

Wioletta Jakubczak
Doktorantka
Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

Warszawa, 12.09.2019

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Przemiany cytotoksycznych kompleksów złota i platyny i ich wpływ na komórkową homeostazę jonów metali, badane za pomocą spektrometrii mas”

Promotor
dr inż. hab. Katarzyna Pawlak, prof. PW

W niniejszej rozprawie doktorskiej pt. „Przemiany cytotoksycznych kompleksów złota i platyny i ich wpływ na komórkową homeostazę jonów metali, badane za pomocą spektrometrii mas” zbadano wpływ kompleksu złota (I) – auranofiny - na zmiany zawartości jonów bio-niezbędnych metali w odniesieniu do cisplatyny - dobrze poznanego cytostatyku. Badania przeprowadzono z użyciem linii komórek nowotworowych (A549) i prawidłowych płuc (MRC-5). Badania realizowano w ramach projektu pt. „Opracowanie metod badania zaburzeń równowagi jonomicznej i ich genezy w komórkach rakowych poddawanych działaniu cytostatyków”, o numerze 2013/09/B/ST4/00961 finansowanego przez NCN, realizowanego w Katedrze Chemii Analitycznej pod kierownictwem prof. PW dr hab. inż. Katarzyny Pawlak.

W części literaturowej niniejszej rozprawy omówiono różnice w metabolizmie i składzie cytozolu pomiędzy komórkami prawidłowymi, a nowotworowymi. Dodatkowo przeanalizowano rodzaje śmierci komórkowej i ich podstawowe mechanizmy. Opisano klasy chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu chorób nowotworowych, w tym kompleksów metali jako cytostatyków. Na podstawie opublikowanych już prac przedstawiono zaburzenia homeostazy jonów metali w komórkach nowotworowych i prawidłowych. Opisano także podstawowe techniki instrumentalne stosowane do oznaczania jonów i związków metali.

W ramach realizacji pracy:

- I. dokonano oznaczeń jonów metali w zebranych komórkach za pomocą spektrometru mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS), co wymagało:

- opracowania metody kolekcjonowania i frakcjonowania komórek poddanych działaniu cytotoksycznych kompleksów metali;
- zaprojektowania chemicznie inertnego, przepływowego układu dozowania małych objętości próbek do oznaczania całkowitej zawartości metali;
- opracowania metody normalizacji wyznaczonych całkowitych zawartości metali względem gęstości komórkowej;
 - i pozwoliło na zbadanie:
 - wpływu cytostatyków na homeostazę jonów metali w badanych komórkach;
 - stopnia powiązania żywotności komórek z homeostazą jonów metali w badanych komórkach.

II. śledzenia zmiany formy cytostatyków w środowisku cytozolu, co wymagało:

- zastosowania chromatografii wykluczania (SEC) w połączeniu z ICP-MS w celu określenia zmian wielkości powstałych metabolitów i wskazania potencjalnych bioligandów wykazujących do nich powinowactwo;
- wykonania kalibracji kolumny SEC z użyciem kompleksów cisplatyny i auranofiny, ich produktów hydrolizy oraz ich adduktów z białkami;
- zastosowania elektroforezy kapilarnej (CE) i kapilarnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (μ RPLC) połączonych z ICP-MS w celu dalszego scharakteryzowania metabolitów (ze względu na zmianę wielkości i ładunku związku) oraz w celu otrzymania map peptydowych znakowanych złotem i platyną. Otrzymane czasy migracji i retencji związków złota i platyny posłużyły do określania ich tożsamości za pomocą cząsteczkowej spektrometrii mas.

Słowa klucze: A549, MRC-5, cytostatyki, auranofina, cisplatyna, ICP-MS

ABSTRACT

SUMMARY

In this PhD thesis entitled "Transformations of cytotoxic gold and platinum complexes and their effect on cellular metal ion homeostasis, investigated by means of mass spectrometry" the gold complex (auranofin) was examined in relation to the well-known cytostatic Pt-complex - cisplatin. Studies were carried out using lung cancer (A549) and normal lung (MRC-5) cells. The research was carried out as part of the project entitled "Development of methods for the study of ion balance disorders and their genesis in cancer cells treated with cytostatics" supervised by Mrs. Katarzyna Pawlak from Chair of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry at the Warsaw University of Technology.

The first part of this dissertation discusses differences in the metabolism and composition of the cytosol between normal and cancer cells. In addition, the types of cell death and their basic mechanisms were analysed. The classifications of chemotherapeutics agents used in the treatment of neoplastic diseases and metal complexes as cytostatics is characterized. Based on the literature, disorders in metal homeostasis in tumor and normal cells have been presented. Selected analytical techniques used for the determination of metal compounds as well as interferences occurring during the analysis with ICP-MS are also described.

To achieve the goal:

- I. changes in metal homeostasis in normal and cancer cells were monitored by means of ICP-MS. This required:
 - the development of a method for collecting and fractionating cells exposed to cytotoxic metal complexes;
 - the design of a chemically inert dosing system into the flow for small sample volumes to determine the total metal content;
 - the development of the normalization method for total metal content in relation to cell density;

and allowed to examine:

- the effect of cytostatic complexes on metal ion homeostasis in the examined cells;
- the degree of correlation of cell viability with metal ion homeostasis in tested cells.

II. changes in the form of cytostatics were monitored in the cytosolic environment. This required:

- use of size exclusion chromatography (SEC) in combination with ICP-MS to determine changes in the size of metabolites formed and to indicate potential bioligands with affinity for them;
- performing the SEC column calibration using cisplatin and auranofin complexes, their hydrolysis products and adducts with proteins;
- capillary electrophoresis (CE) and reversed phase capillary liquid chromatography (μ RPLC) combined with ICP-MS to further characterize the metabolites (due to the change of size and charge of the compound) and to obtain peptide maps labelled with gold and platinum. The obtained migration and retention times of gold and platinum compounds were proposed to be used to indicate fractions containing metal compounds toward identification by molecular mass spectrometry.

Key words: A549, MRC-5, cytostatics, auranofin, cisplatin, ICP-MS