



**JAGIELLONIAN UNIVERSITY**

**IN KRAKÓW**

**Faculty of Chemistry**

**Department of Inorganic Chemistry**

**Olga Mazuryk**

**Polypyridyl ruthenium complexes for cancer  
treatment and visualization**

Streszczenie rozprawy doktorskiej

**Dissertation First Supervisor: Prof. Dr. hab. Grażyna Stochel**

**Dissertation Second Supervisor: Prof. Dr. hab. Tomasz Brzozowski**

**Kraków, 2015**

Wykorzystywanie kompleksów rutenu w terapii przeciwnowotworowej nie jest pomysłem nowym. W związku z dużą toksycznością oraz ograniczoną skutecznością kompleksów platyny, poszukiwano nowych związków metali o aktywności przeciwnowotworowej, które posiadałyby alternatywne mechanizmy działania. Kompleksy rutenu ze względu na dobrze poznaną chemię koordynacyjną, niską toksyczność (łączoną z możliwością naśladowania jonów żelaza w układach biologicznych) są przedmiotem badań naukowców z całego świata. Efektem tych badań są dwa kompleksy rutenu NAMI-A ( $[\text{ImH}][\text{trans-Ru}(\text{DMSO})(\text{Im})\text{Cl}_4]$ , Im – imidazol) oraz KP1019 ( $[\text{IndH}][\text{trans-Ru}(\text{Ind})_2\text{Cl}_4]$ , Ind – indazol) zakwalifikowane do drugiej fazy badań klinicznych. Oba te związki stosunkowo łatwo ulegają reakcjom substytucji i po wprowadzaniu ich do organizmu reagując z biocząsteczkami docelowymi, wywołują efekt farmakologiczny. Jak do tej pory nie są poznane wszystkie możliwe drogi aktywacji i reakcji testowanych związków, są one wciąż przedmiotem wielu badań. Obecnie zainteresowanie zyskują związki rutenu inertne na substytucję – kompleksy z ligandami polipirydyłowymi. Początkowo badane były pod kątem wykorzystania jako znaczniki DNA, obecnie rośnie zainteresowanie nimi w kontekście terapii przeciwnowotworowej.

Głównym celem pracy doktorskiej była synteza oraz zbadanie właściwości fizykochemicznych, fotofizycznych, jak również i biologicznych serii polipirydyłowych kompleksów rutenu, zawierających dwa ligandy dip (4,7-difenylo-1,10-fenantrolina) oraz zmodyfikowany ligand bpy (2,2'-bipirydyna) w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w obrazowaniu zmian nowotworowych i terapii przeciwnowotworowej.

Cytotoksyczność otrzymanych kompleksów jest znacząco większa niż cytotoksyczność związku referencyjnego, powszechnie używanej obecnie cisplatyny. Toksyczność kompleksów Ru ściśle związana jest z poziomem akumulacji tych kompleksów w komórkach, na który z kolei znaczący wpływ mają ładunek i lipofilowość badanych związków. Największą cytotoksycznością wśród przebadanych kompleksów zarówno dla komórek nowotworowych, jak i komórek śródbłonna cechuje się najbardziej lipofilowy związek wśród kompleksów dwuwartościowych. Po akumulacji, kompleksy rutenu zaburzają cykl komórkowy, hamując rozwój i podział komórki, oraz powodując jej śmierć na drodze apoptozy. Jednym z czynników wywołujących apoptozę może być wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, spowodowany akumulacją badanych kompleksów Ru w komórce. Obserwowana apoptoza nie zachodzi natomiast na drodze szlaku mitochondrialnego, mimo że badane kompleksy rutenu preferencyjnie akumulują się w mitochondriach oraz siateczce

endoplazmatycznej. Wyższy poziom retencji kompleksów Ru w komórkach nowotworowych raka piersi 4T1 niż w komórkach śródbłonna MLuMEC FVB może sugerować niższą ogólną toksyczność kompleksów rutenu oraz mniejsze efekty uboczne.

Poziom luminescencji komórek po inkubacji z badanymi kompleksami rutenu nie jest ściśle skorelowany z wydajnością kwantową luminescencji wyznaczoną dla kompleksów w roztworach wodnych. Obserwowany sygnał luminescencyjny zależy od poziomu akumulacji kompleksów w komórkach, oraz od wydajności kwantowej i czasów życia luminescencji kompleksów po akumulacji. Badania w układach modelowych z użyciem ludzkiej albuminy pokazały, że w wyniku tworzenia adduktów Ru-białko zwiększa się czas życia oraz wydajność kwantowa luminescencji. Ten efekt, poprzednio opisany tylko w przypadku oddziaływania z DNA, dowodzi znaczącego wpływu białek na luminescencje polipirydylowych kompleksów rutenu, zawierających ligandy dip (4,7-difenylo-1,10-fenantrolina). Pokazano również, że oddziaływanie z DNA nie powoduje znaczących zmian w luminescencji badanych związków. Dodatkowo, badania *in vitro* nie wykazały akumulacji kompleksów Ru w jądrze komórkowym.

Oceniając potencjał kompleksów do znakowania komórek, konieczna jest nie tylko ocena właściwości luminescencyjnych kompleksów Ru w roztworach wodnych, ale również wyznaczanie poziomu akumulacji kompleksów w komórkach oraz zbadanie wpływu biomakrocząsteczek (białka i DNA) na wydajność kwantową oraz czasy życia luminescencji badanych związków.

Ważnym etapem badań była ocena potencjalnych właściwości przeciwrzutowych polipirydylowych kompleksów rutenu. Akumulacja kompleksów Ru powoduje zmianę właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych i komórek śródbłonna. Badane kompleksy rutenu skutecznie hamują adhezję komórek nowotworowych 4T1 na podłożu komórek śródbłonna MLuMEC FVB, jak również na powierzchni pokrytej fibronektyną, kolagenem czy zwykłym podłożu plastikowym. Z drugiej strony, komórki nowotworowe po inkubacji z kompleksami rutenu gorzej się odrywają od podłoża plastikowego oraz pokrytego kolagenem w testach adhezyjnych z trypsyną. Badane związki rutenu mają również właściwości angiogenne, związane z ich istotnym wpływem na organizację komórek śródbłonna na podłożu plastikowym. Hamują one również ruchliwość komórek śródbłonna w teście leczenia zadrapania. Obserwowane zmiany właściwości adhezyjnych oraz angiogennych zostały potwierdzone zmianą poziomu ekspresji mRNA białek biorących udział

w procesach adhezji, angiogenezie oraz ruchliwości w komórkach nowotworowych oraz śródbłonna. Opisane efekty wskazują na istotny potencjał aplikacyjny badanych polipirydylowych kompleksów Ru do zastosowania w terapii przeciwprzerzutowej.

Szczególna uwaga w rozprawie doktorskiej została poświęcona polipirydylowemu kompleksowi rutenu zawierającemu ligand bipirydylowy z przyłączoną grupą nitroimidazolową. Kompleks ten został przebadany pod kątem możliwego zastosowania jako znacznika luminescencyjnego dla diagnostyki obszarów niedotlenionych, jak również efektywnego związku cytotoksycznego. Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że badany kompleks jest bardziej toksyczny w stosunku do komórek w stanie niedotlenienia, jak również ma większą akumulację oraz wyższy poziom retencji w komórkach hodowanych w atmosferze obniżonego stężenia tlenu niż w warunkach normalnych. Obserwowana selektywność nitroimidazolowej pochodnej kompleksu rutenu w stosunku do komórek hodowanych w atmosferze obniżonego stężenia tlenu spowodowana jest prawdopodobnie katalizowaną przez nitroreduktazę redukcją grupy nitrowej w podstawniku 2-nitroimidazolowym w warunkach obniżonego stężenia tlenu, która została potwierdzona spektroskopią emisyjną oraz spektrometrią mas. Właściwości biologiczne połączone z wyższą wydajnością kwantową oraz dłuższym czasem życia luminescencji nitroimidazolowej pochodnej kompleksu rutenu wskazują na możliwość zastosowania tego związku jako selektywnego znacznika do obrazowania obszarów niedotlenionych.

Wyniki wykonanych badań weszły w skład trzech publikacji: *J. Biol. Inorg. Chem.* 2014, 19, 1305-1316, *J. Inorg. Biochem.* 2014, 134, 83-91 oraz *Metallomics*, 2015, 7, 553-566.

Podsumowując, zagadnienia omówione w przedstawionej rozprawie doktorskiej obejmują syntezę oraz zbadanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych wybranych polipirydylowych kompleksów rutenu. Przeprowadzone badania nad potencjalnym zastosowaniem polipirydylowych kompleksów rutenu w diagnostyce i terapii nowotworów obejmowały poznanie oddziaływania kompleksów z wybranymi biopolimerami (białka, DNA), ustalanie mechanizmów śmierci komórkowej oraz zmian właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych i organizacji komórek śródbłonna, a także zmian właściwości luminescencyjnych kompleksów w roztworach i po akumulacji w komórkach.