chemicznego. Ott i wsp. wykazali, że przyłączenie  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$  do struktury aspiryny powodowało istotne zmiany w zakresie udziału całej cząsteczki w procesie angiogenezy (Ott i wsp., 2009, Ott i wsp., 2005). Ponadto, ugrupowanie to odpowiedzialne jest za zwiększenie właściwości cytotoksycznych niektórych metaloorganicznych pochodnych (Schlenk i wsp., 2008, Sergeant i wsp., 2007).

Analiza cytotoksycznych właściwości wykazała, że spośród wszystkich czterech zastosowanych linii komórek nowotworowych jedynie linia MCF-7 wrażliwa była na działanie zarówno związku **10**, jak i **11**. Analiza poziomu uszkodzeń DNA komórek estrogenozależnego raka piersi, wykazała, że metaloorganiczna pochodna zawierająca w swej strukturze  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$  (**11**) generowała więcej uszkodzeń DNA. Uzyskane wyniki

wskazują na udział ugrupowania  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$  w kształtowaniu molekularnych mechanizmów genotoksyczności całej cząsteczki metaloorganicznej.

*Metaloorganiczne kompleksy alkilowe zawierające w swojej strukturze pierścień chromanowy oraz atom złota*

Ekspozycja linii CCRF-CEM, MCF-7, MDA-MB-231 oraz HepG2 na działanie analizowanych pochodnych metaloorganicznych zbudowanych m.in. z pierścienia kromonu oraz złota, powodowała uszkodzenie materiału genetycznego komórek. W przypadku CCRF-CEM oraz MCF-7 testowane były wszystkie trzy metaloorganiczne pochodne – **4**, **5** i **6**, natomiast pozostałe dwie linie (MDA-MB-231 oraz HepG2) traktowano związkami **4** lub **6**. Istotnym do podkreślenia jest fakt, iż wyłącznie w przypadku estrogenozależnego raka piersi (MCF-7) obserwowano istotne statystycznie różnice pomiędzy aktywnością genotoksyczną, związków o różnej strukturze chemicznej. Największy odsetek uszkodzonego DNA obserwowano w komórkach ekspozycyjnych na działanie odpowiednio związków  $4 > 5 > 6$ . W pozostałych liniach nowotworowych (CCRF-CEM, HepG2, MDA-MB-231) nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w genotoksycznej aktywności pomiędzy metaloorganicznymi pochodnymi.

W dostępnej literaturze jest niewiele informacji na temat genotoksycznych właściwości metaloorganicznych pochodnych, zawierających w swojej strukturze złoto. Uwaga naukowców skupiona jest przede wszystkim na udziale opisywanych związków w hamowaniu aktywności reduktazy tioredoksyny (TrxR). Białko to odgrywa niezwykle istotną rolę w rozwoju i proliferacji komórek nowotworowych. Podwyższona ekspresja genu, kodującego wspomniany polipeptyd jest charakterystyczna dla nowotworów. Coraz częściej TrxR staje się jednym z głównych celów nowych terapii przeciwnowotworowych (Lima, Rodriguez, 2011, Rana i wsp., 2014, Zou i wsp., 2015).

Rana i wsp. (Rana i wsp., 2014) sugerują, iż u podstaw molekularnych mechanizmów aktywności przeciwnowotworowej pochodnych metaloorganicznych zawierających złoto – Au(I) lub Au(III), leży prawdopodobnie ich zdolność hamowania aktywności TrxR. Enzym ten odkrywa niezwykle istotną rolę w zachowaniu homeostazy redoks całego organizmu. Ograniczenie lub zahamowanie jego aktywności w komórkach nowotworowych uruchamiać może kolejne procesy biochemiczne, m.in. uruchomienie szlaku programowanej śmierci (apoptozy) i procesów jej towarzyszących (aktywacja kaspaz, spadek potencjału mitochondrialnego), generowanie wolnych rodników. Można więc przypuszczać, że genotoksyczne właściwości badanych w niniejszej pracy pochodnych metaloorganicznych, zawierających złoto, mogą również być związane z blokowaniem aktywności TrxR.

*Pochodna dirutenu-1 (DiRu-1)*

Związki metaloorganiczne zawierające w swej strukturze chemicznej planarne ligandy aromatyczne zdolne są do niekowalencyjnego wiązania się z DNA oddziałując w ten sposób znacząco na właściwości i prawidłowe funkcjonowanie materiału genetycznego. Znane są trzy różne mechanizmy niekowalencyjnych oddziaływań związków metaloorganicznych z DNA: interkalacja (planarne aromatyczne ugrupowania „wchodzą” pomiędzy pary zasad DNA), oddziaływania hydrofobowe z rowkami DNA oraz

elektrostatyczne interakcje z konkretnymi parami zasad lub sekwencjami DNA odbywające się za pośrednictwem wiązań wodorowych (Komor i Barton, 2013). Większość związków metaloorganicznych zdolna jest także do interakcji z DNA za pomocą wiązania kowalencyjnego z N7 adeniny i guaniny.

Genotoksyczne właściwości badanej pochodnej rutenu (**DiRu-1**) zostały potwierdzone w teście kometowym, przeprowadzonym w warunkach alkalicznych. Wykazano, iż związek ten powodował istotne statystycznie zmiany poziomu zawartości uszkodzonego DNA w ogonie komet. Indukcja uszkodzeń DNA skorelowana była z czasem ekspozycji komórek MCF-7 na **diruten-1** oraz jego stężeniem. Uzyskane wyniki charakteryzuje analogia do przeprowadzonych dotychczas badań nad genotoksyczną aktywnością pochodnych rutenu. W licznych pracach udowodniono, że kompleksy zawierające ruten wykazują bardzo duże zdolności do wiązania się z DNA. Skutkiem wzajemnej interakcji jest zaburzenie cyklu podziałowego komórek nowotworowych oraz ich apoptoza. Genotoksyczne działanie pochodnych rutenu wskazywane jest często jako jeden z głównych mechanizmów, warunkujących całkowitą aktywność przeciwnowotworową tych związków (Xie i wsp., 2013; Putta i wsp., 2015).

Stwierdzono ponadto, że kompleksy rutenu mogą hamować wzrost komórek nowotworowych poprzez indukcję p53, zależną od dysfunkcji mitochondriów i uszkodzenia DNA, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórek nowotworowych (Li i wsp., 2012; Chen i wsp., 2010). Tan i wsp. wykazali, że uszkodzenia DNA, wywołane przez pochodne rutenu skutkowały zależną od funkcjonowania RFT dysfunkcją mitochondriów i uruchomieniem PCD (Tan i wsp., 2010).

### ***Zmiany płynności błony plazmatycznej wywołane przez pochodne metaloorganiczne***

#### *Azzaferroceny i pochodne kwasu akroleinowego*

Generowany przez analizowane ferroceny stres oksydacyjny przyczyniać się może także do indukcji zaburzeń prawidłowego funkcjonowania błony plazmatycznej komórek. W wyniku reakcji wolnorodnikowych dochodzi do utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co w konsekwencji prowadzi do powstania zmodyfikowanych strukturalnie i uszkodzonych cząsteczek lipidowych. Produkty peroksydacji lipidów zmieniają właściwości fizyczne oraz biologiczne błony komórkowej, czego skutkiem może być m.in. zahamowanie aktywności enzymów błonowych czy polipeptydów o charakterze transporterów. Naruszona struktura dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej może prowadzić do zmian jej płynności oraz wzrostu lub spadku przepuszczalności i zaniku integralności. Ostatecznym efektem działania RFT jest uszkodzenie tkanek (Pędzik i wsp., 2004, Zabłocka i wsp., 2008).

W niniejszej pracy dokonano analizy stopnia peroksydacji lipidów błonowych w komórkach nowotworowych linii HepG2, eksponowanych na działanie trzech pochodnych ferrocenylowych. Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji komórek z badanymi pochodnymi metaloorganicznymi obserwowano spadek płynności błony w obrębie zewnętrznego obszaru dwuwarstwy lipidowej oraz w mniejszym stopniu, w jej głębszych (hydrofobowych) obszarach. Poziom peroksydacji lipidów skorelowany był z budową chemiczną zastosowanego ferrocenu. Uzyskane wyniki pozostawały

w ścisłej korelacji z wynikami testów cytotoksyczności oraz detekcji RFT. Ponownie, największe zmiany obserwowano dla związków zawierających atom chloru w strukturze. Wydaje się prawdopodobne, że pierwiastek ten jest istotny z punktu widzenia kształtowania mechanizmów funkcjonowania całej pochodnej ferrocenylowej.

W dostępnej literaturze naukowej nie odnaleziono informacji na temat peroksydacji lipidów zależnej od funkcjonowania metaloorganicznych pochodnych ferrocenylowych. Przedstawione zagadnienie naukowe wymaga więc dalszych analiz. Ponieważ prooksydacyjne właściwości cząsteczek metaloorganicznych odkrywają jedną z kluczowych ról w kształtowaniu właściwości antynowotworowych całej cząsteczki, powstające w komórkach nowotworowych RFT pod wpływem pochodnych metaloorganicznych mogą powodować m.in. uszkodzenia lipidów błonowych.

### ***Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej***

Apoptoza, określana również jako zaprogramowana śmierć komórki, jest złożonym procesem biochemicznym, kontrolowanym przez ekspresję odpowiednich genów i udziału szeregu białek regulatorowych. Biologiczne znaczenie apoptozy dla rozwoju organizmu oraz utrzymywania stanu homeostazy jest ogromne. Proces ten odgrywa kluczową rolę w szeregu różnorodnych procesów biochemicznych zachodzących w organizmach, przyczyniając się tym samym do ich prawidłowego funkcjonowania. Apoptoza jest konieczna podczas embriogenezy, gdyż zapewnia usuwanie komórek zmutowanych, zainfekowanych, autoreaktywnych czy uszkodzonych oraz prawidłową homeostazę tkankową regulując równowagę między podziałami, a „cichym znikaniem” komórek.

Apoptoza przebiegać może na dwóch głównych szlakach sygnalizacyjnych - **zewnętrznym (receptorowym)**, w którym udział biorą tzw. receptory śmierci – DR (ang. **death receptor**) znajdujące się w błonach komórkowych. Śmierć komórki odbywa się wówczas przy udziale specyficznych ligandów (np. TNF, cytokiny) wiążących się z DR. Drugą drogą jest szlak **wewnętrzny (mitochondrialny)**. W tym przypadku kluczową rolę odgrywają mitochondria oraz rozbudowana pula białek zaangażowanych w opisywany proces. Niezwykle istotna dla prawidłowej regulacji PCD oraz jej realizacji jest rodzina białek Bcl-2. Niezależnie jednak od drogi aktywacji apoptozy, w proces fizjologicznej śmierci komórek zaangażowane są proteazy cysteinowe (kaspazy) (Moldoveanu i wsp., 2014; Chipuk i wsp., 2010; Llambi, Green 2011; Martinou i wsp., 2011).

Istotnym problemem współcześnie stosowanej chemioterapii jest jej niska efektywność w zakresie hamowania niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych oraz ich dalszej likwidacji. Brak wrażliwości komórek nowotworowych na apoptozę stanowi poważny czynnik ograniczający stosowanie leków cytostatycznych. Zaburzenia PCD oraz odporność komórek nowotworowych na wspomniany wyżej proces wynikają przede wszystkim z zaburzeń ekspresji genów kodujących czynniki o charakterze pro- i anty-apoptotycznym. Z jednej strony dochodzi do inaktywacji białek kierujących komórki na szlak zaprogramowanej śmierci, z drugiej natomiast do zwiększenia aktywności polipeptydów promujących proliferację.

Podczas realizacji szlaku apoptozy, w komórkach dochodzi do wielu istotnych i charakterystycznych dla tego procesu zmian strukturalnych i funkcjonalnych. W komórce wchodzącej na szlak PCD ma miejsce m.in. znaczny ubytek elektrolitów i wody, prowadząc do jej obkurczenia i zwiększenia gęstości. W początkowym stadium apoptozy dochodzi do kondensacji chromatyny i jej marginalizacji. W miarę upływu czasu postępuje również degradacja DNA. Odpowiednia identyfikacja oraz pomiar molekularnych zdarzeń realizowanych w trakcie apoptotycznej śmierci pozwala na efektywne określenie mechanizmów działania poszczególnych związków o charakterze przeciwnowotworowym. W niniejszej pracy w celu identyfikacji PCD indukowanej przez poszczególne metaloorganiczne pochodne, zastosowano metody mikroskopii fluorescencyjnej (podwójne barwienie) oraz mikropłytkowe metody spektrofluorymetryczne (poziom aktywności kaspaz-3, -8 i -9 oraz zmiany zachodzące w mitochondriach poprzez monitorowanie zmian potencjału błony mitochondrialnej).

#### *Flawonoidowe pochodne ferrocenyłowe*

Ze względu na stosunkowo niską aktywność antyproliferacyjną badanej grupy pochodnych metaloorganicznych wobec komórek nowotworowych do dalszych badań stosowano jedynie najbardziej wrażliwą linię – CCRF-CEM. Mikroskopowa analiza procesu apoptozy ograniczona była wyłącznie do analizy jakościowej wspomnianego procesu.

Po 24-godzinnej inkubacji komórek białaczkowych CCRF-CEM z analizowanymi pochodnymi metaloorganicznymi (100  $\mu\text{mol/L}$ ) obserwowano wzrost odsetka komórek apoptotycznych. Istotnym jest również fakt pojawienia się w całkowitej populacji dużej liczby komórek nekrotycznych (zwłaszcza w przypadku związków **4** oraz **6**). Ze względu na stan zapalny oraz szeregu niekontrolowanych procesów biochemicznych, które towarzyszą tej formie śmierci komórkowej, jest ona niekorzystna dla selektywnego działania potencjalnych chemioterapeutyków.

W komórkach linii CCRF-CEM obserwowano również morfologiczne zmiany, charakterystyczne dla procesu programowanej śmierci komórki – obkurczenie komórki, kondensacja i fragmentacja chromatyny i jądra komórkowego. Zmiany te występowały jedynie w przypadku trzech pochodnych – **5**, **6** i **7**. Zastosowanie najbardziej aktywnej cytotoksycznie pochodnej **4** – nie powodowało tak widocznych zmian strukturalnych. Nie obserwowano zatem zależności pomiędzy cytotoksycznymi właściwościami flawonowych pochodnych metaloorganicznych, a poziomem ich oddziaływania na morfologię i strukturę komórki nowotworowej. Uzyskane wyniki pozostają w pewnym stopniu zgodne z wynikami otrzymanymi przez zespół badawczy Hillard i wsp. (Tiwari i wsp., 2011; Monserrat i wsp., 2013).

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, iż apoptoza oraz nekroza indukowane przez analizowane flawonowe pochodne metaloorganiczne przyczyniają się do cytotoksycznych i antyproliferacyjnych właściwości tych związków wobec nowotworowych komórek linii CCRF-CEM. Należy jednak podkreślić, że przeprowadzone badania mają charakter wstępny i wymagają dalszej weryfikacji.

#### *Pochodne ferrocenyłowe zawierające atom kobaltowy*

Mikroskopowa analiza komórek HepG2, CCRF-CEM oraz MCF-7 traktowanych ferrocenyłowymi pochodnymi zawierającymi kobalt wykazała, że związki te zdolne są do indukowania apoptotycznej śmierci komórek nowotworowych. Obserwowano charakterystyczne dla tego procesu zmiany morfologiczne takie jak marginalizacja i kondensacja chromatyny, formowanie mostków cytoplazmatycznych oraz wakuolizacja cytoplazmy. Po 24-godzinnej inkubacji komórek ze związkami, w całkowitej populacji obecna była przede wszystkim frakcja komórek wczesno-apoptotycznych. Badane pochodne indukowały również nekrozę. Zastosowanie 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej powodowało wzrost zarówno frakcji komórek apoptotycznych jak i nekrotycznych.

Udział reaktywnych form tlenu w kształtowaniu właściwości antyproliferacyjnych (w tym wypadku proapoptotycznych) związków metaloorganicznych został ponownie potwierdzony w niniejszym eksperymencie. Godzinna preinkubacja komórek z przeciwutleniaczami NAC lub witaminą C, powodowała istotny spadek odsetka komórek apoptotycznych.

W piśmiennictwie naukowym jest niewiele informacji na temat molekularnych mechanizmów aktywności biologicznej ferrocenyłowych pochodnych, zawierających kobalt. Coraz częściej jednak w chemii biometaloorganicznej uwaga naukowców skierowana jest na syntezę nowych związków, zawierających w swojej strukturze wspomniany metal oraz na wynikające z jego obecności właściwości biologicznie (Munteanu C., Suntharalingam K., 2015; Heffern i wsp., 2013). Gong i wsp. (Gong i wsp., 2015). Wykazano, że związki metaloorganiczne, zawierające atom kobaltu, są cytotoksyczne dla komórek nowotworowych HeLa. Generowanie RFT, zależne od funkcjonowania badanych pochodnych kobaltowych, wpływało na indukcję apoptozy komórek, uszkodzeń DNA, jak również na blokadę cyklu komórkowego. Dane te korespondują z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy doktorskiej.

Sergeant i wsp. (2008) zwracają natomiast uwagę na istotne zagadnienie możliwych biologicznych szlaków reakcji realizowanych przy udziale ugrupowania  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$  i zależnych od jego funkcjonowania. Naukowcy podkreślają, że ciągle jest bardzo niewiele informacji na temat losów cząsteczki związku metaloorganicznego w komórce, jej metabolizmu i możliwych celów działania. Prawdopodobnym jest, iż głównym miejscem molekularnej aktywności  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$  jest DNA, a ugrupowanie chemiczne nadawać może całej cząsteczce właściwości genotoksyczne. Hipoteza ta znajduje potwierdzenie w kometowym teście genotoksyczności analizowanych ferrocenyłowych pochodnych.

#### *Pochodna rutenu (DiRu-1)*

Proces apoptotycznej śmierci komórek nowotworowych uważany jest za jeden z głównych mechanizmów aktywności metaloorganicznych kompleksów. Wykazano, iż pochodne rutenu przejawiają różne formy molekularnej aktywności, zależnej od ich akumulacji w organellach komórkowych (Romero-Canelon i wsp., 2013). Proces ten jest ściśle skorelowany z budową chemiczną związku. Związki rutenu poprzez oddziaływanie z receptorem transferyny zdolne są do wnikania wewnątrz komórki na drodze endocytozy, gdzie następnie ulegają translokacji z lizosomów do mitochondriów (Zhao i wsp., 2014). Mitochondria uważane są za główny cel molekularnej aktywności związków rutenu,



a znaczna większość pochodnych rutenu zdolna jest do indukcji apoptozy na szlaku wewnętrznym (mitochondrialnym) (Zhao i wsp., 2014; Li i wsp., 2012).

Wyniki, uzyskane w pracy doktorskiej znalazły potwierdzenie w pracach innych autorów. Wykazano bowiem, iż aktywność cytotoksyczna badanej pochodnej metaloorganicznej jest związana z jej zdolnością do indukcji PCD komórek nowotworowych. Należy jednak podkreślić iż, oprócz apoptotycznej śmierci komórki, pożądanej z punktu widzenia skutecznego chemioterapeutyku, wykazano również duży odsetek komórek nekrotycznych.

Proces apoptozy przebiegał przy udziale mitochondriów i kaspaz, a więc realizowany był na szlaku wewnętrznym. Wyniki te potwierdzają badania innych autorów, które wskazują, że pochodne rutenu aktywują kluczowe enzymy uczestniczące w procesie apoptotycznym – kaspazy-8, -9 i -3 (Zhang i wsp., 2011) oraz regulują ekspresję białek rodziny Bcl-2 na korzyść zwiększenia aktywności ich propapoptycznych przedstawicieli – Bax, Bak, Bad oraz Bim (Jiang i wsp., 2014). Analogiczne wyniki uzyskał również inny zespół naukowców (Zhao i wsp., 2014), który wykazał, iż pochodne rutenu powodowały dysfunkcję mitochondriów komórek MCF-7, prowadzącą do indukcji PCD na szlaku mitochondrialnym. W komórkach MCF-7, traktowanych pochodnymi rutenu obserwowano supresję ekspresji białek antyapoptycznych przy jednoczesnym wzroście aktywności ich partnerów, promujących PCD (Bax oraz Bad). Zasadnym wydaje się więc zbadanie wpływu analizowanej w niniejszej pracy pochodnej rutenowej na aktywność białek rodziny Bcl-2. Na podstawie analizy mikroskopowej komórek barwionych oranżem akrydynowym stwierdzono obecność fagosomów oraz obecność komórek-olbrzymów z licznymi wypustkami, sugerujących indukcję odpowiednio autofagii i katastrofę mitotyczną przez pochodną Di-Ru-1.

#### *Wpływ metaloorganicznych pochodnych na potencjał mitochondrialny*

Ze względu na różnorodne funkcje pełnione w naszym organizmie, mitochondria określane są jako „fabryka życia i śmierci”. Z jednej strony biorą one udział w kluczowym dla zachowania homeostazy energetycznej procesie produkcji energii w postaci ATP, z drugiej strony natomiast stanowią główny rezerwuar szeregu białek regulatorowych i wykonawczych wewnętrznego szlaku procesu apoptozy. W trakcie realizacji procesu PCD, przy udziale białek rodziny Bcl-2 (proapoptycznych przedstawicieli Bax oraz Bak) dochodzi do zmian potencjału błony mitochondrialnej, jej permeabilizacji i uwolnienia do cytosolu komórki m.in. cytochromu c. Uważa się, iż zmiana potencjału mitochondrialnego jest nieodwracalnym etapem PCD, po którym komórka dostaje jednoznaczny sygnał do wejścia na drogę apoptozy (Landes T., Martinou J., 2011; Dave i wsp., 2008). Przeprowadzona analiza zmian potencjału mitochondrialnego komórek HepG2 eksponowanych na działanie ferrocenylowych pochodnych z wykorzystaniem fluorescencyjnej sondy JC-1 pozwoliła potwierdzić indukcję apoptozy przez te związki na szlaku mitochondrialnym.

#### *Pochodne kwasu akroleinowego oraz azaferroceny*

Wszystkie analizowane ferroceny (**15**, **15Cl** oraz **12a**) powodowały zmiany potencjału mitochondrialnego komórek HepG2. Poziom oraz kinetyka zmian  $\Delta\Psi_m$  były skorelowane z czasem ekspozycji komórek na działanie pochodnych ferrocenylowych, ich budową oraz stężeniem. Zmiany  $\Delta\Psi_m$ , wywołane przez badane związki były odwracalne, przede wszystkim dla najkrótszego czasu inkubacji (0,5 godz.) oraz stężenia  $IC_{50}$ . Komórki, traktowane przez 0,5 godz. stężeniem  $IC_{50}$  związków były zdolne do całkowitej regeneracji swojego potencjału (repolaryzacja) w trakcie trwania hodowli poinkubacyjnej. Zastosowanie dłuższego czasu inkubacji (3 godz.) oraz stężenia  $IC_{90}$  zwiększało proapoptotyczne działanie metaloorganicznych pochodnych, powodując większy i nieodwracalny spadek  $\Delta\Psi_m$ .

Uzyskane wyniki wskazują na proapoptotyczne właściwości badanej grupy ferrocenylowych pochodnych, które prawdopodobnie realizowane są głównie na szlaku mitochondrialnym.

#### *Pochodna dirutenu-1 (DiRu-1)*

Podczas indukcji procesu apoptozy w komórce zachodzi wiele zmian biochemicznych, a jedną z najszybszych jej odpowiedzi na bodźce proapoptotyczne jest zaburzenie potencjału błony mitochondrialnej.

W wyniku działania **DiRu-1** na komórki MCF-7 obserwowano zaburzenia  $\Delta\Psi_m$ , przejawiające się znacznym (ok. 42%) wzrostem w ciągu pierwszych 15 min. hodowli poinkubacyjnej (hiperpolaryzacja), a następnie szybkim spadkiem (ok. 25%) poniżej wartości dla komórek kontrolnych (stan depolaryzacji). Zmiany te były najbardziej widoczne w komórkach traktowanych wysokimi stężeniami **DiRu-1** (77 nmol/L oraz 154 nmol/L). Podczas dalszych 150 min pomiaru, komórki nowotworowe zdolne były do regeneracji swojego  $\Delta\Psi_m$ .

Uzyskane wyniki pozostają zgodne z wcześniejszymi analizami właściwości proapoptotycznych pochodnej **DiRu-1**, jak również najnowszymi badaniami w tym zakresie. Wiele pochodnych rutenu wykazuje właściwości cytotoksyczne względem różnych typów komórek nowotworowych, gdzie głównym miejscem ich aktywności są mitochondria i wynikająca z tego aktywacja kaspaz (Schatzschneider i wsp., 2008).

Uważa się, iż zmiana  $\Delta\Psi_m$  jest nieodwracalnym etapem szlaku PCD, po którym następuje aktywacja kaspaz i uruchomienie złożonej kaskady procesów związanych z PCD. Dysfunkcja mitochondriów może indukować działanie wielu czynników apoptotycznych, takich jak cytochrom c, który uwalniany jest z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytosolu, gdzie wchodzi w interakcję z wieloma związkami o charakterze promującym PCD, uruchamiając tym samym szlak biochemicznych reakcji, prowadzący do altruistycznej śmierci komórki (Han i wsp., 2014).

#### **Zaburzenia cyklu komórkowego**

Prawidłowy rozwój i wzrost organizmów eukariotycznych oraz regeneracja uszkodzonych tkanek i narządów możliwa jest dzięki sprawnie funkcjonującym mechanizmom cyklu komórkowego. Ten złożony proces biochemiczny składa się z ciągu ściśle kontrolowanych i uporządkowanych reakcji molekularnych, w których zaangażowane jest bardzo wiele białek regulatorowych. Złożona sieć interakcji, jakie zachodzą pomiędzy białkami metabolizmu, szlakami sygnalizacyjnymi, i mechanizmami kontroli podziałów

komórkowych umożliwia namnażanie komórek wyłącznie w odpowiednich warunkach, w odpowiedzi na swoiste bodźce do podziału. Tak restrykcyjna molekularna kontrola podziałów zapewnia więc m.in. uniknięcie namnażania komórek z uszkodzonym DNA, z drugiej jednak strony, może być również główną przyczyną niekontrolowanych podziałów komórek nowotworowych, skutkujących rozwojem nowotworu. W wyniku mutacji genów kodujących białka o charakterze proapoptotycznym/antyproliferacyjnym oraz polipeptydów promujących podziały komórek dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy proliferacją, a śmiercią. Komórki nowotworowe wyłamują się więc spod restrykcyjnych punktów kontrolnych cyklu komórkowego i unikając programowanej śmierci namnażają się w sposób niekontrolowany.

W projektowaniu chemicznym potencjalnych chemioterapeutyków poszukuje się związków, które z dużą wydajnością i selektywnością powodować będą zahamowanie cyklu podziałowego komórek nowotworowych. Zahamowanie cyklu pod wpływem tych związków może odbywać się w sposób bezpośredni poprzez interakcję z białkami zaangażowanymi w ten proces i zahamowanie ich aktywności. Drugą drogą jest oddziaływanie pośrednie na podziały komórek poprzez właściwości genotoksyczne lub prooksydacyjne potencjalnych chemioterapeutyków (Moralli i wsp., 2013).

Cytometryczna analiza cyklu podziałowego komórek nowotworowych, eksponowanych na działanie badanych metaloorganicznych pochodnych, pozwoliła stwierdzić, czy wykazują one właściwości cytostatyczne, powodując tym samym zatrzymanie proliferacji komórek nowotworowych. Badania w tym zakresie przeprowadzono na dwóch grupach ferrocenylowych cząsteczek – zawierających kobalt lub złoto.

#### *Pochodne ferrocenylowe zawierające atom kobaltu*

Uzyskane wyniki wskazują, iż badana grupa metaloorganicznych pochodnych charakteryzuje się właściwościami cytostatycznymi. W komórkach wszystkich badanych linii (MCF-7, CCRF-CEM, HepG2) obserwowano zaburzenia cyklu podziałowego. Oba zastosowane ferroceny powodowały blokadę cyklu w punkcie kontrolnym G2/M. Procent komórek nowotworowych w poszczególnych fazach cyklu, oceniany na podstawie zawartości DNA skorelowana była z budową chemiczną stosowanej pochodnej, jak również z czasem hodowli poinkubacyjnej. W przypadku 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej obserwowano spadek frakcji komórek w fazie G2/M (wyjątek stanowi linia MCF-7 traktowana związkiem **11**). Dane te świadczą o sprawnych systemach naprawczych DNA w komórkach nowotworowych, dzięki którym część uszkodzeń materiału genetycznego została efektywnie naprawiona.

W ostatnim okresie niezależne zespoły badawcze z Chin (Miao i wsp., 2011, Shen i wsp., 2013) wykazały, iż ferrocenylowe koniugaty połączone ze zmodyfikowanym pierścieniem tiazolidynowym lub benzodiazepiny powodują blokadę cyklu komórkowego ludzkich komórek nowotworowych HT1080 oraz A549 w fazie G1. Zahamowanie podziałów komórkowych skorelowane było z uruchomieniem szlaku apoptotycznej śmierci tych komórek, o czym świadczył m.in. wzrost ekspresji proapoptotycznego białka Bax, przy jednoczesnym spadku aktywności jego antyapoptotycznego „partnera” Bcl-2. Również ferroceny skoniugowane z naturalnie występującymi związkami (aminokwasy lub

dipeptydy) zdolne były do zahamowania cyklu komórkowego nowotworu płuc H1299 w fazie G2/M (Corry i wsp., 2009). Dane te świadczą o dużym cytostatycznym potencjale ferrocenyłowych pochodnych.

#### *Metaloorganiczne kompleksy alkilowe zawierające w strukturze pierścień chromanowy oraz atom złota*

W przypadku tej grupy ferrocenyłowych pochodnych, nie zanotowano tak dużych, zmian w cyklu podziałowym komórek nowotworowych (MCF-7, MDA-MB-231, CCRF-CEM, HepG2) eksponowanych na działanie tych związków. Jedynie w przypadku CCRF-CEM oraz MCF-7 obserwowano nieznaczną inhibicję cyklu podziałowego, skutkującą procentowym wzrostem frakcji komórek w punkcie kontrolnym G2/M. W przypadku komórek linii HepG2 oraz MDA-MB-231 analizowane pochodne metaloorganiczne nie wykazywały cytostatycznych właściwości. Cytometryczna analiza wykazała, iż badane kompleksy alkilowe, zawierające w swej strukturze złoto powodowały wzrost frakcji hipodiploidalnych komórek apoptotycznych z uszkodzonym DNA, określanej jako sub-G1. Dane te pozostają więc w ścisłej korelacji z wcześniej przeprowadzoną analizą genotoksycznych właściwości opisywanych metaloorganicznych pochodnych. Ponadto potwierdzają również ich proapoptotyczne właściwości, które badano przez pomiar aktywności kaspaz 8, 9 oraz 3. Zdolność ferrocenyłowych cząsteczek do indukcji PCD w komórkach nowotworowych zostały również potwierdzone w cytometrycznej analizie cyklu komórkowego wykonanej przez zespół Wanga (Miao i wsp., 2011), która m.in. wykazała wzrost frakcji sub-G1.

#### *Pochodna dirutenu-1 (DiRu-1)*

Zahamowanie niekontrolowanych podziałów komórek nowotworowych poprzez blokadę ich cyklu komórkowego uważana jest za jeden z najważniejszych mechanizmów cytotoksycznego i cytostatycznego działania wielu biologicznie aktywnych związków przeciwnowotworowych oraz leków chemioterapeutycznych.

Analizowany kompleks DiRu-1 powodował zatrzymanie cyklu podziałowego komórek linii MCF-7 w punkcie kontrolnym fazy G2/M, jednak tylko w przypadku najwyższego z zastosowanych stężeń (154 nmol/L). Stosunkowo niewielka blokada cyklu podziałowego komórek MCF-7 poprzedzona była przejściowym zahamowaniem ich proliferacji w fazie S. Wyniki te sugerują, że zmiany te spowodowane są głównie przez apoptotyczną fragmentację DNA, gdyż efekty genotoksyczne obserwowane są na ogół przy znacznie niższych stężeniach. Przypuszczenia te potwierdza znaczny spadek ilości uszkodzonego DNA w komórkach preinkubowanych z inhibitorem kaspaz oraz progresywny wzrost populacji komórek we frakcji sub-G1, co świadczy o proapoptotycznych właściwościach badanego związku. Duży udział w generowaniu uszkodzeń DNA mają również RFT generowane przez ten związek, gdyż zmniejszenie uszkodzeń DNA obserwowano także po preinkubacji komórek z antyoksydantami.

Otrzymane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, wskazującymi, że u podstaw aktywności przeciwnowotworowej pochodnych rutenu leży ich zdolność do indukcji apoptozy, uszkodzeń DNA oraz blokady cyklu podziałowego. Wykazano, iż związki rutenu

mogą hamować podziały komórek w różnych fazach cyklu: G0/G1, S lub G2/M (Huang i wsp., 2011). Omówione powyżej wyniki otrzymane po cytometrycznej analizie cyklu podziałowego komórek MCF-7, eksponowanych na działanie dirutenu-1 pozostają w korelacji z wynikami innych autorów. Są one zgodne z wynikami analizy uszkodzeń DNA spowodowane przez **DiRu-1**, które mogą być odpowiedzialne za zaburzenia i zahamowanie cyklu komórkowego. Po dłuższym czasie hodowli poinkubacyjnej (48 godz.) część komórek, która nie mogła skutecznie naprawić wszystkich uszkodzeń DNA, pozostawała w punkcie kontrolnym G2/M cyklu komórkowego, czego wynikiem było zahamowanie ich proliferacji.

### **Ocena aktywności kaspaz 8, 9 i 3**

*Metaloorganiczne kompleksy alkilowe, zawierające w swojej strukturze pierścień chromanowy oraz atom złota*

Kolejnym istotnym zadaniem badawczym, jakie podjęto w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza pro-apoptotycznych właściwości pochodnych ferrocenyłowych zawierających złoto. W tym celu, w komórkach nowotworowych (MCF-7, MDA-MB-231, CCRF-CEM, HepG2) traktowanych analizowanymi związkami, dokonano pomiaru aktywności trzech kluczowych dla procesu PCD proteaz cysteinowych – kaspaz 8, 9 oraz 3.

Enzymy te odgrywają kluczową rolę zarówno w fazie inicjacji jak i w fazie efektorowej PCD. W komórkach nieobjętych PCD, proteazy te występują w postaci nieczynnych zymogenów. Sygnały proapoptotyczne, powodują ich natychmiastową aktywację. Do kaspaz inicjatorowych, które biorą udział w początkowych etapach PCD, należą kaspaza 8 (aktywowana w PCD przebiegającej na szlaku receptorowym) oraz kaspaza 9 (biorąca udział w PCD indukowanej na szlaku mitochondrialnym). Kaspaza 3, natomiast, należy do grupy kaspaz efektorowych, których rolą jest realizacja ostatnich, nieodwracalnych etapów altruistycznej śmierci komórki – np. (Li i Yan, 2008, McIlwain i wsp., 2013).

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, iż badane ferrocenyłowe kompleksy ze złotem, po 24 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi powodowały wzrost aktywności dwóch kaspaz – 3 oraz 9. Nie stwierdzono natomiast aktywacji kaspazy inicjatorowej-8, uczestniczącej w indukcji apoptozy na szlaku receptorowym (zewnętrznym). Wzrost aktywności kaspazy-9 był większy niż wzrost aktywności kaspazy-3. Ze względu na ograniczoną dostępność pochodnych ferrocenyłowych, zawierających złoto, możliwe było wykonanie analizy aktywacji tych enzymów tylko bezpośrednio po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji komórek ze związkami. Prawdopodobnym jest więc fakt, iż stosunkowo mały wzrost aktywności kaspazy-3 obserwowany w komórkach nowotworowych, po ich ekspozycji na badane pochodne, może być spowodowany zbyt krótkim okresem pomiędzy inkubacją pomiarem. Należy pamiętać, iż kaspaza-3, jako kaspaza efektorowa szlaku PCD, aktywowana jest znacznie później, niż inicjatorowe

proteazy cysteinowe – kaspazy-8 i -9. Znaczący jest jednak wniosek, iż badane metaloorganiczne kompleksy złota indukowały apoptozę komórek nowotworowych wyłącznie na szlaku mitochondrialnym (wewnętrznym) z udziałem kaspaz. Ten rodzaj śmierci apoptotycznej uruchamiany jest na skutek pojawienia się m.in. uszkodzeń DNA, stresu oksydacyjnego (RFT), czy też aktywności większości komercyjnie stosowanych chemioterapeutyków (McIlwain i wsp., 2013). Analiza aktywności kaspaz znajduje przy udziale tych czynników znajduje potwierdzenie we wcześniej przeprowadzonych eksperymentach dotyczących genotoksyczności i właściwości pro-oksydacyjnych opisywanej grupy metaloorganicznych pochodnych.

Biologiczna analiza ferrocenylowych kompleksów alkinylowych złota (I), opisywana w dostępnej literaturze, przeprowadzana jest w mocno ograniczonym zakresie i dotyczy głównie ich cytotoksycznych właściwości (Balasingham i wsp., 2012; Meyer i wsp., 2013; Chui i wsp., 2009; Schuh i wsp., 2009; Vergara i wsp., 2010; Meyer i wsp., 2012; Stockland i wsp., 2006). Warto podkreślić, że zarówno związki ferrocenylowe, jak i metaloorganiczne kompleksy złota zdolne są do uruchomienia apoptozy komórek nowotworowych na szlaku mitochondrialnym poprzez aktywację kaspaz (Pereira i wsp., 2015; Rigobello i wsp., 2008; Rackham i wsp., 2007). Zależnej od działania metaloorganicznych kompleksów aktywacji proteaz cysteinowych, towarzyszyły również inne procesy lub zdarzenia charakterystyczne dla procesu PCD, przebiegającego na szlaku mitochondrialnym (wewnętrznym). Obserwowano uwolnienie cytochromu C, spadek potencjału mitochondrialnego, czy zmiany ekspresji genów, kodujących białka pro-apoptotyczne z rodziny Bcl-2.

#### *Pochodna dirutenu-1 (DiRu-1)*

Pochodna DiRu-1, podobnie jak związki metaloorganiczne zawierające złoto, powodowała aktywację kaspaz 8, 9 i 3, których wzrost aktywności był zależny od stężenia związku. Największe zmiany (ok. 2-3-krotny wzrost względem kontroli) zanotowano dla kaspazy 3. Wzrost aktywności kaspaz 8 i 9 był porównywalny, ale znacznie mniejszy (zawarty w przedziale 11-24% w zależności od zastosowanego stężenia analizowanej pochodnej rutenu. Wyniki te sugerują, że **DiRu-1** może indukować apoptozę komórek nowotworowych zarówno na szlaku mitochondrialnym (wewnętrznym) jaki receptorowym (zewnętrznym). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z wynikami innych autorów, którzy wykazali, że pochodne rutenu Ru(II) i Ru(III) mogą indukować PCD na obu szlakach – zewnętrznym i wewnętrznym, m.in. w komórkach A375 czerniaka (Murray i wsp., 2016; Giannini i wsp., 2013; 2015).

#### *Analiza aktywności reduktazy tioredoksyny (TrxR)*

*Metaloorganiczne kompleksy alkilowe zawierające w swojej strukturze pierścien chromanowy oraz atom złota*

Układ tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny odgrywa kluczową rolę w regulacji wewnątrzkomórkowej gospodarki redoks, warunkując tym samym jej homeostazę. W skład tego układu wchodzi małe białko tioredoksyna, zredukowana forma ufosforylowanego dinukleotydu adeninowego NADPH oraz homodimeryczny enzym

reduktaza tioredoksyny (TrxR), która kontroluje potencjał redoks tioredoksyny. Ostatnio dużą uwagę poświęca się blokowaniu aktywności tego enzymu przez związki metaloorganiczne, jako jednej z głównych dróg ich przeciwnowotworowego działania. Uważa się, iż inhibicja enzymu skorelowana jest z hamowaniem proliferacji komórek nowotworowych (Bindoli i wsp., 2009; Lu i Holmgren 2014; Gandin i Fernandes, 2015). Szczególne nadzieje pokładane są w związkach zawierających w swojej strukturze atom złota, dla których układ TrxR jest głównym celem działania (Cisnetti i wsp., 2013; Hickey i wsp., 2008; Barnard i Berners-Price, 2007; Meyer i wsp., 2013; Cheng i wsp., 2014; Liu i Gust, 2013; Gautier i Cisnetti, 2011; Zou i wsp., 2015).

Przeprowadzone w pracy badania wykazały, iż wszystkie analizowane pochodne metaloorganiczne, zawierające złoto hamowały w różnym stopniu aktywność TrxR w komórkach nowotworowych linii CCRF-CEM, MCF-7, MDA-MB-231 oraz HepG2. Procent hamowania aktywności enzymu zależny był od rodzaju linii komórkowej i zawarty był w przedziale 20%-70%. Największy spadek aktywności enzymu stwierdzono w komórkach MCF-7 i MDA-MB-231 raka piersi traktowanych pochodnymi o symbolach **4** i **6**. Większą aktywność hamującą wykazywała pochodna **4**. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w danych literaturowych (Gandin i Fernandes, 2015; Cisnetti i wsp., 2013; Hickey i wsp., 2008; Meyer i wsp., 2013; Barnard i wsp., 2007). Należy jednak podkreślić, że cytotoksyczność metaloorganicznych pochodnych złota badanych w niniejszej pracy nie pozostawała w ścisłej korelacji z ich oddziaływaniem na aktywność TrxR. Wysoka cytotoksyczność poszczególnych koniugatów, nie w każdym przypadku korespondowała z równie efektywnym hamowaniem aktywności TrxR. Zasadnym jest zatem przeprowadzenie kolejnych eksperymentów, które pozwolą lepiej poznać i ustalić molekularne mechanizmy aktywności analizowanych pochodnych w tym zakresie.

Dostępne dane literaturowe wskazują, iż głównym celem molekularnej aktywności związków złota są mitochondria oraz TrxR. Dodatnio naładowane koniugaty złota zdolne są do efektywnej penetracji błon mitochondrialnych, które charakteryzują się ujemnym potencjałem  $\Delta\Psi_m$ . Ponadto, wykazano, iż oddziaływanie opisywanych kompleksów metaloorganicznych zarówno na mitochondria, jak i na aktywność TrxR pociąga za sobą istotne konsekwencje. Obserwowano zaburzenia gospodarki redoks, wzrost ilości RFT, jak również dysfunkcje mitochondriów, przejawiającą się m.in. spadkiem potencjału transbłonowego ( $\Delta\Psi_m$ ), które prowadzą do apoptozy (Holenya i wsp., 2014; Pratesi i wsp., 2014). Podobne wyniki uzyskano w niniejszej pracy.

Podsumowując, otrzymane w pracy wyniki potwierdziły atrakcyjne przeciwnowotworowe właściwości ferrocenylowych pochodnych. Analizy ich cytotoksycznych, antyproliferacyjnych, proapoptotycznych i genotoksycznych właściwości wskazują na duży potencjał analizowanych koniugatów jako nowej klasy potencjalnych chemioterapeutyków. Każda z badanych grup związków wykazywała właściwości cytotoksyczne względem komórek nowotworowych. Efektywność aktywności przeciwnowotworowej skorelowana była przede wszystkim z budową chemiczną danego związku. Najbardziej reaktywne okazały się ferrocenylowe kompleksy złota i pochodna DiRu-1 rutenu, natomiast najmniejszą aktywność wykazywały metaloorganiczne koniugaty flawonoidów. Analizowane związki wykazywały właściwości apoptogenne, indukując PCD komórek nowotworowych. Proces ten przebiegał głównie na szlaku wewnętrznym

(mitochondrialnym) przy udziale kaspaz. Pochodna rutenu natomiast indukowała apoptozę zarówno na szlaku mitochondrialnym jak i zewnętrznym. Silne, prooksydacyjne działanie ferrocenów, spowodowane obecnością Fe (II) wpływało znacząco na ich cytotoksyczność, gdyż preinkubacja komórek z antyoksydantami NACi  $\alpha$ -Tocoferolem znacząco redukowała ich cytotoksyczność. Podobny efekt antyoksydantów zaobserwowano w komórkach MCF-7 traktowanych pochodną rutenu. Stres oksydacyjny, indukowany przez badane pochodne metaloorganiczne prawdopodobnie był także odpowiedzialny za uszkodzenia DNA, których ilość ulegała obniżeniu po preinkubacji z antyoksydantami. Podobny efekt obserwowano po preinkubacji komórek z inhibitorem proteaz, co sugeruje, że znaczna część tych uszkodzeń może być spowodowana przez apoptotyczną fragmentację DNA. Zaburzenia struktury materiału genetycznego skorelowane było z hamowaniem cyklu podziałowego komórek nowotworowych. Wyniki te wskazują na cytostatyczny potencjał ferrocenylowych koniugatów. Spośród analizowanych w pracy pochodnych metaloorganicznych najbardziej obiecująca okazała się pochodną rutenu, która wykazywała wyższą cytotoksyczność od cisplatyny i szerokie spektrum aktywności molekularnej, prowadzącej do śmierci komórki nowotworowej zarówno na drodze apoptozy jak i katastrofy mitotycznej, procesy korzystne dla organizmu z uwagi na to, że nie powodują procesu zapalnego. Kompleks DiRu-1 indukowała również autofagię, która jest bardzo istotna dla niszczenia komórek nowotworowych opornych na indukcję apoptozy. Uzyskane wyniki stanowią solidną bazę informacji, która uzupełnia i poszerza dotychczasowy stan wiedzy na temat molekularnych podstaw aktywności przeciwnowotworowej pochodnych metaloorganicznych. Zrozumienie molekularnych szlaków odpowiedzialnych za aktywność przeciwnowotworową metaloorganicznych kompleksów ferrocenów oraz wzajemnych relacji na poziomie struktura-aktywność (SAR) ma zasadnicze znaczenie dla dalszego rozwoju chemii biometaloorganicznej oraz doskonalenia syntezy nowych związków o jeszcze lepszych właściwościach przeciwnowotworowych. Należy podkreślić, że realizacja kluczowego celu, jakim jest opracowanie nowych metaloorganicznych pochodnych, które w przyszłości mogłyby funkcjonować jako leki przeciwnowotworowe wymaga ciągłej i wnikliwej wielopoziomowej analizy ich biologicznej aktywności w badaniach podstawowych *in vitro*, badaniach przedklinicznych *in vivo* oraz badaniach klinicznych. Zasadnym wydaje się więc przeprowadzenie kolejnych badań z zakresu wpływu opisywanej grupy związków na ekspresję genów zaangażowanych w proces apoptozy, przebiegu przekazywania wewnątrzkomórkowego czy kontroli podziałów. Z drugiej strony konieczne jest również poszukiwanie w syntezach chemicznych takich rozwiązań strukturalnych, które zapewniłyby wysoką selektywność działania i aktywność biologiczną, z zachowaniem niskiej cytotoksyczności względem komórek prawidłowych.



## 13. WNIOSKI

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki wykazały, że w ludzkich komórkach nowotworowych (MCF-7, MDA-MB-231, HepG2, CCRF-CEM, A549) badane pochodne metaloorganiczne:

1. Charakteryzują się różnorodną aktywnością biologiczną, która uwarunkowana jest ich strukturą chemiczną, wykazując typową zależność SAR.
2. Wykazują działanie cytotoksyczne i cytostatyczne wobec komórek nowotworowych, a efektywność hamowania proliferacji komórek skorelowana jest z budową chemiczną związku oraz jego prooksydacyjnymi właściwościami.
3. Indukują apoptotyczną oraz nekrotyczną śmierć komórki, PCD realizowana jest na szlaku mitochondrialnym przy udziale kaspaz -9 i -3.
4. Powodują uszkodzenia materiału genetycznego, które skorelowane są z apoptotyczną fragmentacją DNA oraz zatrzymaniem cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2/M.
5. Hamują aktywność reduktazy tioredoksyny (TrxR), enzymu odgrywającego dużą rolę w regulacji proliferacji i migracji komórek oraz hamowaniu apoptozy na drodze regulacji procesów utleniania i redukcji wielu białek.
6. Spośród przebadanych w pracy doktorskiej nowozaprojektowanych związków metaloorganicznych najwyższą aktywność przeciwnowotworową, porównywalną lub nawet większą niż stosowana klinicznie cisplatyna, wykazuje pochodna rutenu ( $IC_{50}$  w zakresie stężeń nanomolowych). Powoduje ona śmierć komórki nowotworowej na drodze apoptozy, wspomaganej przez katastrofę mitotyczną i autofagię. Są to procesy korzystne dla organizmu, gdyż mogą niszczyć komórki nowotworowe, odporne na indukcję apoptozy i w odróżnieniu od nekrozy nie powodują procesu zapalnego.

## 14. STRESZCZENIE

W przedstawionej pracy doktorskiej pt. „Molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej nowych pochodnych metaloorganicznych” poddano biologicznej analizie cztery zróżnicowane pod względem strukturalnym grupy metaloorganicznych pochodnych ferrocenów oraz jedną pochodną rutenu.

Badano właściwości przeciwnowotworowe **17** związków:

- pochodnych akryloilferrocenów (związki **15** i **15Cl**),
- pochodnych azaferrocenów (związki **12** i **12a**),
- flawonoidowych pochodnych ferrocenylowych (związki **4**, **5**, **6** i **7**),
- pochodnych ferrocenylowych, zawierających atom kobaltu (związki **7**, **8**, **9**, **10** i **11**),
- kompleksów alkilowych, zawierających pierścień chromonowy oraz atom złota (związki **4**, **5** i **6**),
- pochodnej rutenu DiRu-1.

Głównym celem badań, była ocena profilu aktywności przeciwnowotworowej nowosyntetyzowanych i niebadanych dotychczas pochodnych metaloorganicznych oraz wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych związków.

Szczegółowe badania, wykonane w warunkach *in vitro*, miały na celu:

- 1) ocenę właściwości cytotoksycznych i cytostatycznych analizowanych pochodnych wobec wybranych linii ludzkich komórek nowotworowych
- 2) określenie rodzaju uszkodzeń komórek, ekspozowanych na działanie badanych związków (zmiany morfologii, błony komórkowej, jądra komórkowego, mitochondriów, chromatyny, DNA)
- 3) poznanie głównych mechanizmów molekularnych, odpowiedzialnych za aktywność przeciwnowotworową badanych związków.

Analizowano cytotoksyczne, cytostatyczne, pro-oksydacyjne, pro-apoptotyczne i genotoksyczne właściwości najbardziej aktywnych związków, wyselekcjonowanych na podstawie testów cytotoksyczności. Dodatkowo oznaczano wpływ wybranych związków na aktywność reduktazy tioredoksyny.

Badania wykonano na czterech adherentnych liniach komórek nowotworowych: estrogenozależnego gruczolakoraka piersi (MCF-7); potrójnie negatywnego gruczolakoraka piersi (MDA-MB-231); raka wątrobowokomórkowego (HepG2); niedrobnokomórkowego gluczolakoraka płuc (A549) oraz ostrej białaczki limfoblastycznej (CCRF-CEM).

Wykazano, że badane pochodne metaloorganiczne:

1. Charakteryzowały się różnorodną aktywnością biologiczną, zależną od ich struktury chemicznej wykazując typową zależność SAR.
2. Wykazywały działanie cytotoksyczne i cytostatyczne wobec komórek nowotworowych, a ich efektywność hamowania proliferacji komórek

nowotworowych skorelowana była ze strukturą chemiczną i prooksydacyjnymi danego związku.

3. Indukowały apoptotyczną śmierć komórek nowotworowych, realizowaną na szlaku mitochondrialnym przy udziale kaspazy.
4. Niektóre pochodne indukowały również nekrozę, katastrofę mitotyczną oraz autofagię.
5. Powodowały uszkodzenia materiału genetycznego, które skorelowane były z zatrzymaniem cyklu podziałowego w punkcie kontrolnym G2/M.
6. Hamowały aktywność reduktazy tioredoksyny (TrxR), odpowiedzialnej za homeostazę redoks i proliferację komórek.

Spośród analizowanych pochodnych metaloorganicznych najbardziej obiecująca okazała się pochodną rutenu (kompleks DiRu-1), która wykazywała wyższą cytotoksyczność od cisplatyny i szerokie spektrum aktywności molekularnej, prowadzącej do śmierci komórki nowotworowej zarówno na drodze apoptozy jak i katastrofy mitotycznej, procesy korzystne dla organizmu z uwagi na to, że nie powodują procesu zapalnego. Kompleks DiRu-1 indukował również autofagię, która jest bardzo istotna dla wyeliminowania komórek nowotworowych opornych na indukcję apoptozy. Uzyskane wyniki stanowią solidną bazę informacji, która uzupełnia i poszerza dotychczasowy stan wiedzy na temat molekularnych podstaw aktywności przeciwnowotworowej pochodnych metaloorganicznych. Badania te wymagają również równoległej, szczegółowej analizy toksyczności tych związków wobec komórek prawidłowych.

## 15. SUMMARY

In the presented dissertation "Molecular mechanisms of anti-tumor activity of new organometallic derivatives" four structurally different groups of organometallic derivatives of ferrocenes and one ruthenium derivative were subjected to biological analysis.

The anticancer properties of 17 different derivatives were investigated:

- Acryloicferrocenes (compounds 15 and 15Cl),
- Azaferrocenes (compounds 12, 12a),
- Ferrocenylvinyl flavones (compounds 4, 5, 6 and 7),
- Ferrocenyl and dicobalt hexacarbonyl chromones (compounds 4, 5, 6 and 7),
- Gold(I)-Alkynyl Chromones (compounds 7, 8, 9, 10 and 11),
- Ruthenium derivative (DiRU-1) derivative of ruthenium-1 diru.

The main aim of investigations was to evaluate the profile of antitumor activity of newly synthesized and previously untested organometallic derivatives and to select the most active compounds

Detailed studies *in vitro*, aimed at:

- 1) assessment of the cytotoxic and cytostatic properties of examined derivatives against selected human cancer cell lines
- 2) assessment of the type of cell damage after cell exposure to the investigated compounds (changes in cell morphology, cell plasma membrane, nucleus, mitochondria, chromatin, DNA)
- 3) investigation of the major molecular mechanisms responsible for the antitumor activity of investigated compounds.

Cytotoxic, cytostatic, pro-oxidative, pro-apoptotic and genotoxic properties of the most active compounds, selected on the basis of cytotoxicity assays were investigated. In addition, the effects of selected compounds on the activity of thioredoxin reductase were also evaluated.

The study was performed on four adherent human cancer cell lines: estrogen-dependent breast adenocarcinoma (MCF-7); triple negative breast adenocarcinoma (MDA-MB-231); hepatocellular carcinoma HepG2; non-small lung adenocarcinoma (A549) and CCRF-CEM acute lymphoblastic leukemia.

It has been shown that the organometallic derivatives tested:

The results obtained in the study showed that investigated organometallic derivatives:

1. were characterized by diverse biological activity, depending on their chemical structure.
2. showed cytotoxic and cytostatic activities against investigated cancer cells, and their efficiency in inhibiting cell proliferation was correlated with the chemical structure of the compounds and their respective pro-oxidative properties.
3. induced apoptotic cell death, realized on the mitochondrial pathway with the participation of caspases.
4. Some derivatives also induced necrosis, mitotic catastrophe and autophagy.

5. It caused damage to genetic material which was correlated with the G2 / M arrest of the cell cycle

inhibition of the cell cycle checkpoint in G2 / M phase.

6. inhibited the activity of thioredoxin reductase (TrxR), responsible for redox homeostasis and cell proliferation.

Obtained results provide a solid foundation for further, more detailed and comprehensive basic and preclinical research aimed at the potential use of the most active and promising derivatives with superior biological properties as a new effective chemotherapeutic agents for cancer treatment. These studies also require parallel, detailed analysis of toxicity toward normal cells.

## 16. LITERATURA

1. Abu-Surrach A. S., Kettunen M. (2006) Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. *Curr. Med. Chem.* 13: 1337-1357.
2. Acevedo-Morantes C. Y., Melendez E., Singh S., Ramirez-Vick J. E. (2012) Cytotoxicity and reactive oxygen species generated by ferrocenium and ferrocene on MCF7 and MCF10A cell lines. *J. Cancer Sci. Ther.* 4: 271-275.
3. Aderibigbe B. A., Jacques K. D., Neuse E. W. (2011) Polymeric Conjugates of Selected Aminoquinoline Derivatives as Potential Drug Adjuvants in Cancer Chemotherapy. *Inorg. Organomet. Polym.* 21: 336-345.
4. Ali S., Badshah A., Ali A., ud-Din I., Lal B., Khan M. (2013) Synthesis of 3-ferrocenylaniline: DNA interaction, antibacterial, and antifungal activity. *Med. Chem. Res.* 22: 3154-3159.
5. American Cancer Society. (2015) Cancer Society. Corporate Center: American Cancer Society Inc. 250 Williams Street, NW, Atlanta.
6. Anisomov V. N., Sikora E., Pawelec G. (2009) Relationships between cancer and aging: a multilevel approach. *Biogerontology* 10: 323-338.
7. Astruc D. (2007) Chapter 11: Metallocenes and sandwich complexes w: Organometallic chemistry and catalysis, Part III. Springer Berlin Heidelberg 251-288, 10.1007/978-3-540-46129-6\_13.
8. Auzias M., Therrien B., Suss-Fink G., Sytepnicka P., Ang W. H., Dyson P. (2008) Arene–ruthenium complexes with ferrocene-derived ligands: Synthesis and characterization of complexes of the type  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{NC}_5\text{H}_4\text{CH}_2\text{NHOC-C}_5\text{H}_4\text{FeC}_5\text{H}_5)\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{NC}_3\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{O}_2\text{C-C}_5\text{H}_4\text{FeC}_5\text{H}_5)\text{Cl}_2]$ . *Inorg. Chem.* 47: 578-383.
9. Babin V. N., Belusov Y. A., Borisov V. I., Gumenyuk V. V., Nekrasov Y. S., Ostrovskaya L. A., Sviridova I. K., Sergeeva N. S., Simenel A. A., Snegur L. V. (2014) Ferrocenes as potential anticancer drugs. Facts and hypotheses. *Russ. Chem. B.* 63: 2405-2422.
10. Balasingham R. G., Williams C. F., Mottram H. J., Coogan, M. P., Pope S. J. A. (2012) Gold(I) complexes derived from alkynyloxy-substituted anthraquinones: syntheses, luminescence, preliminary cytotoxicity, and cell imaging studies. *Organometallics* 31: 5835–5843.
11. Balcerczyk A., Soszynski M., Rybaczek D., Przygodzki T., Karowicz-Bilinska A., Maszewski J., Bartosz G. (2005) Induction of apoptosis and modulation of production of

reactive oxygen species in human endothelial cells by diphenyliodonium. *Biochemical Pharmacology* 69: 1263-1273.

12. Bandow J. E., Metzler-Nolte N. (2009) New ways of killing the beast: prospects for inorganic –organic hybrid nanomaterials as antibacterial agents. *Chem. Bio. Chem.* 10: 2847-2850.

13. Barnard P. J., Berners-Price B. S. (2007) Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coord. Chem. Rev.* 251: 1889-1902.

14. Barry N. P. E., Sadler P. J. (2013) *American Chemical Society.* 7: 5654-5659.

15. Bertrand B., Citta A., Franken I. L., Piequet M., Folda A., Scalcon V., Rigobello M. P., Le Gendre P., Casini A., Bodio E. (2015) Gold(I) NHC-based homo- and heterobimetallic complexes: synthesis, characterization and evaluation as potential anticancer agents. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20: 1005-1020.

16. Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C. & Miller, R. J. (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci.* 168: 1324-1326.

17. Bindoli A., Rigobello M. P., Scutari G., Gabbiani C., Casini A., Messori L. (2009) Thioredoxin reductase: a target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* 253: 1692-1707.

18. Biot C., Castro W., Botte C. Y., Navarro M. (2012) The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: implications for the mechanism of action. *Dalton Trans.* 41: 6335-6349.

19. Biot C., Chavain N., Dubar F., Pradines B., Trivelli X., Brocard J., Forfar I., Dive D. (2009) Structure-activity relationships of 4-N-substituted ferroquine analogues: time to re-evaluate the mechanism of action of ferroquine. *J. Organ. Chem.* 6: 845-854.

20. Biot C., Dive D. (2010) Bioorganometallic chemistry and malaria. *Top. Organomet. Chem.* 32: 155-193.

21. Biot C., Glorian G., Maciejewski L. A., Brocard J. S., Domarle O., Blampain G., Millet P., Georges A. J., Abessolo H., Dive D., Lebibi J. (1997) Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J. Med. Chem.* 40: 3715-2718.

22. Biot C., Nonsten F., Fraisse L., Ter-Minassian D., Khalife J., Dive D. (2011) The antimalarial ferroquine: from bench to clinic. *Parasite* 18: 207-214.

23. Biot C., Taramelli D., Forfar-Bares I., Maciejewski L. A., Boyce M., Nowogrocki G., Brocard J. S., Basilico N., Olliaro P., Egan T. J. (2005) Insights into the mechanism of action of Ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiparasitodal activity. *Mol. Pharm.* 2: 185-193.
24. Braga S. S., Silva A. M. S. (2013) A new age of iron: antitumoral ferrocenes. *Organometallics* 32: 5626-5639.
25. Brown R. W., Hyland C. J. (2015) Medicinal organometallic chemistry – an emerging strategy for the treatment of neglected tropical diseases. *Med. Chem. Comm.* 6: 1230-1243.
26. Bruijninx P. C. A., Sadler P. J. (2008) New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12: 197-206.
27. Bruno S. M., Fernandes J. A., Marques J., Neto S. C., Ribeiro-Claro P. J., Pillinger M., Amleida Paz F. A., Marques M. P. M., Braga S. S., Goncalves I. S. (2011) Structural Studies and Cytotoxicity of Trimethyl(ferrocenylmethyl)ammonium Iodide Encapsulated in  $\beta$ -Cyclodextrin. *Eur. J. Inorg. Chem.* 32: 4955-4963.
28. Buriez O., Heldt J. M., Labbe E., Vessieres A., Jaouen G., Amatore C. (2008) Reactivity and antiproliferative activity of ferrocenyl-tamoxifen adducts with cyclodextrins against hormone-independent breast-cancer cell lines. *Chemistry* 14: 8195-8203.
29. Bystrom L. M., Rivella S. (2015) Cancer cells with iron in the fire. *FRBM.* 79: 337-342.
30. Caldwell G., Meirim M. G., Neuse E. W., van Rensburg C. E. J. (1998) Antineoplastic activity of polyaspartamide-ferrocene conjugates. *Appl. Organomet. Chem.* 12: 793-799.
31. Chang E. L., Simmers C., Knight A. (2010) Cobalt complexes as antiviral and antibacterial agents. *Pharmaceuticals* 3: 1711-1728.
32. Chavain N., Vezin H., Dive D., Touati N., Paul J-F., Buisine E., Biot C. (2008) Investigation of the redox behaviour of ferroquine, a new antimalarial. *Mol. Pharmaceutics* 5: 710-716.
33. Chen J., Steven C., Rogers S. C., Kavdia M. (2013) Analysis of Kinetics of Dihydroethidium Fluorescence with Superoxide Using Xanthine Oxidase and Hypoxanthine. *Ann Biomed Eng.* 41: 327-337.
34. Chen T., Liu Y., Zheng W. J., Liu J., Wong Y. S. (2010) Ruthenium polypyridyl complexes that induce mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. *Inorg. Chem.* 49: 6366-6368.



35. Cheng X., Holenya P., Can S., Alborzinia H., Rubbiani R., Ott I., Wöfl S. (2014) A TrxR inhibiting gold (I) NHC complex induces apoptosis through ASK1-p38-MAPK signalling in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer*. 13: 221-236.
36. Chipuk J. E., Moldoveanu T., Llambi F., Parsons M. J., Green D. R. (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell*. 37: 299-310.
37. Chopra R., de Kock C., Smith P., Chibale K., Singh K. (2015) Ferrocene-pyrimidine conjugates: Synthesis, electrochemistry, physicochemical properties and antiplasmodial activities. *Eur. J. Med. Chem*. 100: 1-9.
38. Chui C-H., Wong R. S-M., Gambari R., Cheng G. Y-M., Yuen M. C-W., Chan K-W., Tong S-W., Tong F-Y., Lau F-Y., Lai P. B-S., Lam K-H., Ho C-L., Kan C-W., Leung K. S-Y., Wong W-Y. (2009) Antitumor activity of diethynylfluorene derivatives of gold(I). *Bioorg. Med. Chem*. 17: 7872-7877.
39. Cisnetti F., Gautier A. (2013) Metal/N-Heterocyclic Carbene Complexes: Opportunities for the Development of Anticancer Metallodrugs. *Angew. Chem. Int. Ed*. 52: 11976-11978.
40. Collins A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 26: 249-261.
41. Cooper D. C., Yennie C. J., Morin J. B., Delaney S., Suggs J. W. (2011) Development of a DNA-damaging ferrocene amino acid. *J. Organomet. Chem*. 696: 3058-3061.
42. Corry A. J., Goel A., Alley S. R., Kelly P. N., O'Sullivan D., Savage D., Kenny P. T. M. (2007) N-ortho-Ferrocenyl benzoyl dipeptide esters: Synthesis, structural characterization and in vitro anti-cancer activity of N-{ortho-(ferrocenyl)benzoyl}-glycine-l-alanine ethyl ester and N-{ortho-(ferrocenyl)benzoyl}-l-alanine-glycine ethyl ester. *J. Organomet. Chem*. 692: 1405-1410.
43. Corry A. J., O'Donovan N., Mooney A., O'Sullivan D., Rai D. K., Kenny P. T. M. (2009) Synthesis, structural characterization, in vitro anti-proliferative effect and cell cycle analysis of N-(ferrocenyl)benzoyl dipeptide esters. *J. Organomet. Chem*. 694: 880-885.
44. Corry A. J., O'Donovan N., Mooney A., O'Sullivan D., Rai D. K., Kenny P. T. M. (2009) Synthesis, structural characterization, in vitro anti-proliferative effect and cell cycle analysis of N-(ferrocenyl)benzoyl dipeptide esters. *J. Organomet. Chem*. 694: 880-885.
45. Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C. (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*. 30: 40-45.

46. Darzynkiewicz Z., Juan G. (2001) DNA content measurement for DNA ploidy and cell cycle analysis. *Curr Protoc Cytom.* 7: 7.5.
47. Dave Z., Byfield M., Bossy-Wetzel E. (2008) Assessing mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis. *Methods* 46: 319-323.
48. De Jesus Cazares-Marinero J., Labbe E., Top S., Buriez O., Amatore C., Jaouen G. (2013) The effect of protic electron donor aromatic substituents on ferrocenic and [3]ferrocenophanic anilines and anilides: Some aspects of structure–activity relationship studies on organometallic compounds with strong antiproliferative effects. *J. Organomet. Chem.* 744: 92-100.
49. De Oliveira A. C., Hillard E. A., Pigeon P., Rocha D. D., Rodrigues F. A. R., Montenegro R. C., Costa-Lotufo L. V., Goulart M. O. F., Jaouen G. (2011) Biological evaluation of twenty-eight ferrocenyl tetrasubstituted olefins: Cancer cell growth inhibition, ROS production and hemolytic activity. *J. Organomet. Chem.* 696: 1038-1048.
50. Diaz-Moralli S., Tarrado-Castellarnau M., Miranda A., Cascante M. (2013) Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 138: 255-271.
51. Du J., Zhang E., Zhao Y., Zheng W., Zhang Y., Lin Y., Wang Z., Luo Q., Wu K., Wang F. (2015) Discovery of a dual-targeting organometallic ruthenium complex with high activity inducing early stage apoptosis of cancer cells. *Metallomics* 7: 1573-1583.
52. Dubar F., Egan T. J., Pradines B., Kuter D., Ncokazi K. K., Forge D., Paul J-F., Pierrot C., Kalamou H., Khalife J., Buisine E., Rogier C., Vezin H., Forfar I., Slomianny C., Trivelli X., Kapishnikov S., Leiserowitz L., Dive D., Biot C. (2010) The antimalarial ferroquine: role of the metal and intramolecular hydrogen bond in activity and resistance. *ACS Chem. Biol.* 18: 275-287.
53. Dubar F., Khalife J., Brocard J., Dive D., Biot C. (2008) Ferroquine, an ingenious antimalarial drug – though on the mechanism of action. *Molecules* 13: 2900-2907.
54. Dubar F., Slomianny C., Khalife J., Dive D., Kalamou H., Gueardel Y., Grellier P., Biot C. (2013) The ferroquine antimalarial conundrum: redox activation and reinvasion inhibition. *Angew. Chem. Int. Ed.* 125: 7844-7847.
55. Dunn J. D., Alvares L. A.J., Zhang X., Soldati T. (2015) Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol.* 6: 472-485.
56. Edwards E. I., Epton R., Marr G. (1976) A new class of semi-synthetic antibiotics: ferrocenylpenicillins and –cephalosporins. *J. Org. Chem.* 107: 351-357.

57. Eke U. B., Abubakar T. A. (2015) Bioorganometallic compounds in medicine: the search for new antibacterial agents. *World J. Pharm. Sci.* 1: 22-27.
58. El Arbi M., Pigeon P., Top S., Rhouma A., Aifa S., Rebai A., Vessières A., Plamont M. A., Jaouen G. (2011) Evaluation of bactericidal and fungicidal activity of ferrocenyl or phenyl derivatives in the diphenyl butene series. *J. Organomet. Chem.* 696: 1038-1048.
59. El Arbi M., Pigeon P., Top S., Rhouma A., Aifa S., Rebai A., Vessières A., Plamont M., Jaouen G. (2011) Evaluation of bactericidal and fungicidal activity of ferrocenyl or phenyl derivatives in the diphenyl butene series. *J. Organomet. Chem.* 696: 1038-1048.
60. Farooq G., Lokhande M. V. (2015) Synthesis of ferrocene schiff base complexes (organometallic) with microbial and spectral studies. *WJPPS.* 4: 1416-1429.
61. Ferreira A. P., da Silva J. L. F., Duarte M. T., da Piedade M. F. M., Robalo M. P., Harjivan S. G., Marzano C., Gandin V., Marques M. M. (2009) Synthesis and characterization of new organometallic benzo[b]thiophene derivatives with potential antitumor properties. *Organometallics* 28: 5412-5423.
62. Fiorina V. J., Dubois R. J., Brynes S. (1978) Ferrocenyl polyamines as agents for the chemoimmunotherapy of cancer. *J. Med. Chem.* 21: 393-395.
63. Forestier J. (1935) Rheumatoid arthritis and its treatment by gold salts: The results of six years' experience. *J. Lab.Clin. Med.* 20: 827-840.
64. Fouda M. F. R., Abd-Elzaher M. M., Abdelsamaia R. A., Labib A. A. (2007) On the medicinal chemistry of ferrocene. *App. Organometal. Chem.* 21: 613-625.
65. Foy S. P., Labhassetwar V. Oh the irony: iron as a cancer cause or cure? *Biomaterials.* 32: 9155-9158.
66. Galluzzi L., Snovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M., Kroemer G. (2012) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31: 1869-1883.
67. Gandin V., Fernandes A. P. (2015) Metal- and semimetal-containing inhibitors of thioredoxin reductase as anticancer agents. *Molecules* 20: 12732-12756.
68. Gasser G., Metzler-Nolte N. (2012) The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16: 84-91.
69. Gasser G., Ott I., Metzler-Nolte N. (2011) Organometallic anticancer compounds. *Oncogene* 31: 1869-1883.
70. Gautier A., Cisnett F. (2011) Advances in metal-carbene complexes as potent anti-cancer agents. *Metallomics.* 4: 23-32.

71. Giannini F., Geiser L., Paul L. E. H., Roderer T., Therrien B., Süß-Fink G., Furrer J. (2015) Tuning the in vitro cell cytotoxicity of dinuclear arene ruthenium trithiolato complexes: Influence of the arene ligand.
72. Giannini F., Paul L. E. H., Furrer J., Therrien B., Süß-Fink G. (2013) Highly cytotoxic diruthenium trithiolato complexes of the type  $[(\eta^6\text{-p-MeC}_6\text{H}_4\text{Pri})_2\text{Ru}_2(\mu\text{-SR})_3]^+$ : synthesis, characterization, molecular structure and in vitro anticancer activity. *New Journal of Chemistry* 37: 3503-3511. *J. Organomet. Chem.* 783: 40-45.
73. Glišić B. D., Djuran M. I. (2014) Gold complexes as antimicrobial agents: An overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure. *Dalton Trans.* 43: 5950–5969.
74. Goel A., Savage D., Alley S. R., Kelly P. N., O’Sullivan D., Mueller-Bunz H., Kenny P. T. M. (2007) The synthesis and structural characterization of novel N-meta-ferrocenyl benzoyl dipeptide esters: The X-ray crystal structure and in vitro anti-cancer activity of N-{meta-ferrocenyl}benzoyl}-l-alanine-glycine ethyl ester. *J. Organomet. Chem.* 692: 1292-1299.
75. Gong Y., Zhang T., Liu H., Zheng Y., Li N., Zhao Q., Chen Y., Liu B. (2015) Synthesis, toxicities and cell proliferation inhibition of CO-releasing molecules containing cobalt. *Transition Me. Chem.* 40: 413-426.
76. Görmen M., Veitia M. S. I., Trigui F., El Arbi M., Ferroud C. (2015) Ferrocenyl analogues of bisacodyl: Synthesis and antimicrobial activity. *J. Organomet. Chem.* 794: 274-281.
77. Gormen M., Pigeon P., Top S., Vessieres A., Plamont M. A., Hillard E. A., Jaouen G. (2010) Facile synthesis and strong antiproliferative activity of disubstituted diphenylmethylidene-[3]ferrocenophanes on breast and prostate cancer cell lines. *G. Med. Chem. Commun.* 1: 149-151.
78. Gormen M., Plazuk D., Pigeon P., Hillard E. A., Plamont M. A., Top S., Vessieres A., Jaouen G. (2010) Comparative toxicity of [3]ferrocenophane and ferrocene moieties on breast cancer cells. *Tetrahedron Lett.* 51: 118-120.
79. Grotewold E. (2006) *The Science of Flavonoids*. Springer. 2006
80. Hackenberg F., Tacke M. (2014) Benzyl-substituted metallocarbene antibiotics and anticancer drugs. *Dalton Trans.* 43: 8144–8153.
81. Hajdu S. I., Thun M. J., Hannan L. M., Jemal A. (2011) A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* 117: 1097-1102.

82. Hall M. D., Failes T. W., Yamamoto N., Hambley T. W. (2007) Bioreductive activation and drug chaperoning in cobalt pharmaceuticals. *Dalton Trans.* 36: 3983-3990.
83. Han B-J., Jiang G-B., Wang J., Li W., Huang H-L., Liu Y-J. (2014) The studies on bioactivity in vitro of ruthenium(II) polypyridyl complexes towards human lung carcinoma A549 cells. *RSC Advances* 4: 40899-40906.
84. Hawkes M., Conroy A. L., Kain K. C. (2014) Spread of artemisinin resistance in malaria. *N. Engl. J. Med.* 371: 1944-1945.
85. Heffern M. C., Yamamoto N., Holbrook R. J., Eckermann A. L., Meade T. J. (2013) Cobalt derivatives as promising therapeutic agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17: 189-196.
86. Held J., Supan C., Salazar C. L. O. Tinto H., Bonkian L. N., Nahum A., Moulero B., Sie A., Coulibaly B., Sirima S. B., Siribie M., Otsyla N., Otieno L., Abdallah A. M., Minutai R., Bouyou-Akotet M., Kombila M., Koiwai K., Cantalloube C., Din-Bell C., Djeriou E., Waitumbi J., Mordmüller B., Tet-Minassian D., Lell B., Kremsner P. G. (2015) Ferroquine and artesunate in African adults and children with *Plasmodium falciparum* malaria: a phase 2, multicentre, randomised, double-blind, dose-ranging, non-inferiority study. *Lancet. Infect. Dis.* 12: 1409-1419.
87. Hickey J. L., Ruhayel R. A., Bernard P. J., Baker M. V., Berners-Price S. J., Filipovska A. (2008) Mitochondria-Targeted Chemotherapeutics: The Rational Design of Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes That Are Selectively Toxic to Cancer Cells and Target Protein Selenols in Preference to Thiols. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 12570-12571.
88. Hikiş P., Szczupak Ł., Koceva-Chyła A., Guspier A., Oehninger L., Ott I., Therrien B., Solecka J., Kowalski K. (2015) Anticancer and Antibacterial Activity Studies of Gold(I)-Alkynyl Chromones. *Molecules* 20: 19699-19718.
89. Hildebrandt A., Al Khalyfeh K., Schaarschidt D., Korb M. (2016) Multi-functionalized ferrocenes: synthesis and characterization. *J. Org. Chem.* 804: 87-94.
90. Hillard E., Pigeon P., Vessieres A., Amatore C., Jaouen G. (2007) The influence of phenolic hydroxyl substitution on the electron transfer and anti-cancer properties of compounds based on the 2-ferrocenyl-1-phenyl-but-1-ene motif. *Dalton Trans.* 21: 5073-5081.
91. Hillard E., Vessieres A., le Bideau F., Plažuk D., Spera D., Huche M., Jaouen G. (2006) A series of unconjugated ferrocenyl phenols: prospects as anticancer agents. *Chem. Med. Chem.* 1: 551-559.
92. Hillard E., Vessieres A., Thouin L., Jaouen G., Amatore C. (2005) Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45: 285-290.

93. Hillard E., Vessières A., Thouin L., Jaouen G., Amatore C. (2006) Ferrocene-Mediated Proton-Coupled Electron Transfer in a Series of Ferrocifen-Type Breast-Cancer Drug Candidates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 285– 290.
94. Hillard E., Vessières A., Top S., Pigeon P., Kowalski K., Huché M., Jaouen G. J. (2007) Organometallic diphenols: The importance of the organometallic moiety on the expression of a cytotoxic effect on breast cancer cells. *Organomet. Chem.* 692: 1315– 1326.
95. Holenya P., Can S., Rubbiani R., Alborzinia H., Jünger A., Cheng X., Ott I., Wöfl S. (2014) Detailed analysis of pro-apoptotic signalling and metabolic adaptation triggered by a N-heterocyclic carbene-gold(I) complex. *Metallomics.* 6: 1591-1601.
96. Holohan C., van Schaeuybroeck S., Longley D. B., Johnston P. G. (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nar. Rev. Cancer* 13: 714-726.
97. Huang H-L., Li Z-Z., Liang Z-H., Yao Z-H., Liu Y-J. (2011) Synthesis, cellular uptake, apoptosis, cytotoxicity, cell cycle arrest, interaction with DNA and antioxidant activity of ruthenium(II) complexes. *Eur. J. Med. Chem.* 46: 3282-3290.
98. Jankowiak A. (2014) Aktywność farmakologiczna wybranych laktonów seskwiterpenowych. Praca specjalizacyjna: Farmacja apteczna
99. Jaouen G., Vessieres A., Siden T. (2015) Ferrocifen type anti cancer drug. *Chem. Soc. Rev.* 44: 8802-8817.
100. Jaouen G., Vessieres A., Top S. Ferrocifen type anticancer drugs. (2015) *Chem. Soc. Rev.* 44: 8802-8817.
101. Jedrzejczak M., Koceva-Chyła A., Gwoździński K., Józwiak Z. (1999) Changes in plasma membrane fluidity of immortal rodent cells induced by anticancer drugs doxorubicin, aclarubicin and mitoxantrone. *Cell Bio. Int.* 23: 497-506.
102. Jędrzejewski M., Thallinger C., Mroziak M., Kornek G., Zielinski C., Jassem J. (2015) Public perception of cancer care in Poland and Austria. *The Oncologist* 20: 28-36.
103. Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61: 69-90.
104. Jiang G-B., Yao J-H., Wang J., Li W., Han B-J., Xie Y-Y., Lin G-J., Huang H-L., Liu Y-J. (2014) The induction of apoptosis in BEL-7402 cells through the ROS-mediated mitochondrial pathway by a ruthenium(II) polypyridyl complex. *New J. Chem.* 38: 2554-2563.

105. Johnson M. T., Kreft E., N'Da D. D., Neuse E. W., van Rensburg C. E. J. (2003) The Cytotoxic Activity of Macromolecular Ferrocene Conjugates Against the Colo 320 DM Human Colon Cancer Line. *J. Inorg. Organomet. Polym.* 13: 255-267.
106. Jungwirth U., Kowol C. R., Keppler B. K., Hartinger C. G., Berger W., Hefter P. (2011) Anticancer activity of etal complexes: involvement of redox processes. *Antioxid. Redox. Signal* 15: 1085-1127.
107. Kalinowski D. S., Richardson D. R. (2007) Future of toxicology-iron chelators and differing modes of action and toxicity: the changing face of iron chelation therapy. *Chem. Res. Toxicol.* 20: 715-720.
108. Kaluderovic G. N., Gomez-Ruiz S., Maksimovic-Ivanic D., Paschke R., Mijatovic S. (2012) *Bioinorg. Chem. Appl.* 2012: 705907.
109. Kealy T. J., Pauson P. L. (1951) A new type of organo-iron compound. *Nature* 168: 1039-1040.
110. Kemp C. K., Nell M. J., van Rensburg C. E. J., Swarts J. C. (2012) Cytotoxicity of Ruthenocene-containing  $\beta$ -Diketones. *Anticanc. Res.* 32: 2915-2918.
111. Kiessling M. K., Klemke C. D., Kamiński M. M., Galani I. E., Krammer P. H., Gülow K. (2009) Inhibition of constitutively activated nuclear factor- $\kappa$ B induces reactive oxygen species- and iron-dependent cell death in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res.* 69: 2365-2374.
112. Komor A. C., Barton J. K. (2013) The path for methal complexes to a DNA target. *Chem. Commun.* 49: 3617-3630.
113. Köpf-Maier P., Köpf H., Neuse E. W. (1984) Ferrocenium salts the first antineoplastic iron compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23: 456-457.
114. Korwek Z., Alster O. (2014) Rola szlaku indukowanego uszkodzeniami DNA w apoptozie i starzeniu komórkowym. *Postępy biochemii.* 60: 248-262.
115. Kovacic P. (2007) Unifying mechanism for anticancer agents involving electron transfer and oxidative stress: clinical implications. *Med. Hypotheses.* 69: 510-516.
116. Kowalski K., Koceva-Chyła A., Pieniążek A., Bernasińska J., Skiba J., Rybarczyk-Pirek A. J., Józwiak Z. (2012) The synthesis, structure, electrochemistry and in vitro anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine conjugates. *J. Organomet. Chem.* 700: 58-68.

117. Kowalski K., Skiba J., Oehniger :, Ott I., Solecka J., Rajnisz A., Therrien B. (2013) Metallocene-modified uracils: synthesis, structure and biological activity. *Organometallics* 32: 5766-5773.
118. Kowalski K., Suwaki N., Zakrzewski J., White A. J. P., Long N. J., Mann D. J. (2007) *Dalton Trans.* 7: 743-748.
119. Kowalski K., Suwaki N., Zakrzewski J., White A. J. P., Long N. J., Mann D. J. (2007) In vitro DNA scission activity of heterometallobenes. *Dalton Trans.* 743: 743-748.
120. Kowalski K., Zakrzewski J., Long N. J., Suwaki N., Mann D. J., White A. J. P. (2005) *Dalton Trans.* 4: 571-576.
121. Kumar K., Pradines B., Madamet M., Amalvict R., Benoit N., Kumar V. (2014) 1H-1,2,3-triazole tethered isatin-ferrocene conjugates: Synthesis and in vitro antimalarial evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 87: 801-804.
122. Laine A. L., Passirani C. (2012) Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12: 420-426.
123. Lal B., Badshah A., Altaf A. A., Khan N., Ullah S. (2011) Miscellaneous applications of ferrocene-based peptides/amides. *App. Organometal. Chem.* 25: 843-855.
124. Landes T., Martinou J-C. (2011) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. *BBA* 1813: 540-545.
125. Li J., Yuan J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27: 6194-6206.
126. Li L., Wong Y-S., Chen T., Fan C., Zheng W. (2012) Ruthenium complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers. *Dalton Trans.* 41: 1138-1141.
127. Li L., Wong Y-S., Chen T., Fan C., Zheng W. (2012) Ruthenium complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers. *Dalton Trans.* 41: 1138-1141.
128. Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J. A., Robinson J. P. (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 278: 8516-25.
129. Lima J. C., Rodriguez L. (2011) Applications of gold(I) alkynyl systems: a growing field to explore. *Chem. Soc. Rev.* 40: 5442-5456.
130. Liu W., Gust R. (2013) Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. *Chem. Soc. Rev.* 42: 755-773.



131. Liu Y-T., Lian G-D., Yin D-W., Su B-J. (2012) Synthesis and antimicrobial activity of some novel ferrocene-based Schiff bases containing a ferrocene unit. *Res. Chem. Intermed.* 38: 1043-1053.
132. Llambi F., Green D. R. (2011) Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr. Opin. Genetics Dev.* 21: 12-20.
133. Lu C., Heldt J. M., Guille-Collignon M., Lemaitre F., Jaouen G., Vessieres A., Amatore C. (2014) Quantitative analyses of ROS and RNS production in breast cancer cell lines incubated with ferrocifens. *Chem. Med. Chem.* 9: 1286-1293.
134. Lu J., Holmgren A. (2014) The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* 66: 75-87.
135. Malikov V. M., Yuldashev M. P. (2002) Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria L.* Genus. Distribution, structure and properties. *Chem. Nat. Compd.* 4: 358-406.
136. Martinou J-C., Uoule R. J. (2011) Mitochondria in apoptosis: bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell.* 19: 92-101.
137. McIlwain D. R., Berger T., Mak T. W. (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
138. Meyer A., Bagowski C. P., Kokoschka M., Stefanopoulou M., Alborzinia H., Can S., Vlecken D. H., Sheldrick W. S., Wöfl S., Ott I. (2012) On the biological properties of alkynyl phosphine gold(I) complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51: 8895–8899.
139. Meyer A., Gutiérrez A., Ott I., Rodríguez L. (2013) Phosphine-bridged dinuclear gold(I) alkynyl complexes: Thioredoxin reductase inhibition and cytotoxicity. *Inorg. Chim. Acta* 398: 72–76.
140. Miao R., Wei J. Lv M., Cai Y., Du Y., Hui X., Wang Q. (2011) Conjugation of substituted ferrocenyl to thiadiazine as apoptosis-inducing agents targeting the Bax/Bcl-2 pathway. *Eur. J. Med. Chem.* 46: 5000-5009.
141. Michard Q., Jaouen G., Vessieres A., Bernard B. A. (2008) Evaluation of cytotoxic properties of organometallic ferrocifens on melanocytes, primary and metastatic melanoma cell lines. *J. Inorg. Biochem.* 102: 1980-1985.
142. Miller S. A., Tebboth J. A., Tremaine J. F. (1952) Dicyclopentadienyliron. *J. Chem. Soc.* 632-635.
143. Mirabelli C. K. Johnson R. K., Sung C. M., Faucette L., Muirhead K., Crooke S. T. (1985) Evaluation of the in Vivo Antitumor Activity and in Vitro Cytotoxic Properties of

Auranofin, a Coordinated Gold Compound in Murine Tumor Models. *Cancer Res.* 45: 32–39.

144. Mizushima N. (2004) Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 2491-2502.

145. Mojžišová G., Mojžiš J., Mirossay L., Vaskova J., Perjesi P., Bomba A. (2014) Novel ferrocenyl chalcones as potential cancer therapeutics. *Anticancer Res.* 34: 6065.

146. Mojžišová G., Mojžiš J., Vašková J. (2014) Organometallic iron complexes as potential cancer therapeutics. *Acta Biochim. Pol.* 61: 651-645.

147. Moldoveanu T., Follis A. V., Kriwacki R. W., Green D. R. (2014) Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* 39: 101-111.

148. Monney A., Albrecht M. (2013) Transition metal bioconjugates with an organometallic link between the metal and the biomolecular scaffold. *Coordin. Chem. Rev.* 257:2420-2433.

149. Monserrat J. P., Chabot G. G., Hamon L., Quentin L., Scherman D., Jaouen G., Hillard E. A. (2010) Synthesis of cytotoxic ferrocenyl flavones via a ferricenium-mediated 1,6-oxidative cyclization *Chem. Commun.* 46: 5145-5147.

150. Monserrat J. P., Tiwari K. N., Quentin L., Pigeon P., Jaouen G., Vessieres A., Chabot G. G., Hillard E. (2013) Ferrocenyl flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells and cytotoxicity against B16 murine melanoma cells. *J. Organomet. Chem.* 734: 78-85.

151. Monserrat J-P., Al Safi R. I., Tiwari K. N., Quentin L., Chabot G. G., Vessieres A., Jaouen G., Neamati N., Hillard E. A. (2011) Ferrocenyl chalcone difluoridoborates inhibit HIV-1 integrase and display low activity towards cancer and endothelial cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 6195-6197.

152. Mosman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.

153. Mufula A. I., Aderibigbe B. A., Neuse E. W., Mukaya H. E. (2012) Macromolecular Co-Conjugates of Methotrexate and Ferrocene in the Chemotherapy of Cancer. 22: 423-428.

154. Muller T. J., Conradie J., Erasmus E. (2012) A spectroscopic, electrochemical and DFT study of para-substituted ferrocene-containing chalcone derivatives: structure of FcCOCHCH (p-tBuC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). *Polyhedron* 1: 257-266.

155. Munteanu C. R., Suntharalingam K. (2015) Advances in cobalt complexes as anticancer agents. *Dalton Trans.* 44: 13796-13808.

156. Murray B. S., Babak M. V., Hartinger C. G., Dyson P. J. (2016) The development of RAPTA compounds for the treatment of tumors. *Coord. Chem. Rev.* 1: 86-114.
158. Neuse E. W. (1998) Carrier-bound platinum and iron compounds with carcinostatic properties. *Polym. Adv. Technol.* 9: 786-793.
159. Neuse E. W. (2001) Polymeric organoiron compounds as prodrugs in cancer research. *Macromol. Symp.* 172: 127-138.
160. Neuse E. W. (2005) Macromolecular ferrocene compounds as cancer drug models. *J. Inorg. Organomet. P.* 15: 3-31.
161. Nguyen H. V., Sallustrau A., Balzarini J., Bedford M. R., Eden J. C., Georgousi N., Hodges N. J., Kedge J., Megellou T., Tselepis C., Tucker J. H. (2014) Organometallic nucleoside analogues with ferrocenyl linker groups: synthesis and cancer cell line studies. *J. Med. Chem.* 57: 5817-5822.
162. Noedl H., Se Y., Schaecher K., Smith B. L., Socheat D., Fukuda M. M. (2008) Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N. Engl. J. Med.* 359: 2619-2620.
163. Noffke A. L., Habtemariam A., Pizarro A. M., Sadler P. (2012) Designing organometallic compounds for catalysis and therapy. *Chem. Comm.* 48: 5219-5246.
164. Nuydens R., Novalbos J., Dispersyn G., Weber C., Borgers M., Geerts H. (1999) A rapid method for the evaluation of compounds with mitochondria-protective properties. *J. Neurosci Methods.* 15: 153-159.
165. Obecny stan zwalczania nowotworów w Polsce (2014). Polskie Towarzystwo Onkologiczne.
166. Okon I. S., Zou M-H. (2015) Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: implications for therapy. *Pharmacol. Res.* doi:10.1016/j.phrs.2015.06.013
167. Ong C. W., Jeng J. Y., Juang S. S., Chen C. F. (1992) A ferrocene-intercalator conjugate with a potent cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 306: 42-48.
168. Ornelas C. (2011) Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *New J. Chem.* 35: 1973-1985.
169. Ossela D., Ferrali M., Zanello P., Laschi F., Fontani M., Nervi C., Cavigiolio G. (2000) On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivative. *Inorg. Chim. Acta.* 306: 42-48.

170. Ott I. (2009) On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* 253: 1670–1681.
171. Ott I., Gust R. (2007) Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 340: 117-126.
172. Ott I., Kircher B., Bagowski C. P., Vlecken D. H. W. , Ott E. B., Will J., Bendsdorf K., Sheldrick W. S., Gust R. (2008) Modulation of the biological properties of aspirin by formation of a bioorganometallic derivative. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48: 1160-1163.
173. Ott I., Kowalski K., Gust R., Maurer J., Mücke P., Winter R. F. (2010) Comparative biological evaluation of two ethylene linked mixed binuclear ferrocene/ruthenium organometallic species. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 866-869.
174. Ott I., Schmidt K., Kircher B., Schumacher P., Wiglenda T., Gust R. (2005) Antitumor-active cobalt-alkyne complexes derived from acetylsalicylic acid: studies on the mode of drug action. *J. Med. Chem.* 48: 622-629.
175. Owusu-Ansah E., Yavari A., Banerjee U. (2008) A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. *Protocol Exchange* doi:10.1038/nprot.2008.23
176. Pantopoulos K., Porwal S. K., Tartakoff A., Devireddy L. (2012) Mechanism of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 51: 5705-5724.
177. Patra M., Gasser G., Metzler-Nolte N. (2012) Small organometallic compounds as antibacterial agents. *Dalton Trans.* 41:6350-6358.
178. Patra M., Gasser G., Metzler-Nolte N. (2012) Small organometallic compounds as antibacterial agents. *Dalton Trans.* 41: 6350-6358.
179. Patra M., Gasser G., Pinto A., Merz K., Ott I., Bandow J. E., Metzler-Nolte N. (2009) Synthesis and biological evaluation of chromium bioorganometallics based on the antibiotic Platensimycin lead structure. *Chem. Med. Chem.* 4: 1930-1938.
180. Patra M., Gasser G., Wenzel M., Merz K., Bandow J. E., Metzler-Nolte N. (2010) Synthesis and biological evaluation of ferrocene-containing bioorganometallics inspired by the antibiotic Platensimycin lead structure. *Organometallics* 29: 4312-4319.
181. Patra M., Gasser G., Wenzel M., Merz K., Bandow J. E., Metzler-Nolte N. (2012) Sandwich and half-sandwich derivatives of Platensimycin: synthesis and biological evaluation. *Organometallics* 31: 5760-5771.
182. Patra M., Gasser G., Wenzel M., Merz K., Bandow J. E., Metzler-Nolte N. (2011) Synthesis of optically active ferrocene containing platensimycin derivatives with a C6-C7 substitution pattern. *Eur. J. Inorg. Chem.* 22: 3295-3302.

183. Pędzik A., Paradowski M., Rysz J. (2008) Stres oksydacyjny a zjawiska patologiczne w ustroju. *Diagn. Lab.* 44: 363-369.
184. Pereira F. C., Lima B. A. V., de Lima A. P., Pires W. C., Monteiro T., Magalhaes L. F., Costa W., Graminga A. E., Batista A. A., Ellena J., Siveira-Lacerda E. P. (2015) Cis-[RuCl(BzCN)(N–N)(P–P)]PF<sub>6</sub> complexes: Synthesis and in vitro antitumor activity (BzCN = benzonitrile; N–N = 2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P–P = 1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylphosphino)ferrocene). *J. Inorg. Biochem.* 49: 91-101.
185. Perez W., Soto Y., Ortiz C., Matta J., Melendez E. (2015) Ferrocenes as potential chemotherapeutic drugs: synthesis, cytotoxic activity, reactive oxygen species production and micronucleus assay. *Bioorg. Med. Chem.* 23: 471-479.
186. Petrovski Z., Norton de Matos M. R. P., Braga S. S., Pereira C. C. L., Matos M. L., Goncalves I. S., Pillinger M., Alves P. M., Romao C. C. (2008) *J. Organomet. Chem.* 693: 675-684.
187. Pierrot C., Lafitte S., Dive D., Fraisse L., Brocard J., Khalife J. (2005) Analysis of immune response patterns in naïve and Plasmodium bergeri-infected young rats following a ferroquine treatment. *Int. J. Parasitol.* 35: 1601-1610.
188. Pike A. R., Ryder L. C., Horrocks B. R., Clegg W., Connolly B. A., Houlton A. (2005) Ferrocenyl-Modified DNA: Synthesis, Characterization and Integration with Semiconductor Electrodes. *Chem. Eur. J.* 11: 344-353.
189. Plažuk D., Vessieres A., Hillard E. A., Buriez O., Labbe E., Pigeon P, Plamont M. A., Amatore C., Zakrzewski J., Jaouen G. (2009) A [3]ferrocenophane polyphenol showing a remarkable antiproliferative activity on breast and prostate cancer cell lines. *J. Med. Chem.* 13: 4964-4967.
190. Popova L. V., Babin V. N., Belousov Y. A., Nekrasov Y. S., Snegireva A. E., Borodina N. P., Shaposhnikova G. M., Bychenko O. B., Raevskii P. M. (1993) Antitumor effects of binuclear ferrocene derivatives. *Appl. Organomet. Chem.* 7: 85-94.
191. Potrykowska A., Strzelecki Z., Szymborski J., Witkowski J. (2014) Zachorowalność i umieralność na nowotwory a sytuacja demograficzna Polski. Rządowa Rada Ludnościowa Warszawa 2014, Al. Niepodległości 208, ISBN 978-83-7027-573-0.
192. Pratesi A., Gabbiani C., Michelucci E., Ginanneschi M., Papini A. M., Rubbiani R., Ott I., Messor L. (2014) Insights on the mechanism of thioredoxin reductase inhibition by gold N-heterocyclic carbene compounds using the synthetic linear selenocysteine containing C-terminal peptide hTrxR(488-499): An ESI-MS investigation. *J. Inorg. Biochem.* 136: 161-169.

193. Putta V. R., Mallepally R. R., Srishaiam A., Yata P. K., Chintakuntla N., Nancherla D., Nagasuryaprasad K., Surya S. S., Sirasani S. (2015) Design, synthesis, DNA-binding affinity, cytotoxicity, apoptosis, and cell cycle arrest of Ru(II) polypyridyl complexes. *Anal. Biochem.* 485: 49-58.
194. Quirante J., Dubar F., González A., Lopez C., Marta C., Cortés R., Forfar I., Pradines B., Biot C. (2011) Ferrocene–indole hybrids for cancer and malaria therapy. *J. Organomet. Chem.* 696: 1011-1017.
195. Rackham O., Nichols S. J., Leedman P. J., Berners-Price S. J., Filipowska A. (2007) A gold(I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells: implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 74: 992-1002.
196. Rafique S., Idrees M., nasim A., Kabar H., Athar A. (2010) Transition metal complexes as potential therapeutic agents. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 5: 38-45.
197. Rana B. K., Nandy A., Bertolasi V., Bielawski C. W., Saha K. D., Dinda J. (2014) Novel Gold(I)- and Gold(III)-N-Heterocyclic carbene complexes: synthesis and evaluation of their anticancer properties. *Organometallics* 33: 2544–2548.
198. Ravishankar D., Rajora A. K., Greco F., Osborn H. M. I. (2013) Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 12: 2821-2831.
199. Rawson N. E., Ho Ch-T., Li S. (2014) Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels. *FSHW.* 3: 104-109.
200. Reers M., Smith T. W., Bo Chen L. (1991) J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 30: 4480-4486.
201. Rigobello M. P., Folda A., Dani B., Menabo R., Scutari G., Bindoli A. (2008) Gold(I) complexes determine apoptosis with limited oxidative stress in Jurkat T cells. *Eur. J. Pharmacol.* 582: 26-34.
202. Robinson K. M., Janes M. S., Pehar M., Monette J. S., Ross M. F., Hagen T. M., Murphy P. M., Beckman J. S. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 15038-15043.
203. Romero-Canelon I., Salassa L., Sadler P. J. (2013) The contrasting activity of iodido versus chlorido ruthenium and osmium arene azo- and imino-pyridine anticancer complexes: control of cell selectivity, cross-resistance, p53 dependence, and apoptosis pathway. *J. Med. Chem.* 56: 1291-1300.

204. Rosenberg B., Van Camp L., Trosko J. E., Mansour V. H. (1969) A new class of potent antitumor agents. *Nature* 222: 385–386.
205. Rubbiani R., Zehnder T. N., Mari C., Blacque O., Venkatesan K., Gasser G. (2014) Anticancer Profile of a Series of Gold(III) (2-phenyl)pyridine Complexes. *Chem. Med. Chem.* 9: 2781–2790.
206. Salas P. F., Herrmann C., Cawthray J. F., Nimphius C., Kenkel A., Chen J., de Kock C., Smith P. J., O. Patric B., Adam M. J., Orvig C. (2013) Structural characteristics of chloroquine-bridged ferrocenophane analogues of ferroquine may obviate malaria drug-resistance mechanisms. *J. Med. Chem.* 56: 1596-1613.
207. Schäfer S., Ott I., Gust R., Shledric W. S. (2007) Influence of the Polypyridyl (pp) Ligand Size on the DNA Binding Properties, Cytotoxicity and Cellular Uptake of Organoruthenium(II) Complexes of the Type  $[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{L})(\text{pp})]^{n+}$  [ $\text{L} = \text{Cl}$ ,  $n = 1$ ;  $\text{L} = (\text{NH}_2)_2\text{CS}$ ,  $n = 2$ ]. *Eur. J. Inorg. Chem.* 19: 3034-3046
208. Schatzschneider U., Niesel J., Ott I., Alborzinia H., Wölf S. (2008) Cellular uptake, cytotoxicity, and metabolic profiling of human cancer cells treated with ruthenium(II) polypyridyl complexes  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{N--N})]\text{Cl}_2$  with  $\text{N--N}=\text{bpy}$ , phen, dpq, dppz, and dppn. *Chem. Med. Chem.* 3: 1104-1109.
209. Schatzschneider U., Niesel J., Ott I., Gust R., Alborzinia H., Wölf S. (2008) Cellular uptake, cytotoxicity, and metabolic profiling of human cancer cells treated with ruthenium(II) polypyridyl complexes  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{N--N})]\text{Cl}_2$  with  $\text{N--N}=\text{bpy}$ , phen, dpq, dppz, and dppn. *Chem. Med. Chem.* 3: 1104-1109.
210. Schlenk M., Ott I., Gust R. (2008) Cobalt–Alkyne Complexes with Imidazoline Ligands as Estrogenic Carriers: Synthesis and Pharmacological Investigations. *J. Med. Chem.* 51: 7318-7322.
211. Schuh E., Valiahdi S. M., Jakupec M. A., Keppler B. K., Chiba P., Mohr F. (2009) Synthesis and biological studies of some gold(I) complexes containing functionalised alkynes. *Dalton Trans.* 48: 10841–10845.
212. Serebryanskaya T. V., Zolotarev A. A., Ott I. (2015) A novel aminotriazole-based NHC complex for the design of gold(I) anti-cancer agents: synthesis and biological evaluation. *Med. Chem. Commun.* 6: 1186-1189.
213. Sergeant C. D., Ott I., Sniady A., Meneni S., Gust R., Rheingold A. L., Dembinski R. (2008) Metallo-nucleosides: synthesis and biological evaluation of hexacarbonyl dicobalt 5-alkynyl-2-deoxyuridines. *Org. Biomol. Chem.* 6: 73-80.

214. Shen S-L., Shao J-H., Luo J-Z., Liu J-T., Miao J-Y., Zhao B-X. (2013) Novel chiral ferrocenylpyrazolo[1,5-a][1,4]diazepin-4-one derivatives - Synthesis, characterization and inhibition against cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* 63: 256-268.
215. Siebler D., Linseis M., Gasi T., Carrella L. M., Winter R. F., Förster C. (2011) Oligonuclear Ferrocene Amides: Mixed-Valent Peptides and Potential Redox-Switchable Foldamers. *Chem. Eur. J.* 17: 4540-4551.
216. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. (2015) Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* 65: 5-29.
217. Simenel A. A., Dokuchaeva G. A., Snegur L. V., Rodionov A. N., Ilyin M. M., Zykova S. I., Ostrovskaya L. A., Bluchterova N. V., Fomina M. M., Rikova V. A. (2010) Ferrocene-modified thiopyrimidines: synthesis, enantiomeric resolution, antitumor activity. *Appl. Organomet. Chem.* 25: 70-75.
218. Simenel A. A., Morozova E. A., Snegur L. V., Zykova S. I., Kachala V. V., Ostrovskaya L. A., Bluchterova N. V., Fomina M. M. (2009) Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo. *Appl. Organomet. Chem.* 23: 219-224.
219. Skiba J., Rajnisz A., de Oliveira K. N., Ott I., Solecka J., Kowalski K. (2012) *Eur. J. Med. Chem.* 57: 234-239.
220. Skiba J., Rajnisz A., de Oliveira K. N., Ott I., Solecka J., Kowalski K. (2012) Ferrocenyl bioconjugates of ampicillin and 6-aminopenicillanic acid – synthesis, electrochemistry and biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* 57: 234-239.
221. Stepnicka P. (2008) *Ferrocenes ligands and materials*. ISBN: 978-0-470-03585-6
222. Stockland R. A., Kohler M. C., Guzei I. A., Kastner M. E., Bawiec J. A., Labaree D. C., Hochberg R. B. (2006) Organometallic complexes containing 17-ethynyl-17-hydroxyandrost-4-en-3-one and related ethynyl steroids. *Organometallics* 25: 2475–2485.
223. Süß-Fink G. (2010) Arene ruthenium complexes as anticancer agents. *Dalton Trans.* 39: 1673-1688.
224. Süß-Fink, G. (2014) Water-soluble arene ruthenium complexes: From serendipity to catalysis and drug design. *J. Organomet. Chem.* 751: 2–19.
225. Tacke M. (2015) Benzyl-substituted carbene–metal complexes: Potential for novel antibiotics and anticancer drugs? *J. Organomet. Chem.* 782: 17–21.
226. Tan C., Lai S., Wu S., Hu S., Zhou L., Chen Y., Wang M., Zhu Y., Lian W., Peng W., Ji L., Xu A. (2010) Nuclear Permeable Ruthenium(II)  $\beta$ -Carboline Complexes Induce



Autophagy To Antagonize Mitochondrial-Mediated Apoptosis. *J. Med. Chem.* 53: 7613-7624.

227. Tan Y. L. K. Pigeon P. Hillard E. A. Top S. Plamont M. A. Vessières A. M., A. McGlinchey M. J. Müller-Bunz H. Jaouen G. (2009) Synthesis, oxidation chemistry and cytotoxicity studies on ferrocene derivatives of diethylstilbestrol. *Dalton Trans.* 28: 10871–10881.

228. Timerbaev A. R., Hartinger C. G., Aleksenko S. S., Keppler B. K. (2006) Interactions of Antitumor Metallodrugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology. *Chem. Rev.* 106: 2224-2248.

229. Tiwari K. N., Monserrat J-P. Hequet A., Ganem-Elbaz C., Cresteil T., Jaouen G., Vessieres A., Hillard E. A., Jolivalt C. (2011) In vitro inhibitory properties of ferrocene-substituted chalcones and aurones on bacterial and human cell cultures. *Dalton Trans.* 41: 6451-6457.

230. Tiwari K. N., Monserrat J-P., de Montigny F., Jaouen G., Rager M-N., Hillard E. (2011) Synthesis and structural characterization of ferrocenyl-substituted aurones, flavones, and flavonols. *Organometallics* 30: 5424-5432.

231. Tiwari K. N., Monserrat J-P., Hequet A., Ganem-Elbaz C., Cresteil T., Jaouen G., Vessières A., Hillard E. A., Jolivalt C. (2012) In vitro inhibitory properties of ferrocene-substituted chalcones and aurones on bacterial and human cell cultures. *Dalton Trans.* 41: 6451-6457.

232. Tong L., Chuang C-C., Wu S., Zuo L. (2015) Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer lett.* 367: 18-25.

233. Top S., Tang J., Vessières A., Carrez D., Provot C., Jaouen G. (1996) Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics. *Chem. Commun.* 955-956.

234. Top S., Vessières A., Leclercq G., Quivy J., Tang J., Vaissermann J., Huché M., Jaouen G. (2003) Synthesis, biochemical properties and molecular modeling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: Evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Chem. Eur. J.* 9: 5223–5236.

235. Ververde M., Trejo C., Rojas E. (2001) Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis.* 16: 265-270.

236. Vera J., Gao L. M., Santana A., Matta J., Melendez E. (2011) Vectorized ferrocenes with estrogens and vitamin D2: synthesis, cytotoxic activity and docking studies. *Dalton Trans.* 40: 9557-9565.
237. Vergara E., Cerrada E., Casini A., Zava O., Laguna M., Dyson P. J. (2010) Antiproliferative activity of gold(i) alkyne complexes containing water-soluble phosphane ligands. *Organometallics* 29: 2596–2603.
238. Vessieres A. (2013) Metal carbonyl tracers and the ferrocifen family: two facets of bioorganometallic chemistry. *J. Organomet. Chem.* 734: 3-16.
239. Vessieres A., Corbet C., Heldt J. M., Lories N., Jouy N., Laios I., Leclercq G., Jaouen G., Toillon R. A. (2010) A ferrocenyl derivative of hydroxytamoxifen elicits an estrogen receptor-independent mechanism of action in breast cancer cell lines. *J. Inorg. Biochem.* 104: 503-511.
240. von Poelhsitz G., Bogado A. L., de Araujo M. P., Selistre-de-Araujo H., Ellena J., Castellano E. E., Batista A. A. (2007) Synthesis, characterization, X-ray structure and preliminary in vitro antitumor activity of the nitrosyl complex fac-[RuCl<sub>3</sub>(NO)(dppf)], dppf = 1,1'-bis(diphenylphosphine)ferrocene. *Polyhedron* 16: 4707-4712.
241. Wada K., Fukuyama T., Nakashima N., Matsumoto K. (2015) Assessment of the in vivo genotoxicity of cadmium chloride, chloroform, and D,L-menthol as coded test chemicals using the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 786: 114-119.
242. Wang J., Soisson S. M., Young K., Shoop W., Kodali S., Galgoci A., Painter R., Parthasarathy G., Tang Y. S., Cummings R., Ha S., Dorso K., Motyl K., Jayasuriya H., Ondeyka J., Herath K., Zhang C., Hernandez L., Allocco J., Basilio A., Tormo J. R., Genilloud O., Vicente F., Pelaez F., Colwell L., Lee S. H., Michael B., Falchetto T., Gill C., Silver L. L., Hermes J. D., Bartizal K., Barrett J., Schatz D., Becker J. W., Cully D., Singh S. B. (2006) Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 441: 358-361.
243. Wani W. A., Baig U., Shreaz S., Shiekh R. A., Iqbal P. F., Jameel E., Ahmad A., Mohd-Setapar S. H., Mushtaque M., Hun L. T. (2015) Recent advances in iron complexes as potential anticancer agents. *New J. Chem.* 10.1039/C5NJ01449B.
244. Wani W. A., Jameel E., Baig U., Mumtazuddin S., Hun L. T. (2015) Ferroquine and its derivatives: new generation of antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 101: 534-551.
245. Wei H., Quan C-Y., Chang C., Zhang X-Z., Zhuo R-X. (2010) Preparation of Novel Ferrocene-Based Shell Cross-Linked Thermoresponsive Hybrid Micelles with Antitumor Efficacy. *J. Phys. Chem. B.* 114: 5309-5314.

246. Werner H. (2012) At least 50 years of ferrocene: the discovery and rediscovery of the sandwich complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51: 6052-6058.
247. WHO Global Malaria Programme, World Malaria Report. (2015) World Health Organization 2015, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
248. Wilkinson G., Rosenblum M., Whiting M. C., Woodward R. B. (1952) The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 2125-2126.
249. Xie Y-Y., Huang H-L., Yao J-H., Lin G-J., Jiang G-B., Liu Y-J. (2013) DNA-binding, photocleavage, cytotoxicity in vitro, apoptosis and cell cycle arrest studies of symmetric ruthenium(II) complexes. *Inorg. Chim. Acta.*, 405: 228-234.
250. Xie Y-Y., Huang H-L., Yao J-H., Lin G-J., Jiang G-B., Liu Y-J. (2013) DNA-binding, photocleavage, cytotoxicity in vitro, apoptosis and cell cycle arrest studies of symmetric ruthenium(II) complexes. *Eur. J. Med. Chem.* 63: 603-610.
251. Yang Y., Karakhanova S., Werner J., Bazhin A. V. (2013) Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. *Curr. Med. Chem.* 20: 3677-92.
252. Yang Y., Liu H., Liu F., Dong Z. (2014) Mitochondrial dysregulation and protection in cisplatin nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 6: 1249-1256.
253. Yoon J. S., Lee M. K., Sung S. H., Kim Y. C. (2006) Neuroprotective 2-(2-Phenylethyl)chromones of *Imperata cylindrica*. *J. Nat. Prod.* 69: 290-291.
254. Zabłocka A., Janusz M. (2008) Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postepy Hig. Med. Dośw.* 62: 118-124.
255. Zhang G., Wu C., Ye H., Yan H., Wang X. (2011) Nanoscaled carborane ruthenium(II)-arene complex inducing lung cancer cells apoptosis. *J. Nanobiotechnology* 9: 6.
256. Zhao H., Joseph J., Fales H. M., Sokoloski E. A., Levine R. L., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B. (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 5727-5732.
257. Zhao Z., Luo Z., Wu Q., Zheng W., Feng Y. Chen T. (2014) Mixed-ligand ruthenium polypyridyl complexes as apoptosis inducers in cancer cells, the cellular translocation and the important role of ROS-mediated signalling. *Dalton Trans.* 43: 17017-17028.
258. Zhu S., Pabla N., Tang C., He L., Dong Z. (2015) DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 12: 2197-2205.

259. Zou T., Lum C. T., Chui S-Y., Che C-M. (2013) Gold(III) Complexes Containing N-Heterocyclic Carbene Ligands: Thiol “Switch-on” Fluorescent Probes and Anti-Cancer Agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52: 2930–2933.
260. Zou T., Lum C. T., Lok C-N., Zhang J-J., Che C-M. (2015) Chemical biology of anticancer gold (III) and gold (I) complexes. *Chem. Soc. Rev.* 44: 8786-8801.