

**mgr inż. Magdalena Matczuk**  
Katedra Chemii Analitycznej,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Warszawska

## **Streszczenie Rozprawy Doktorskiej**

Opracowanie metodologii analitycznej do badania transportu kompleksów metali o działaniu przeciwnowotworowym w symulowanych warunkach fizjologicznych

Każdego roku ponad 8 milionów ludzi umiera z powodu choroby nowotworowej. Istotne jest więc opracowywanie i badanie nowych kompleksów metali o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych, które mogłyby być stosowane w chemioterapii i być skuteczniejsze w działaniu przeciw komórkom rakowym niż komercyjnie stosowane kompleksy platyny. Jednymi z najbardziej obiecujących związków, będących na etapie badań klinicznych, są kompleksy rutenu(III) i galu(III) – [*trans*-tetrachlorobis(1H-indazolo)rutenian(III)] indazolu oraz tris(8-hydroksychinolino)gal(III). Choć te są zaawansowane w testach medycznych, wciąż brak podstawowej wiedzy związanej z mechanizmem ich transportu i działania w organizmie ludzkim.

Głównym celem Rozprawy Doktorskiej jest opracowanie metod i metodologii analitycznych do badania zmian specjacyjnych wybranych metalokompleksów w symulowanych warunkach fizjologicznych. W przypadku kompleksu Ru(III) począwszy od jego dożylnego dozowania aż do przemian wewnątrz komórek nowotworowych. W przypadku związku Ga(III) – jego wydalania i oznaczania w moczu ludzkim.

W pierwszym etapie badań, dotyczącym I, zbadano procesy hydrolizy kompleksu w symulowanych warunkach zewnątrzkomórkowych oraz zidentyfikowano produkty tego procesu, stosując tandemową spektrometrię mas z jonizacją poprzez elektrozpraszanie (ESI-QqQ-MS). Zidentyfikowano pięć głównych produktów hydrolizy kompleksu rutenu. W symulowanych warunkach surowicy krwi ludzkiej zbadano kinetykę tworzenia się adduktu kompleksu Ru–holo-transferyna (nasycona żelazem forma białka odpowiedzialnego za transport żelaza we krwi) stosując dwie techniki: elektroforezę kapilarną połączoną ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (CE-ICP-MS) i spektrometrię mas z jonizacją poprzez elektrozpraszanie z analizatorem czasu przelotu (ESI-TOF-MS). Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że reakcja zachodzi bez wyparcia żelaza z transferyny, a kompleks rutenu oraz żelazo mogą być transportowane do komórek nowotworowych równocześnie. Potwierdza to słuszność literaturowego założenia nazywanego efektem „Konia Trojańskiego”.

W następnym kroku obserwowano zmiany specjacyjne adduktu I–holo-transferyna w symulowanych warunkach cytozolu komórek nowotworowych (w buforze fosforanowym

pH 6.0 z dodatkiem glutationu lub/i kwasu askorbowego lub/i kwasu cytrynowego) za pomocą zoptymalizowanej metody CE-ICP-MS. Na elektroferogramach obserwowano sygnały małowzrostekowych (<10 kDa) form kompleksu rutenu uwolnionych z adduktu z holo-transferyną. Formy te zostały zidentyfikowane przy użyciu ESI-QqQ-MS, jako zawierające głównie Ru na +II stopniu utlenienia, co może potwierdzać teoretyczne założenie selektywnej aktywacji leku poprzez jego redukcję w specyficznych warunkach wnętrza komórek nowotworowych.

Uzyskane wyniki były podstawą do zbadania zmian specjacyjnych adduktu I-holo-transferyna w cytozolu komórek uzyskanych z linii komórkowych gruczolaka jelita grubego (HT-29). Cytozol komórkowy otrzymano w procesie sonolizy błon komórek i selektywnego ultrawierowania a następnie zmieszania z adduktem I-holo-transferyna oraz inkubacji w temperaturze fizjologicznej. Próbkę analizowano za pomocą chromatografii wykluczania (SEC) połączonej z ICP-MS. W czasie doświadczenia zaobserwowano rozpad adduktu kompleksu rutenu z holo-transferyną i powstawanie nowych form specjacyjnych Ru w czterech przedziałach mas: >100 kDa, 50–80 kDa, 10–50 kDa i <10 kDa. We frakcji małowzrostekowej, zawierającej 15% rutenu, formy specjacyjne leku identyfikowano stosując kapilarną wysokosprawną chromatografię cieczową ( $\mu$ HPLC) połączoną z ESI-QqQ-MS. Najważniejszym wnioskiem wypływającym z badań jest fakt, iż kompleksy Ru zawierały metal na +II, ale także +III stopniu utlenienia, co świadczy o złożoności zachodzących wewnątrzkomórkowo przemian.

W przypadku form o większej masie cząsteczkowej (połączeń z białkami cytoplazmatycznymi) zastosowano postępowanie proteomiczne typu „shotgun”, opierające się na jednoczesnej identyfikacji wielu form kompleksu Ru-białka za pomocą tzw. metody „bottom-up”, czyli z użyciem selektywnego etapu cięcia enzymatycznego połączeń, a następnie ich identyfikacji na podstawie mas charakterystycznych peptydów. Do analiz użyto techniki  $\mu$ HPLC-ESI-QqQ-MS i zaobserwowano, że większość form kompleksu Ru-białka to połączenia ze zredukowanymi (aktywnymi) formami Ru(II), co tłumaczyć może selektywność i brak efektów ubocznych stosowania tego leku w klinicznej terapii eksperymentalnej.

Badania dotyczące kompleksu galu(III) koncentrowały się na optymalizacji i walidacji metody izotachforezy kapilarnej połączonej z micelną elektrokinetyczną chromatografią (tITP-MEKC) oznaczania nieobdarzonego ładunkiem kompleksu w moczu ludzkim. Szczególny nacisk położono na zweryfikowanie występowania efektu ogniskowania micelnego w przypadku braku jonu wiodącego lub kończącego w układzie oraz po zastosowaniu związku powierzchniowo czynnego w stężeniu dla którego nie tworzą się micelle. Dla sprawdzenia stosowalności i skuteczności tITP-MEKC w badaniach względem próbek biologicznych o dużej przewodności, mocz ludzki wzbogacano w metalo-kompleks i analizowano za pomocą zoptymalizowanej metody. Micelarna izotachforeza okazała się być efektywną techniką zagęszczania i rozdzielania nieobdarzonych ładunkiem analitów w próbkach moczu, dostarczając wiarygodnych wyników oznaczeń przy minimalnie krótkim etapie przygotowania próbek. Tego typu badania i proste rozwiązania mogą być zastosowane w programach wyboru leków-kandydatów pod kątem ich szybkiego metabolizmu i efektywnego wydalania z organizmu ludzkiego.

Opracowane w ramach Rozprawy metodologie mogą być narzędziem badania transportu kompleksów różnych metali, posiadających charakterystyczne profile izotopowe (w przypadku badań z zastosowaniem cząsteczkowej spektrometrii mas). Przedstawione postępowania analityczne mogą być zastosowane do badania różnych płynów fizjologicznych lub komórek nowotworowych, podczas testów farmakokinetycznych, pobierania, dystrybucji i transportu wewnątrzkomórkowego *ex vivo* lub *in vitro*.

Magdalena Motczuk

Warszawa, 8.06.2015r