



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Poszukiwanie nowych chelatorów żelaza dla terapii przeciwnowotworowych

Author: Anna Mrozek-Wilczkiewicz

Citation style: Mrozek-Wilczkiewicz Anna. (2013). Poszukiwanie nowych chelatorów żelaza dla terapii przeciwnowotworowych. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersytet ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii
Instytut Fizyki im. A. Chełkowskiego
Instytut Chemii

Praca doktorska

**„Poszukiwanie nowych chelatorów żelaza dla terapii
przeciwnowotworowych”**

Anna Mrozek-Wilczkiewicz

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Fizyki Ciała Stałego UŚ pod kierunkiem
prof. dr hab. Alicji Ratusznej

oraz
w Zakładzie Chemii Organicznej UŚ pod
kierunkiem
prof. dr hab. inż. Jarosława Polańskiego

Katowice 2013



Dr BG 3392

Dziękuję wszystkim, zwłaszcza tym, których pomoc była nieoceniona.

Dedykuję Mamie.

Spis treści

1. Cel pracy	7
2. Wstęp	8
2.1. Wprowadzenie	8
2.2. Podstawy terapii fotodynamicznej.....	8
2.3. Modyfikacja terapii PDT – zastosowanie kwasu 5 - aminolewulinowego.....	11
2.4. Biosynteza hemu	13
2.5. Selektyności specyficzna terapii ALA-PDT	15
2.6. Czynniki wpływające na syntezę PpIX przy egzogennym dodaniu ALA.....	16
2.7. Zastosowanie chelatorów żelaza – terapia ALA-PDT-chelatory	17
2.8. Rola i metabolizm żelaza	19
2.9. Mechanizm działania pochodnych tiosemikarbazonu	21
2.10. Chelatory żelaza w terapii antynowotworowej.....	23
2.11. Synergia farmakologiczna	26
2.12. Rola białka p53 w biochemii nowotworów	29
2.13. Mechanizmy śmierci komórkowej oraz wybrane sposoby ich detekcji	31
3. Badania własne	38
3.1. Przeprowadzone syntezy.....	38
3.1.1. Synteza kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksylowego	39
3.1.2. Synteza chlorku kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksylowego.....	39
3.1.3. Próba syntezy 8-hydroksy-chinaldino-7-karbaldehydu	40
3.1.4. Synteza pochodnych tiosemikarbazonu.....	40
3.2. Pomiary elektronowych widm absorpcji i emisji	41
3.3. Testy cytotoksyczności	46
3.3.1. Test MTS	46
3.3.2. Test klonogenności	67
3.4. Morfologia komórek – mechanizm śmierci.....	70
3.5. Mechanizm działania – generowanie reaktywnych form tlenu	72
3.6. Badania nad wpływem chelatorów na zwiększenie efektu terapii PDT	74
3.6.1. Kinetyka powstawania PpIX po egzogennym podaniu ALA	74
3.6.2. Morfologia komórek po inkubacji z ALA oraz lokalizacja powstałej PpIX	78
3.6.3. Wpływ chelatorów na powstawanie PpIX.....	79
3.6.4. Synergiczne działanie tiosemikarbazonów i ALA.....	83
4. Podsumowanie	88
5. Część eksperymentalna.....	91
5.1. Sprzęt i czynności wstępne	91
5.1.1. Pomiary instrumentalne	91
5.1.2. Przygotowanie rozpuszczalników do syntezy	91
5.1.3. Odczynniki używane do syntezy	91
5.1.4. Odczynniki używane do badań <i>in vitro</i>	92
5.1.5. Linie komórkowe wykorzystane w eksperymentach.....	92
5.1.6. Hodowla komórek.....	92
5.2. Przeprowadzone syntezy.....	93
5.2.1. Kwas 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksylowy (1)	93
5.2.2. Chlorek kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksylowego (2)	93
5.2.3. Próby otrzymania 8-hydroksy-chinaldino-7-karbaldehydu (3)	94
5.2.4. 2-benzoilopirydylo-4-metylo-3-tiosemikarbazon (48 - Bp4mT).....	94
5.2.5. 2-benzoilopirydylo-4,4-dimetylo-3-tiosemikarbazon (49 - Bp44mT).....	95
5.2.6. 2-benzoilopirydylo-4-etylo-3-tiosemikarbazon (50 - Bp4eT)	95

5.2.7. Di-2-pirylylo-4-metylo-3-tiosemikarbazon (53 - Dp4mT).....	95
5.3. Pomiar elektronowych widm absorpcji i emisji	96
Ta część badań oraz kolejne zostały wykonane w Zakładzie Fizyki Ciała Stałego Instytutu Fizyki UŚ.....	
5.3.1. Widma absorpcyjne	96
5.3.2. Widma emisyjne	96
5.4. Testy cytotoksyczności	97
5.4.1. Test MTS	97
5.4.2. Test klonogenności	97
5.5. Morfologia komórek – mechanizm śmierci.....	98
5.6. Mechanizm działania – generowanie reaktywnych form tlenu	98
5.7. Badania nad wpływem chelatorów na zwiększenie efektu terapii PDT	99
5.7.1. Kinetyka powstawania PpIX	99
5.7.2. Morfologia komórek po inkubacji z ALA oraz lokalizacja powstałej PpIX	99
5.7.3. Wpływ chelatorów na powstawanie PpIX.....	100
5.7.4. Synergiczne działanie tiosemikarbazonów i ALA.....	100
6. Bibliografia	101

Wykaz stosowanych skrótów:

- ALA – kwas 5-aminolewulinowy (*ang.* 5-aminolevulinic acid)
- ALAD – dehydrataza aminolewulinowa
- ALAS – syntaza aminolewulinowa
- CDKs – kinazy białkowe zależne od cyklin (*ang.* cyclin-dependent kinases)
- CI – współczynnik kombinacji (*ang.* combination index)
- (COCl)₂ – chlorek oksalilu
- CPOX – oksydaza koproporfirynogenowa
- DFO – deferoksamina
- DMEM – medium hodowlane (*ang.* Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- DMF – dimetyloformamid
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DMT1 – transporter metali dwuwartościowych (*ang.* divalent metal transporter)
- DRI – współczynnik redukcji dawki (*ang.* dose reduction index)
- EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- FBS – surowica płodów wołowych (*ang.* foetal bovine serum)
- FECH – ferrochelataza
- FITC – izotiocyanian fluoresceiny
- H₂O₂ – nadtlenek wodoru
- Hb – hemoglobina
- HbO₂ – oksyhemoglobina
- HO – oksigenaza hemowa
- HO₂[·] – rodnik wodoronadtlenkowy
- IRE – sekwencje reagujące na żelazo (*ang.* iron responsive element)
- IRP – białka regulujące jony żelaza (*ang.* iron regulatory protein)
- JP – jodek propidyny
- LDL – lipoproteiny niskiej gęstości (*ang.* low density lipoprotein)
- NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang.* nuclear magnetic resonance)
- NO – tlenek azotu
- OH[·] – rodnik hydroksylowy
- O₂^{-·} – anionorodnik ponadtlenkowy

PBGD – deaminaza porfobilinogenu
PDD – diagnostyka fotodynamiczna (*ang.* photodynamic diagnosis)
PDT – terapia fotodynamiczna (*ang.* photodynamic therapy)
PE – wydajność posiewu (*ang.* plating efficiency)
PpIX – protoporfiryna IX
PPO – oksydaza protoporfirynowa
PS – fosfatydyloseryna
ROS – reaktywne formy tlenu (*ang.* reactive oxygen species)
RR – reduktaza rybonukleotydowa
SF – frakcja komórek przeżywających (*ang.* surviving fraction)
SOCl₂ – chlorek tionylu
THF – tetrahydrofuran
TLC – chromatografia cienkowarstwowa (*ang.* thin layer chromatography)
UROD – dekarboksylaza uroporfirynogenowa
UROS – synteza uroporfirynogenowa
UTR – obszar nieulegający translacji (*ang.* untranslated region)
 ϵ – molowy współczynnik absorpcji

1. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie nowych chelatorów żelaza typu tiosemikarbazonów o potencjalnych zastosowaniach w terapiach przeciwnowotworowych. W zakres pracy wchodziło w szczególności badanie wpływu tytułowych związków na komórki ze zmianami nowotworowymi oraz bez tych zmian. Ponadto badano zastosowanie pochodnych tiosemikarbazonów w kombinowanej terapii ALA-PDT z chelatorami żelaza.

2. Wstęp

2.1. Wprowadzenie

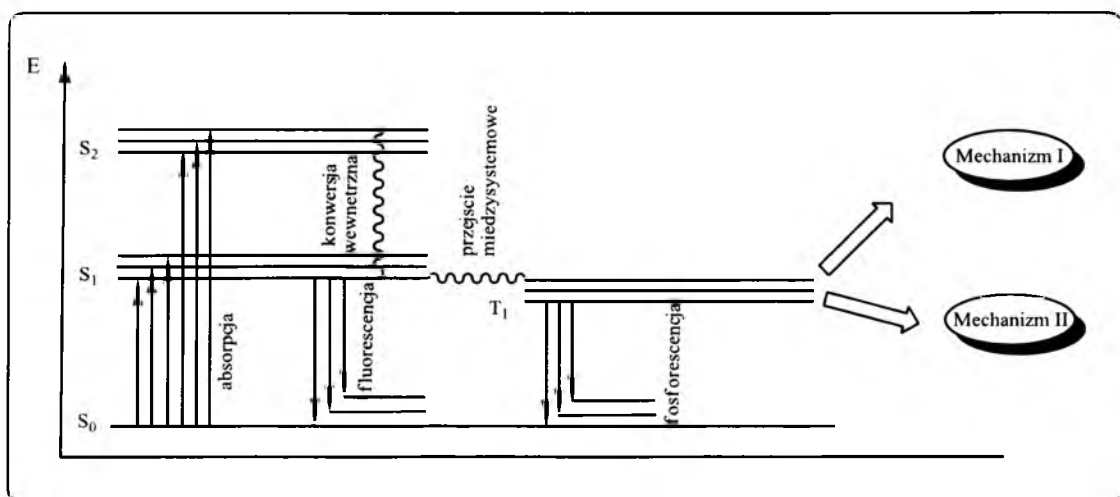
Choroby nowotworowe stanowią najczęstszą przyczynę śmierci XXI wieku. Zgodnie z danymi pochodzącymi ze Śląskiego Rejestru Nowotworów prowadzonego przez Centrum Onkologii w Gliwicach w 2010 r. w województwie śląskim zarejestrowano łącznie 16940 zachorowań na nowotwory złośliwe. W tym samym roku liczba zgonów z powodu tego rodzaju nowotworów wyniosła 11752. Porównując te dane z danymi z 1999 roku można zauważyć, że liczba zachorowań zwiększyła się o 7,6 %. Drugim z najczęstszych rodzajów nowotworów (po nowotworze płuca) jest nowotwór jelita grubego. Przytoczone liczby obrazują istotność i powszechność problemu. Poszukiwanie skutecznych metod w zwalczaniu chorób nowotworowych stanowi jedno z bardziej istotnych wyzwań dla współczesnej nauki.

2.2. Podstawy terapii fotodynamicznej

Terapia fotodynamiczna (*ang.* photodynamic therapy; PDT), jako metoda charakteryzująca się niską inwazyjnością leczenia oraz wysoką selektywnością w stosunku do zdrowych komórek, jest obecnie atrakcyjną strategią leczenia różnych schorzeń, w tym zmian nowotworowych. Istnieje również możliwość wykorzystania tej metody w diagnostyce, gdyż zgromadzony w tkance nowotworowej fotouczulacz, wzbudzony światłem, pozwala zobrazować stopień zaawansowania i miejsce występowania nowotworu. Istotą tej terapii jest wytworzenie tlenu singletowego i wolnych rodników w reakcji fotouczulacza ze światłem o odpowiedniej długości fali [1]. Warunkiem niezbędnym w reakcji fotodynamicznej jest obecność tlenu. Osobno każdy z tych trzech czynników: fotouczulacz, światło oraz tlen, jest nietoksyczny dla komórek, natomiast ich połączenie prowadzi do wywołania określonego efektu terapeutycznego. Obecnie najczęściej stosowanymi fotouczulaczami są pochodne z grupy porfiryn, chloryn, ftalocyjanin, naftalocyjanin lub teksafiryn [2–6].

Leczenie tą metodą polega na wprowadzeniu fotouczulacza do organizmu, który po zaabsorbowaniu w chorej tkance zostaje naświetlony. W celu zredukowania

ewentualnych skutków ubocznych bardzo dokładnie dobiera się odpowiednią dawkę światła oraz czas naświetlania. Dużą zaletą PDT jest selektywność gromadzenia się leku w tkankach dotkniętych nowotworem. Jest to związane między innymi z budową guza – jego przepuszczalnym unaczynieniem, dużą przestrzenią śródmiąższową, obecnością makrofagów, zmniejszonym pH oraz dużą ilością kolagenu, wiążącego cząsteczki fotouczulacza [7], [8]. Ponadto komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększoną ilością receptorów lipoprotein niskiej gęstości (*ang.* low density lipoprotein; LDL), mających powinowactwo do cząsteczek fotouczulacza [9], [10]. Połączenie fotobarwnika z układami lipidowymi jak np. liposomy dodatkowo zwiększa efektywność terapii [11]. Po akumulacji w tkance nowotworowej fotouczulacz zostaje naświetlony i ulega dwóm typom reakcji, w których tworzące się reaktywne formy tlenu (*ang.* reactive oxygen species; ROS) wywołują w komórce reakcje łańcuchowe, powodując jej uszkodzenia, doprowadzając do zniszczenia zmienionej chorobowo tkanki. Na schemacie 1 przedstawiono przemiany, jakim na poziomie kwantowym ulega fotouczulacz po zaabsorbowaniu dawki energii. Cząsteczka fotouczulacza po absorpcji światła przechodzi ze stanu podstawowego S_0 do stanu wzbudzonego S_1 , S_2 , itp. (w zależności od porcji pochłoniętej energii). Powrót ze stanu wzbudzonego może się odbyć przez przejście promieniste lub bezpromieniste. Zjawisko fluorescencji, wykorzystywane w diagnostyce nowotworów (*ang.* photodynamic diagnosis; PDD), to rodzaj przejścia promienistego ze stanu S_1 do S_0 . Molekuła może również przejść na niższy stan wzbudzony poprzez przejście bezpromieniste zwane konwersją wewnętrzną, bądź ulec przejściu międzysystemowemu i obsadzić wzbudzony stan trypletowy [12].



Schemat 1

Diagram Jabłońskiego

Cząsteczka może pozostać w stanie trypletowym znacznie dłużej niż w singletowym, efekt ten jest podstawą reakcji fotodynamicznych [13]. Fotouczulacz w stanie trypletowym, w zależności od stężenia tlenu w komórce może ulec dwóm typom reakcji według jednego z dwóch mechanizmów [14].

Mechanizm I – zachodzi przy obniżonym stężeniu tlenu w komórce. W przypadku tego mechanizmu następuje bezpośrednie oddziaływanie fotouczulacza z tkanką nowotworową. Skutkuje to wytworzeniem form wolnorodnikowych jak OH^\cdot (rodnik hydroksylowy), $\text{O}_2^{\cdot-}$ (anionorodnik ponadtlenkowy), czy HO_2^\cdot (rodnik wodoronadtlenkowy).

Mechanizm II – następuje w warunkach tlenowych. W tym przypadku energia wzbudzonego fotouczulacza zostaje przekazana bezpośrednio na tlen molekularny, który ulega wzbudzeniu do bardzo reaktywnej formy singletowej. Podstawowy stan molekuly tlenu to stan trypletowy, o niesparowanym elektronie.

Inicjacja dwóch współistniejących ze sobą mechanizmów reakcji jest podstawą terapii fotodynamicznej, której bezpośrednim skutkiem jest zniszczenie naczyń krwionośnych, stan zapalny oraz wywołanie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego [15], [16]. Bezpośrednio po terapii pacjent powinien unikać ekspozycji na światło, przez czas zależny od rodzaju użytego fotouczulacza. Przedłużona wrażliwość na światło jest niewątpliwie wadą tej terapii. Związane jest to z niekorzystnym profilem farmakokinetycznym, jaki posiadają obecnie stosowane fotouczulacze o dużej masie i znacznej lipofilowości [17]. Alternatywą jest modyfikacja klasycznego podejścia do terapii PDT, w postaci stosowania proleków właściwych fotouczulaczy. W ten sposób można znacznie poprawić parametry związane z biodystrybucją, uwzględniając procesy wchłaniania leku oraz jego metabolizmu i usuwania z organizmu. Innowacyjne podejście do tradycyjnej metody zostało opisane w następnym rozdziale.

2.3. Modyfikacja terapii PDT – zastosowanie kwasu 5 - aminolewulinowego

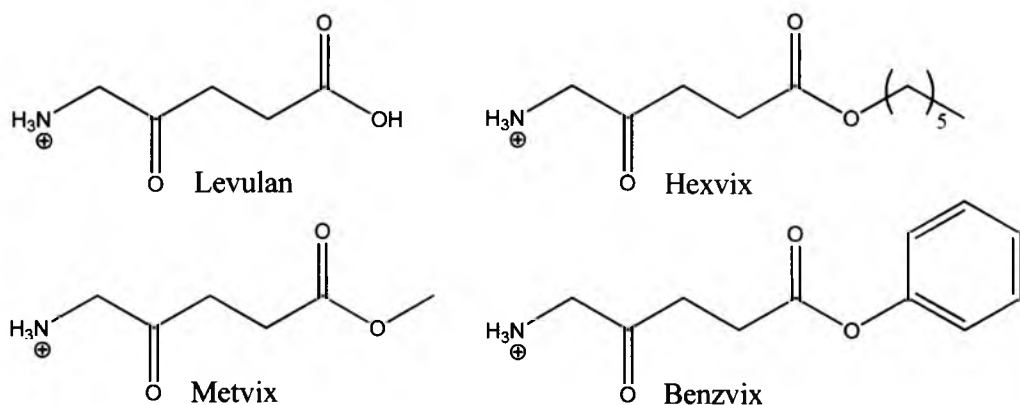
W klasycznym ujęciu terapii fotodynamicznej fotouczulacz zostaje zewnętrznie podany pacjentowi. Modyfikacja polega na podaniu małej cząsteczkowego kwasu 5-aminolewulinowego (*ang.* 5-aminolevulinic acid; ALA), który jest prekursorem protoporfiryny IX (PpIX) – właściwego fotouczulacza [18]. Ta metoda leczenia zyskała nową nazwę – terapia ALA-PDT.

Pierwsza publikacja wyników dotyczących zastosowania ALA w terapii fotodynamicznej miała miejsce w 1987 roku [19]. W pracy tej przeprowadzono badania na komórkach białaczki erytroblastycznej. Rezultatem inkubacji z ALA, był wzrost stężenia wewnątrznie biosyntezywanej PpIX. Naświetlenie powstałego fotouczulacza powodowało uszkodzenie komórek nowotworowych. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie testów *in vivo*, które potwierdziły skuteczność opisywanego proleku w terapii PDT [20]. Wyniki dowodzące wysokiej skuteczności ALA zainteresowały badaczy, co skutkowało zwiększeniem intensywności i rozszerzeniem obszaru badań. Rezultaty dotyczące klinicznego zastosowania ALA zostały opublikowane w roku 1997 [21]. W pracy tej opisano możliwość wykorzystania kwasu 5-aminolewulinowego w diagnostyce nowotworów złośliwych mózgu. Wzrost stężenia PpIX był obserwowany tylko w chorej tkance, co pozwalało na usunięcie guza bez ryzyka uszkodzenia zdrowych obszarów.

Podanie egzogenego ALA powoduje wzrost naturalnej produkcji PpIX omijając mechanizm negatywnego sprzężenia zwrotnego [22]. Podanie proleku, który tworzy właściwy lek w organizmie pacjenta niesie za sobą wiele korzyści. ALA w odróżnieniu od innych fotouczulaczy jest samoistnie syntezowany przez organizm w mitochondriach, dlatego jego stosowanie jest bezpieczne dla organizmu [23]. Zbadanie enzymów wątrobowych po 24 godzinach od podania leku, potwierdza brak toksyczności [24]. ALA zostaje wchłonięty w górnych odcinkach jelita cienkiego, a po około 6 godzinach jest wydalony z moczem [25]. Kolejnym czynnikiem przemawiającym na korzyść stosowania tego proleku jest brak przedłużonej wrażliwości na światło, ponieważ PpIX jest w krótkim czasie metabolizowana w organizmie [26]. Wrażliwość na światło ustępuje po 24-48 godzinach [27], [28], w odróżnieniu od innych fotouczulaczy (np. Photofrin), dla których czas ten wynosi nawet do 6 tygodni [29]. Ponadto PpIX jako cząsteczka hydrofobowa wykazuje większe

powinowactwo do struktur lipidowych, dlatego jej stosowanie daje lepszy efekt kliniczny, niż użycie fotouczulaczy o charakterze hydrofilowym. Efekt ten związany jest z czasem życia molekuly tlenu w stanie singletowym, który jest znacznie dłuższy w rozpuszczalnikach organicznych niż w roztworach wodnych [30], [31]. Takemura i wsp. dowodzą, iż im dłuższy czas życia molekuly fotouczulacza w stanie trypletowym, tym większe prawdopodobieństwo przekazania energii cząsteczce tlenu bądź tkanki, a co się z tym wiąże większa efektywność terapii [32].

Oprócz zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych, takich jak nowotwory skóry, płuc, przelyku, krtani, żołądka czy pęcherza moczowego [32–34], terapia ALA-PDT stosowana jest również w zabiegach kosmetycznych, leczeniu łuszczycy, czy łysienia [35], [36]. Obecnie na rynku znajduje się kilka preparatów, których składnikiem aktywnym jest kwas 5-animolewulinowy (Levulan) [37] lub jego estrowe pochodne (Metvix, Hexvix, Benzvix) (Rysunek 1) [25].



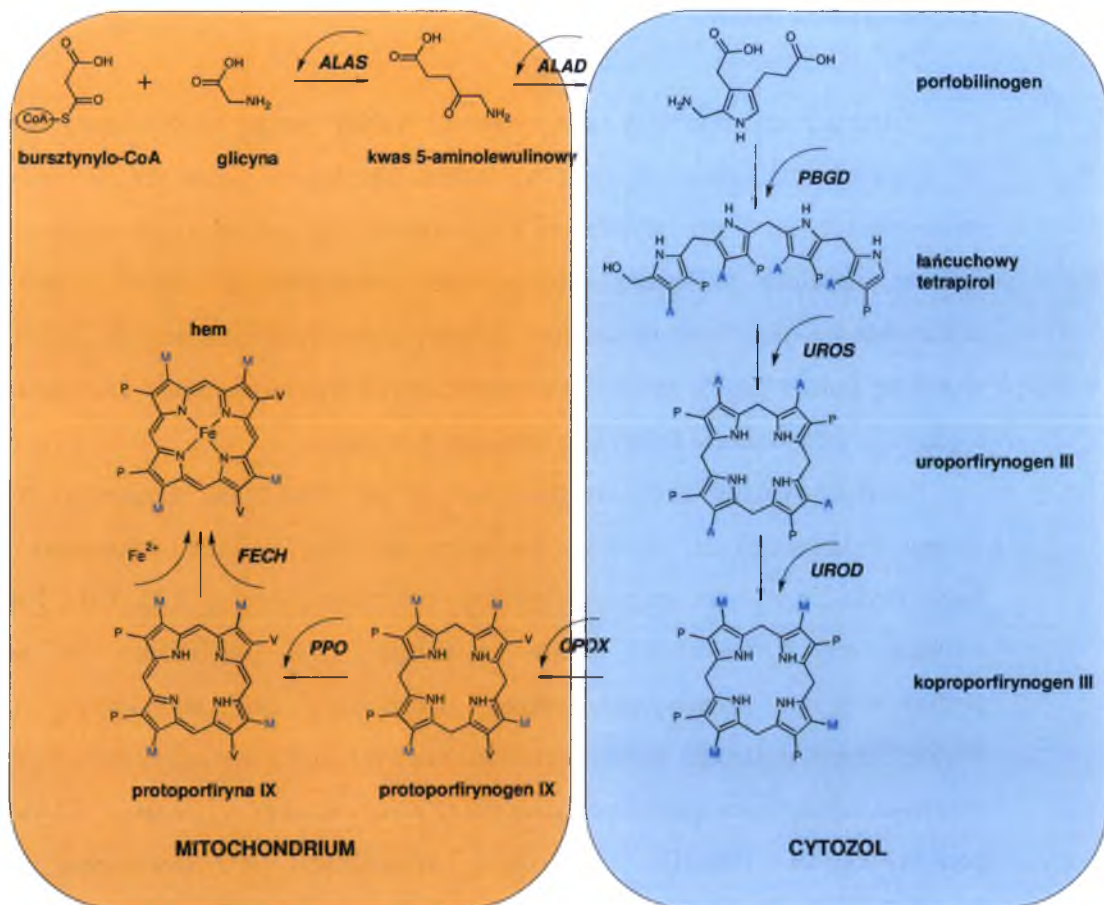
Rysunek 1

Leki, których składnikiem aktywnym jest ALA lub jego analogii
(stosowane w postaci chlorku)

2.4. Biosynteza hemu

Jedną z największych zalet terapii ALA-PDT jest jej selektywność w stosunku do komórek prawidłowych. Jest to istotna różnica w stosunku do powszechnie stosowanej chemio bądź radioterapii, które wyniszczają cały organizm pacjenta. Oprócz ogólnej opisanej wcześniej selektywności fotouczulaczy należy wspomnieć o selektywności specyficznej charakterystycznej dla tej konkretnej terapii. Zagadnienie to wiąże się z aktywnością enzymów uczestniczących w syntezie hemu, dlatego zasadnym wydaje się przytoczenie krótkiego opisu tego procesu.

Szlak syntezy hemu rozpoczyna się od utworzenia cząsteczki kwasu 5-aminolewulinowego. U ssaków zachodzi on przy udziale cząsteczki glicyny, bursztynylo-CoA oraz enzymu syntazy aminolewulinowej (ALAS). Następnym krokiem jest kondensacja dwóch cząsteczek ALA prowadząca do powstania porfobilinogenu, katalizowana przez dehydratazę aminolewulinową (ALAD). Porfobilinogen następnie ulega przekształceniu i w rezultacie z jego czterech cząsteczek powstaje łańcuchowa pochodna tetrapirołu. Katalizatorem tej reakcji jest deaminaza porfobilinogenu (PBGD). Cyklizacja prowadząca do utworzenia mostków metylenowych skutkuje powstaniem uroporfirynogenu III, przy udziale syntazy uroporfirynogenowej (UROS). Katalizatorem dekarboksylacji bocznych łańcuchów jest dekarboksylaza uroporfirynogenowa (UROD). Reakcja ta prowadzi do utworzenia cząsteczki koproporfirynogenu III. Następnym krokiem jest utworzenie sprzężonego układu wiązań w pierścieniach porfiryńowych oraz przekształcenie łańcuchów bocznych. W ten sposób, przy udziale oksydazy koproporfirynogenowej (CPOX) oraz oksydazy protoporfirynowej (PPO) powstaje cząsteczka protoporfirynogenu IX - prekursora protoporfiryny IX. Następnie w obecności ferrochelatazy (FECH) molekula PpIX koordynuje jon Fe^{2+} i powstaje hem [40–42]. Schemat powyższych przemian został przedstawiony na rysunku 2.



Rysunek 2

Schemat biosyntezy hemu

Enzymem odpowiedzialnym za rozkład hemu na biliwerdynę, tlenek węgla oraz jon żelaza jest oksigenaza hemowa (HO) [43]. U ssaków enzym ten posiada trzy izofর্ম HO-1, HO-2 i HO-3, jednak największą rolę odgrywa pierwszy z izomerów [44]. Uaktywnienie czynności HO-1 zachodzi między innymi pod wpływem hemu, metali ciężkich, szoku cieplnego [45], reaktywnych form tlenu [46], nadtlenu wodoru (H_2O_2), czy promieniowania UV-A [47]. HO-1 jest enzymem biorącym udział w mechanizmach obronnych komórki uaktywniających się w odpowiedzi na terapię, dlatego jest jej potencjalnym celem [33], [48], [49]. Zahamowanie aktywności tego enzymu powoduje wzrost efektywności leczenia, ponieważ jego aktywacja następuje w wyniku stresu oksydacyjnego wywołanego wzbudzeniem fotouczulacza [33].

2.5. Selektywności specyficzna terapii ALA-PDT

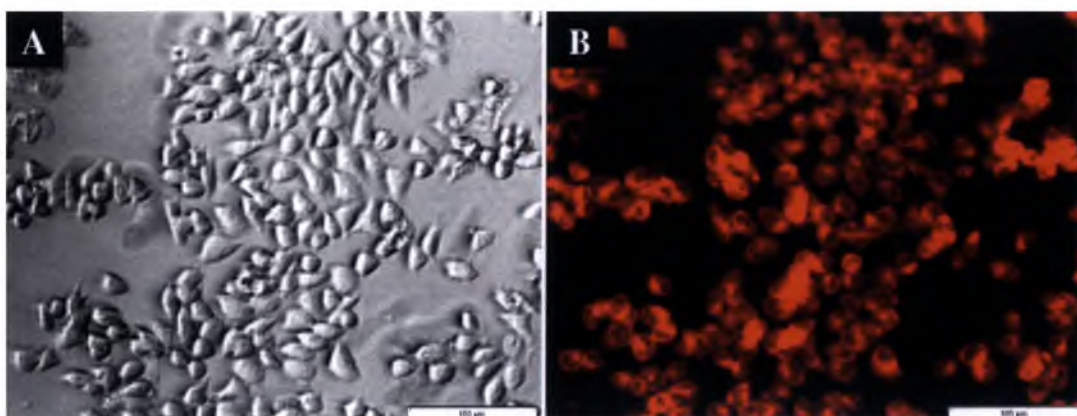
Jak wspomniano wcześniej akumulacja fotouczulacza zachodząca selektywnie w chorej tkance jest kluczowa dla terapii PDT, gdyż naświetlenie nie powoduje uszkodzenia tkanek zdrowych. Selektywność dystrybucji PpIX między tkanką chorą i zdrową spowodowana jest różnicami w aktywności enzymów regulujących powstawanie hemu. Pierwsza wzmianka na ten temat została opublikowana w 1984 roku [50]. Od tamtego czasu powstawało wiele prac traktujących o wpływie enzymu FECH na selektywność gromadzenia PpIX w guzie. Mimo, że niektóre z nich wzbudzają spory i kontrowersje [51], większość badań wydaje się potwierdzać tezę, iż komórki nowotworowe charakteryzują się mniejszą aktywnością FECH, dlatego obserwuje się w nich wzrost stężenia PpIX [52]. Zarówno FECH, jak i zawartość wewnątrzkomórkowego żelaza, są kluczowe dla przemiany PpIX w hem. Przemiana ta z kolei jest najważniejszym etapem akumulacji PpIX w guzie [53]. Mechanizm ten potwierdza na przykład Ohgari i wsp., analizując znaczenie FECH w akumulacji PpIX w komórkach z nadekspresją tego enzymu [54]. Wyniki dowodzą, że komórki takie są obojętne na naświetlanie, ponieważ nie wykazują zwiększonej akumulacji fotouczulacza. Porównanie linii komórek zdrowych i nowotworowych wykazuje, że te ostatnie wykazują zmniejszoną aktywność FECH, przy czym poziom PBGD jest porównywalny dla wszystkich linii. Zdania na temat wpływu innych enzymów szlaku syntetycznego hemu są podzielone. Niektórzy autorzy przypisują znaczenie zwiększonej aktywności UROS [55], inni sądzą, że kluczowe znaczenie ma zwiększona aktywność PBGD [56]. Najnowsze wyniki wskazują, że powodem zwiększenia akumulacji PpIX w guzie jest zwiększenie ekspresji enzymów biorących udział w procesie tworzenia PpIX takich jak PBGD, UROS CPOX, podczas gdy zwiększenie ekspresji PPOX nie ma żadnego wpływu.

Ponadto komórki nowotworowe wykazują zwiększone przyswajanie ALA, dlatego obserwuje się w nich większe stężenie PpIX niż w komórkach normalnych [57]. Kolejnym czynnikiem odpowiedzialnym za akumulację PpIX w guzie jest tlenek azotu NO, który wraz z malejącą aktywnością ferrochelatazy, powoduje wzrost stężenia fotouczulacza w tkance dotkniętej nowotworem [58]. NO reaguje z cząsteczkami zawierającymi żelazo, co prowadzi do zubożenia komórki w ten mikroelement [59]. W komórkach ubogich w żelazo aktywność FECH jest niska, dlatego są one bardziej podatne na naświetlanie wskutek zwiększonej akumulacji PpIX [54].

2.6. Czynniki wpływające na syntezę PpIX przy egzogennym dodaniu ALA

Biosynteza hemu jest niezwykle czuła na wiele czynników, z których kilka podlegać może jednoczesnym zmianom w celu zwiększenia stężenia PpIX w komórkach. Są to:

- pH – najbardziej sprzyjające powstawaniu PpIX jest środowisko w którym wartość pH ustala się w zakresie 7,0 - 7,6. W tym zakresie cząsteczki ALA najlepiej wnikają do komórek. Ponadto takie pH powoduje spadek aktywności enzymów odpowiedzialnych za syntezę hemu. Powyżej wartości pH równej 7,6 obserwuje się również spadek żywotności komórek, co w naturalny sposób zmniejsza stężenie PpIX [60–62].
- Temperatura i obecność tlenu – w warunkach zwiększonej temperatury oraz dostatecznie dużej ilości tlenu komórki produkują więcej PpIX. Jest to związane ze wzmożeniem kinetyki reakcji tworzenia PpIX oraz efektami związanymi z hipoksją komórki [63–65].
- Stopień konfluencji – największe stężenie PpIX zostaje osiągnięte przy dużej gęstości komórek [21]. W obrazach z mikroskopu fluorescencyjnego (Rysunek 3) obserwuje się zwiększenie stężenia PpIX na brzegach komórek, co jest wynikiem jej wiązania się z białkami adhezyjnymi [66]. Skutkuje to zahamowaniem szlaku powstania hemu, ze względu na fakt, iż ferrochelataza jest związana z wewnętrzną błoną mitochondrium [67].



Rysunek 3

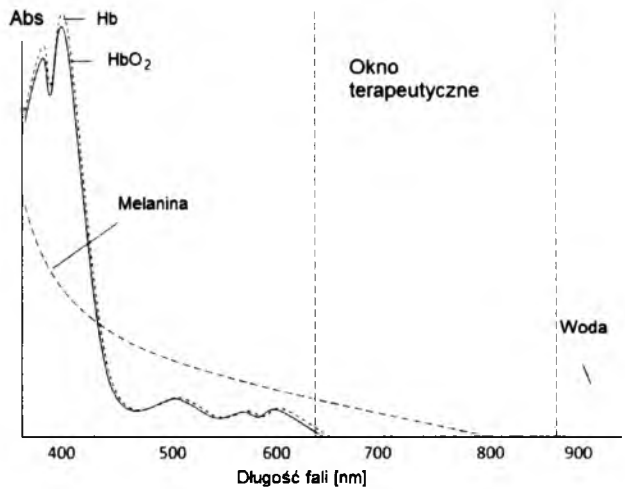
Komórki linii HCT116 +/- po 24h inkubacji z 1000 μM roztworem ALA,
A - kontrast fazowy, B - fluorescencja PpIX, skala 100 μm

- Postać podawanego proleku – bardziej lipofilowe estry ALA są skuteczniejsze w terapii ze względu na lepsze wnikanie, a co za tym idzie dostarczenie substratów do reakcji syntezy PpIX [60]. Jest to związane z biodystrybucją leku, która jest ściśle powiązana z jego lipofilowością.
- Skład pożywki hodowlanej; jej zubożenie w glukozę – powoduje wzrost stężenia PpIX [68].
- Rodzaj linii komórkowej – najwięcej PpIX produkują komórki szybko dzielące się, o dużych rozmiarach, dużej liczbie mitochondriów oraz o zwiększonej aktywności enzymów odpowiedzialnych za syntezę PpIX [53], [61]. Komórki wolno dzielące się (np. fibroblasty) mają niską aktywność metaboliczną, co również wiąże się z niską aktywnością enzymów biorących udział w tworzeniu PpIX [69]. Komórki przewodu pokarmowego, w tym komórki jelita, wykazują zmniejszoną ekspresję ferrochelatazy, dlatego produkują więcej PpIX niż komórki innego typu [70]. Potwierdzeniem są badania dotyczące zredukowania aktywności tego enzymu przez cząsteczkę si-RNA, co skutkuje wzrostem stężenia PpIX [71].
- Dostępność jonów żelaza - zastosowanie chelatorów kompleksujących jony żelaza powoduje wzrost stężenia PpIX [72–74]. Rola żelaza w procesach związanych z biosyntezą PpIX zostanie opisana w następnym rozdziale.

2.7. Zastosowanie chelatorów żelaza – terapia ALA-PDT-chelatory

Jak każda metoda leczenia terapia ALA-PDT ma również istotne ograniczenia. Ze względu na dość niską penetrację tkanki, może być stosowana przede wszystkim w leczeniu powierzchniowych zmian nowotworowych skóry [75]. Widmo PpIX charakteryzuje się maksimum absorpcji przy $\lambda = 407$ nm (pasma Soreta), i to ta długość fali jest optymalna dla wzbudzenia. Jednakże ze względu na słabe wnikanie do tkanki, promieniowanie poniżej 600 nm jest bardzo nieefektywne w terapii PDT. Dlatego PpIX zostaje wzbudzona falami dłuższymi (pasma Q), z zakresu tzw. „okna terapeutycznego”, czyli obszaru w którym promieniowanie jest najmniej absorbowane przez składniki skóry: wodę, melaninę, hemoglobinę (Hb), czy oksyhemoglobinę (HbO₂) (Rysunek 4) [76].

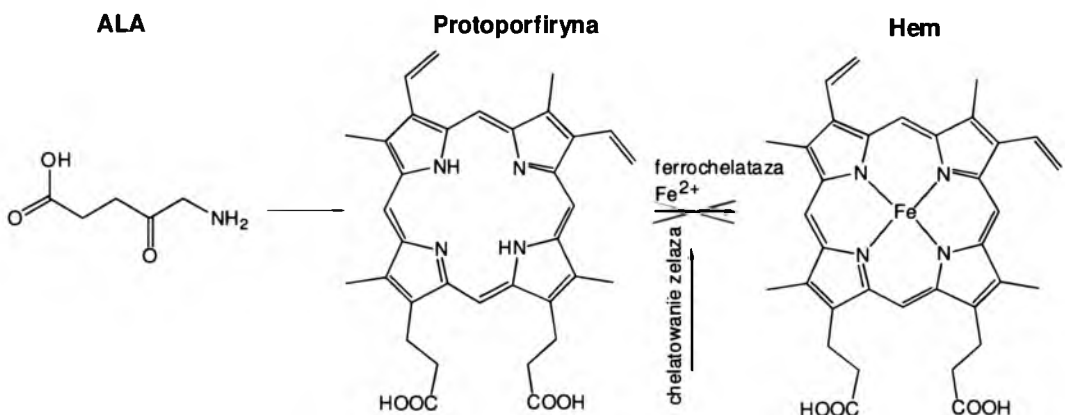
Ponadto biosynteza PpIX w tkance jest często niewystarczająca do osiągnięcia stężeń przydatnych dla zastosowań terapeutycznych. Zrodził się wobec tego pomysł na włączenie do terapii związków kompleksujących jony żelaza. Zastosowanie chelatorów ma w zamyśle związanie żelaza, hamując tym samym syntezę hemu, przez co zwiększa się ilość PpIX w guzie.



Rysunek 4

Widmo absorpcji HbO₂, Hb, melaniny oraz wody z zaznaczeniem „okna terapeutycznego” [76]

Na poniższym schemacie 2 przedstawiono biosyntezę hemu, którego substratem jest kwas 5-aminolewulinowy [77]. Wzbogacenie terapii w chelatory żelaza powoduje wzrost intensywności gromadzenia fotouczulacza w chorej tkance, a co za tym idzie zwiększenie efektywności leczenia. Przegląd najnowszej literatury wskazuje na rosnące zainteresowanie zastosowaniem chelatorów w terapii ALA-PDT [69], [77–80]. Badania dowodzą, iż najskuteczniejszymi chelatorami wywołującymi efekt wzrostu stężenia fotouczulacza w guzie są takie, które charakteryzują się niską masą cząsteczkową oraz dużą lipofilowością, co jest związane z przechodzeniem przez błony komórkowe i wiązaniem wewnątrzkomórkowego żelaza [22].

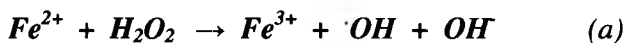


Schemat 2

Uproszczony schemat syntezy hemu z zaznaczeniem wpływu chelatora

2.8. Rola i metabolizm żelaza

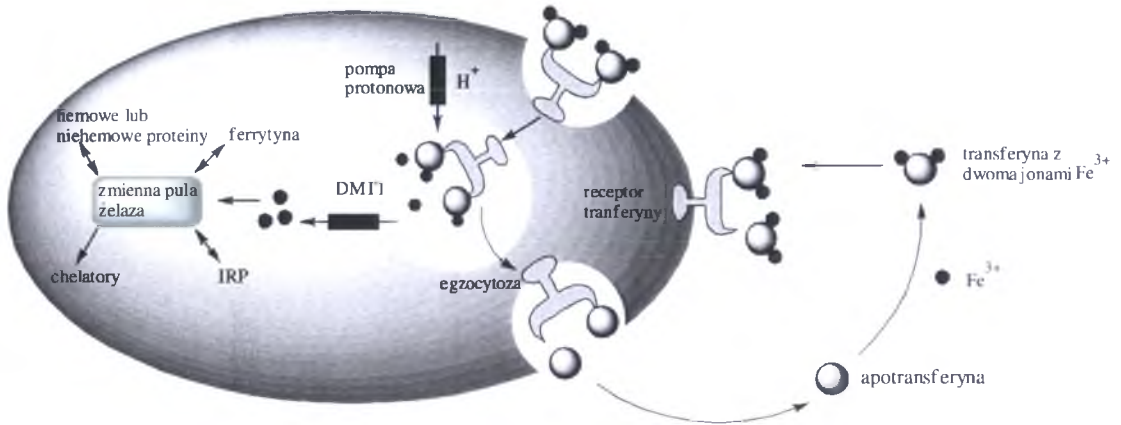
Żelazo jest mikroelementem niezbędnym do funkcjonowania organizmu. Jako takie bierze udział w wielu ważnych procesach biologicznych oraz jest składnikiem istotnych białek jak hemoglobina, mioglobina oraz enzymów jak np. katalazy, reduktazy rybonukleotydowej, peroksydazy i cytochromów [81]. Kontrola metabolizmu żelaza jest bardzo istotna. Jego nadmiar może być bowiem toksyczny, a niedobór powoduje różnego rodzaju upośledzenia. Jony żelaza katalizują dwie bardzo ważne reakcje – Fentona (a) i Habera-Weissa (b), w których powstają wolne rodniki powodujące uszkodzenia protein, lipidów i DNA [82].



Ze względu na generowanie reaktywnych form tlenu w powyższych reakcjach organizmy wytworzyły mechanizm obronny związany z transportem i magazynowaniem tego pierwiastka w formie nietoksycznej [83]. Białkiem odpowiedzialnym na transport żelaza jest transferyna [84]. Jego magazynowaniem zajmuje się ferrytyna i hemosyderyna [85]. Żelazo dostarczone w diecie w formie Fe^{2+} zostaje wchłonięte przez enterocyty dwunastnicy. Należy w tym miejscu wspomnieć, że duża ilość żelaza pozyskiwana jest z makrofagowego rozkładu erytrocytów. W procesie zachodzącym w przewodzie pokarmowym uczestniczy transporter metali dwuwartościowych - DMT1 (*ang.* divalent metal transporter) [86]. W przemianie tej następuje utlenienie i związanie żelaza przez ferrytynę, która z kolei przekazuje je transferynie, zdolnej do związania dwóch atomów żelaza. Transferyna transportuje żelazo do komórek. Na powierzchni błony komórkowej znajdują się jej receptory, które wiążą kompleks transferyna-jony żelaza i na drodze endocytozy przekazują je do wnętrza komórki. Spadek pH we wnętrzu pęcherzyka powoduje odłączenie się jonu żelaza od transferyny, która następnie w formie apotransferyny (forma bez jonów żelaza) zostaje wydalona z komórki, a jony żelaza są redukowane i mogą być wykorzystane przez organizm [82], [87] (Rysunek 5).

Dalszy metabolizm żelaza może obejmować kilka wariantów:

- włączanie do protein hemowych bądź niehemowych
- wiązanie przez ferrytynę
- wiązanie przez chelatory
- udział w potranskrypcyjnym mechanizmie regulacji komórkowego metabolizmu żelaza (IPR)



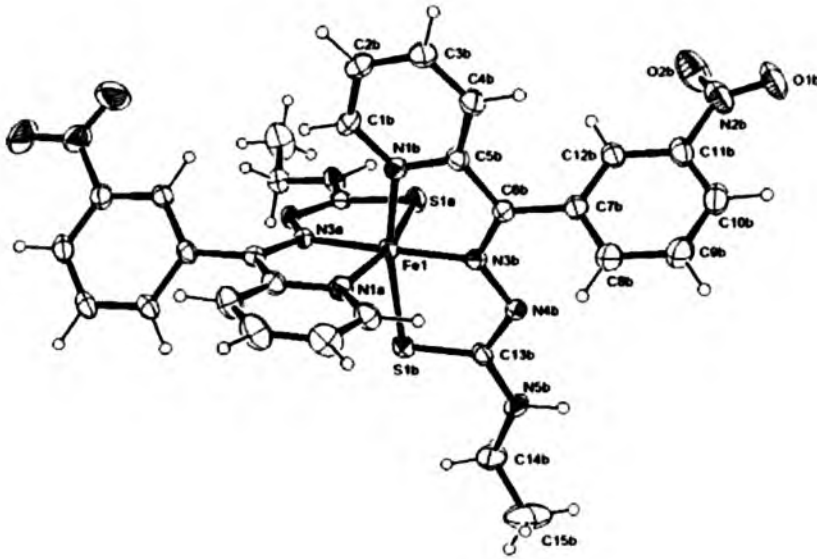
Rysunek 5

Transport żelaza w komórce wg [87]

Metabolizm żelaza kontrolowany jest przez białka regulujące IRP1 i IRP2 (*ang.* iron regulatory protein), które wiążą się do sekwencji RNA określanych jako IRE (*ang.* iron responsive element), powodując zahamowanie procesów związanych z transportem i dostarczaniem żelaza do komórek. Niedobór żelaza powoduje wiązanie się białek regulacyjnych z sekwencjami IRE obecnymi w obszarach nieulegających translacji (*ang.* untranslated region; UTR) 5' mRNA ferrytyny oraz 3' mRNA receptora transferyny [81]. W przypadku, gdy żelazo jest w nadmiarze proces jest odwracalny. W konsekwencji odpowiedzią na niskie stężenie żelaza jest zwiększona ekspresja DMT1 i receptora transferyny oraz zahamowanie aktywności transferyny [88]. Innym mechanizmem regulującym wewnątrzkomórkowy poziom żelaza jest mechanizm związany z syntezą hepcydyny [89].

2.9. Mechanizm działania pochodnych tiosemikarbazonu

Tiosemikarbazony są atrakcyjnym przedmiotem badań innowacyjnych terapii przeciwnowotworowych ze względu na ich wielopłaszczyznowe działanie. Z jednej strony ich kompleksy z żelazem generują wewnątrz komórki wolne rodniki, powodując jej zniszczenie, z drugiej, zwiążanie żelaza pozbawia komórki ważnego składnika, niezbędnego do proliferacji [90]. Komórki nowotworowe, w odróżnieniu od zdrowych,



Rysunek 6

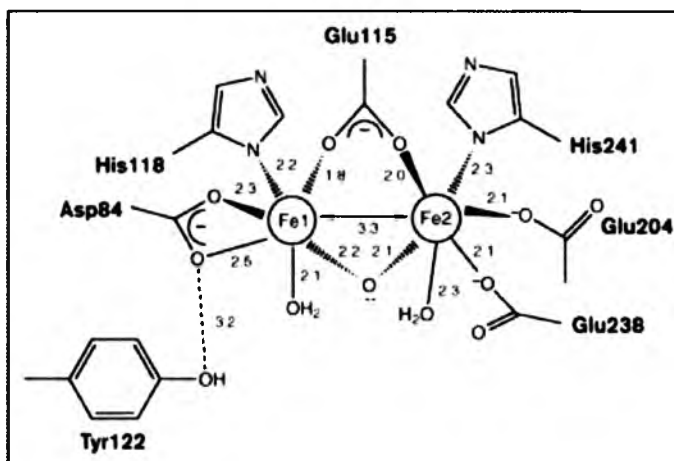
Kompleks żelaza z pochodną ketonu di-2-pirydylowego [90]

wykazują zwiększone zapotrzebowanie na żelazo, posiadając więcej receptorów transferyny na swej powierzchni [91]. Zwiążanie żelaza w formie kompleksu (Rysunek 6), powoduje zablokowanie transportu tego mikroelementu. Jest to również powodem zablokowania ekspresji ferrochelatazy, która w swej strukturze zawiera klaster [2Fe-2S], ponieważ jej aktywność jest ściśle powiązana z zawartością wewnątrzkomórkowego żelaza [92]. Zaburzenie gospodarki tego metalu w organizmie powoduje również zatrzymanie się cyklu komórkowego na etapie interfazy G₁/S [93]. Do prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego wymagany jest szereg białek i enzymów, których aktywność jest ściśle powiązana ze stężeniem żelaza. Interfaza cyklu komórkowego składa się z fazy G₁- pomiędzy końcem mitozy a rozpoczęciem syntezy DNA, fazy S – obejmującej syntezę DNA, oraz fazy G₂ - pomiędzy końcem syntezy DNA a początkiem mitozy [94]. Do przebiegu tych faz niezbędne są cykliny oraz

odpowiadające im kinazy białkowe (CDKs). Ich nazwa CDKs (*ang.* cyclin-dependent kinases) pochodzi stąd, iż ich aktywność jest zależna od cyklin, które same nie posiadają aktywności enzymatycznej [40]. Zbyt małe stężenie żelaza powoduje inaktywację niektórych cyklin i kinaz białkowych, co z kolei skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego. Efekt chelatacji powoduje również zwiększenie aktywności genów NDRG1 oraz BNIP3, odpowiedzialnych m.in. za inicjowanie apoptozy komórek nowotworowych [82].

Tiosemikarbazony tworzą z jonami żelaza toksyczne kompleksy, co jest kolejnym, bardzo ważnym czynnikiem, powodującym degradację komórki [95]. Żelazo posiada zdolność występowania w dwóch formach na różnych stopniach utlenienia: Fe^{2+} oraz Fe^{3+} , przy czym formy te są bardzo podobne strukturalnie. Kompleksy Fe^{2+} i Fe^{3+} z tymi samymi ligandami są również niemal identyczne pod względem struktury. Analogie strukturalne umożliwiają uczestniczenie w wielu reakcjach redoks, które nie mogłyby zajść w przypadku różnic w sferze koordynacji. To właśnie zdolność do uczestniczenia w reakcjach redoks warunkuje biologiczną aktywność kompleksów tiosemikarbazonów [82]. Bezpośrednią konsekwencją jest zahamowanie aktywności reduktazy rybonukleotydowej (RR), która ze względu na wysoką ekspresję w komórkach nowotworowych jest atrakcyjnym celem chemioterapii [96]. Tworzenie DNA opiera się na kilkietapowym procesie, w którym biorą udział deoksyrybonukleotydy. Ich synteza jest regulowana przez reduktazę, zbudowaną u

ssaków z dwóch podjednostek R1 i R2, mających swój wkład w centrum aktywne enzymu. Podjednostka R2 (Schemat 3) zawiera dwa atomy żelaza oraz wolny rodnik tyrozylowy, którego destabilizacja, przez reaktywne formy tlenu, powoduje zahamowanie katalitycznej zdolności enzymu reduktazy [97], [98].



Schemat 3

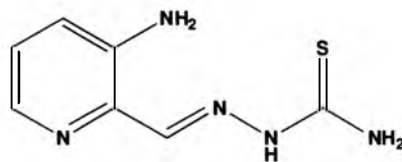
Podjednostka R2 z zaznaczeniem koordynacji jonów żelaza (odległości w Å) [98]

Badania wykazały, że samo związanie żelaza nie wystarczy by chelator okazał się aktywny. Dopiero połączenie efektu chelatowania żelaza oraz tworzenia cytotoksycznych, aktywnych kompleksów redoks pozwala na uzyskanie chelatorów o potencjalnej aktywności w terapiach przeciwnowotworowych. Zdolność chelatowania żelaza przez tiosemikarbazony wiąże się z obecnością tzw. „miękkich” atomów donorowych. Tak więc obecność atomu siarki sprzyja wzrostowi aktywności biologicznej w porównaniu do analogów z atomami tlenu, który jest „twardym” donorem [82], [99].

2.10. Chelatory żelaza w terapii antynowotworowej

Związki mające zdolność kompleksowania jonów metali, w tym żelaza, są niezwykle skuteczne w chemoterapii komórek nowotworowych [87], [100], [101]. Podział tej grupy związków może zostać dokonany z uwzględnieniem różnych kryteriów, ponieważ do chelatorów żelaza zaliczają się siderofory, produkowane przez mikroorganizmy, białka, etery koronowe oraz cała gama syntetycznie wytworzonych związków [102]. W rozdziale tym zostaną opisane najważniejsze z nich.

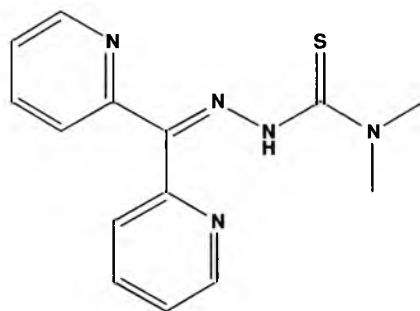
Tiosemikarbazony – oprócz właściwości antynowotworowych posiadają szerokie spektrum aktywności związane z ich działaniem antybakteryjnym, antywirusowym oraz przeciwgrzybiczym [82]. Związki te charakteryzują się dużym powinowactwem nie tylko do jonów żelaza, ale również miedzi, kobaltu, cynku czy niklu



Rysunek 7
Triapina

[103–105]. Jak wspomniano wcześniej mechanizm działania tej grupy związków związany jest m. in. z zahamowaniem ekspresji RR [106] [107]. Inhibicji ulega również topoisomeraza II [108]. Przeciwnowotworowe działanie tiosemikarbazonów związane jest również z zahamowaniem czynności białka MDR1 [109] oraz generowaniem reaktywnych form tlenu [110]. Popularnym lekiem opartym na strukturze tiosemikarbazonu jest **Triapina** (Rysunek 7). Lek ten, dopuszczony do II fazy badań klinicznych [111–114], właśnie uzyskał ich pozytywny wynik. Jest szczególnie skuteczny w zwalczaniu nowotworów białaczki, płuca oraz jajników [115]. Kombinacja Triapiny z innymi cytostatykami skutkuje zwiększeniem efektywności leczenia.

Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego synergistycznego działania jest fakt, iż lek ten hamuje procesy naprawy DNA, za którego zniszczenie odpowiedzialne są terapie stosowane w leczeniu skojarzonym [115], [116]. Kolejnym związkiem zawierającym w swej strukturze układ charakterystyczny dla tiosemikarbazonów jest **Dp44mT** (Rysunek 8).

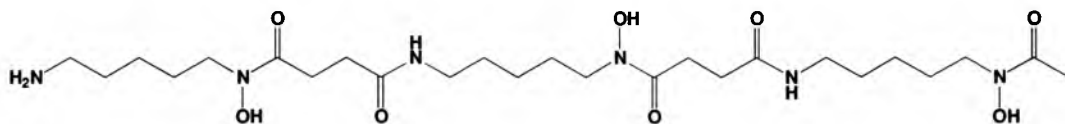


Rysunek 8

Dp44mT

Badania nad pochodną ketonu di-2-pirydylowego, przeprowadzone przez autorkę niniejszej pracy, potwierdzają wysoką skuteczność w zwalczaniu komórek nowotworowych. Zbadano również wpływ Dp44mT na ludzkie komórki typu fibroblastów, które potwierdziły wcześniejsze badania dotyczące selektywności tego związku [93], [117], [118]. Pomimo dużej aktywności przeciwnowotworowej przejawiającej się w wyzwaniu apoptozy komórek nowotworowych [119], badania *in vivo* potwierdziły, iż związek ten wykazuje kardiotoksyczność [93]. Kolejnym krokiem była więc modyfikacja struktury wiodącej w celu uzyskania równie skutecznych pochodnych, z jednoczesnym zminimalizowaniem skutków ubocznych ich stosowania. Wstępne badania nad kolejną serią opartą na strukturze 2-benzoilopirydyny potwierdziły zachowanie wysokiej skuteczności antynowotworowej [120] tej grupy związków, z jednoczesnym zminimalizowaniem efektów związanych z uszkodzeniem mięśnia sercowego [121], [122].

Deferoksamina (DFO) (Rysunek 9) – popularny lek stosowany w leczeniu chorób związanych z zaburzeniem gospodarki żelazem np. β -talasemii [123]. Ten bakteryjny siderofor jest sześciowiązalnym ligandem z dużym powinowactwem do jonów żelaza. Skuteczny w leczeniu takich nowotworów jak nerwiak płodowy i białaczka [124–126], z jednoczesnym zachowaniem selektywności w stosunku do zdrowych komórek [127]. Mechanizm antynowotworowego działania DFO nie jest do

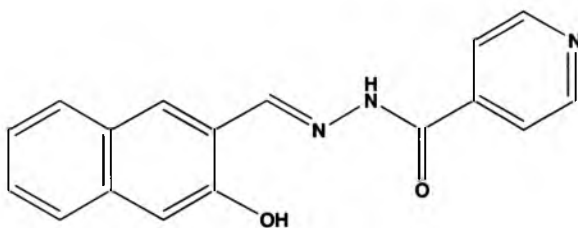


Rysunek 9

DFO

końca poznany. Tak jak w przypadku tiosemikarbazonów jest on związany z inhibicją aktywności RR, jednak składa się z kilku czynników. Jednym z nich jest zaburzenie cyklu kwasu cytrynowego, fosforylacji oksydacyjnej oraz oddychania komórkowego [128].

Aromatyczne hydrazony – przykładem związku tego typu jest pochodna o nazwie **311** (Rysunek 10), wykazująca duże powinowactwo do wiązania jonów żelaza skutkujące hamowaniem proliferacji komórek nowotworowych [129], [130].



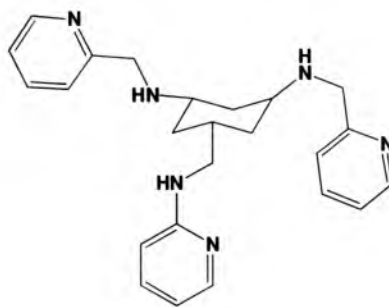
Rysunek 10

311

Rezultatem porównania aktywności

tej pochodnej z szeroko stosowaną DFO było zwiększenie skuteczności działania w stosunku do komórek nowotworowych [131]. Otrzymana struktura krystalograficzna oraz badania na liniach komórek nowotworowych dowodzą innego mechanizmu działania niż generowanie wolnych rodników [132]. Korzystna wartość współczynnika logP opisującego lipofilowość pochodnej 311 może być prawdopodobną przyczyną wysokiej aktywności tego związku. Istotny wkład w wysoką skuteczność ma również wpływ na czynniki regulujące cykl komórkowy [116].

Tachpyr (Rysunek 11) – zwyczajowa nazwa pochodnej cis-1,3,5-triaminocykloheksanu. Badania przeprowadzone na komórkach nowotworu pęcherza moczowego dowiodły około 15 – krotnie większej skuteczności w porównaniu do DFO [133]. Związek ten posiada sześć miejsc mogących utworzyć wiązanie koordynacyjne z jonami metali takimi jak żelazo, miedź czy cynk [134].



Rysunek 11

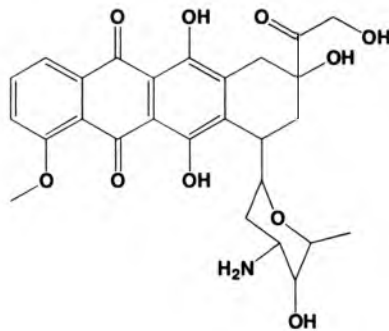
Tachpyr

Mechanizm działania opiera się na zahamowaniu

cyklu komórkowego na etapie fazy G₂, która jest szczególnie podatna na działanie promieniowania jonizującego, dlatego też podanie opisywanej pochodnej znacznie zwiększało efekty leczenia [135]. Zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych spowodowane było również zahamowaniem syntezy ferrytyny [133], co było konsekwencją inicjowania szlaków śmierci apoptotycznej [136]. Apoptoza następowała w sposób niezależny od białka p53, co w świetle zastosowania w terapii nowotworowej

jest niezwykle korzystne [137]. W odróżnieniu od związku 311, kompleksy tej pochodnej pirydyny z jonami żelaza posiadały potencjał cytotoksyczny w wyniku generowania reaktywnych form tlenu [116].

Dokсорubicyna (Rysunek 12) – szeroko stosowany w wielu typach nowotworów cytostatyk z rzędu antracyklin. Przeciwnowotworowe działanie tego leku jest złożone, jednak najważniejszym czynnikiem jest utworzenie trwałego kompleksu z helisą DNA [138–141]. Ze względu na dość wysoką kardiotoxycznosc dokсорubicyny najczęściej jest ona stosowana w leczeniu skojarzonym (np. z DFO), w którym inne leki minimalizują skutki uboczne jej stosowania [142], [143].



Rysunek 12
Dokсорubicyna

2.11. Synergia farmakologiczna

Omówione wcześniej zagadnienia dotyczące mechanizmów działania fotouczulaczy oraz tiosemikarbazonów dowodzą wysokiej skuteczności tych związków w hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych. Połączenie dwóch lub kilku metod terapeutycznych bądź leków prowadzić może do synergii ich działania. Oznacza to, że sumaryczny efekt działania jest wyższy dla połączonej terapii niż dla każdej z terapii oddzielenie [144]. Obecnie badania dotyczące zastosowania kombinacji leków cieszą się dużym zainteresowaniem, o czym świadczy rosnąca liczba publikacji traktujących o tym zagadnieniu (PubMed - „synergy” 13359 rekordów, „drug combination” 362503 rekordów). Ostatni termin jest przy tym nieco szerszy niż synergia i obejmować może różne typy skojarzonego działania leków. Problem synergii jest tak popularny ze względu na korzyści, które uzyskać możemy ze skojarzonego działania substancji aktywnych m.in.:

- zwiększenie skuteczności leków, co prowadzi do wzrostu ich efektu terapeutycznego,
- zmniejszenie dawki z jednoczesnym utrzymaniem skuteczności,
- zmniejszenie ewentualnej toksyczności,
- zmniejszenie lub spowolnienie uodpornienia na lek,

- działanie skierowane na kilka celów molekularnych, bądź kilka chorób równocześnie,
- wykorzystanie różnych mechanizmów działania poszczególnych leków [145].

Modelowanie synergii opiera się na fizykochemicznym prawie działania mas. Model opisujący synergję opiera się na czterech fundamentalnych równaniach Hendersona-Hasselbalcha, Michaelisa-Mentena, Hilla oraz Scatcharda [146]. Podstawowym parametrem jest tzw. współczynnik kombinacji CI (*ang.* combination index) określający rodzaj interakcji farmakologicznej w jaką wchodzi dwa leki. Równanie łączące dawkę leków oraz efekt jej działania przybiera formę jak pokazano poniżej [147], [148]:

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m} \right)^m,$$

gdzie: D – dawka leku,

f_a – ilość populacji na którą oddziałuje dana dawka,

f_u – ilość populacji na którą nie oddziałuje dana dawka,

D_m – dawka powodująca 50 % „efekt”

m – współczynnik opisujący kształt krzywej dawka – efekt.

CI dla kombinacji n leków wyrażany jest wzorem:

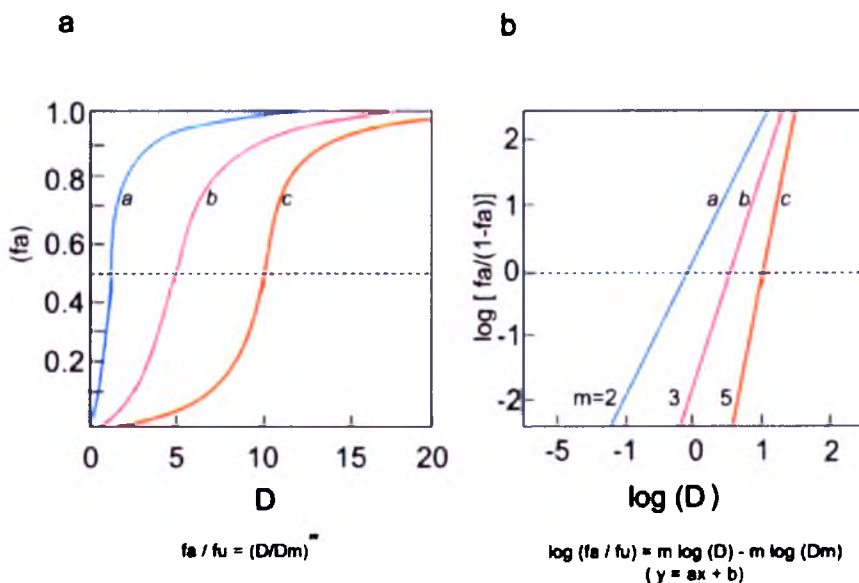
$${}^n(CI)_x = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j},$$

gdzie: D – dawka leku,

D_x – dawka powodująca 50 % „efekt”.

Kiedy $CI < 1$ obserwuje się synergję. Wartość $CI = 1$ oznacza efekt addytywny, natomiast $CI > 1$, antagonizm. W celu określenia czy dane połączenie terapeutyków ma działanie synergistyczne należy określić kształt krzywej dawka – efekt, który pozwala na wyznaczenie parametru m oraz D_m . Wykres zależności efektu od stosowanej dawki w postaci logarytmicznej pokazany na Schemacie 4 pozwala na wyznaczenie powyższych parametrów [145]. Obliczenie CI jest stosunkowo proste kiedy wartości dawek wyrazi się w formie bezwymiarowej, wówczas poszczególne dawki mogą być przedstawione w dowolnych jednostkach. Obliczenia nie wymagają znajomości struktury leków, ich masy cząsteczkowej, ani mechanizmów ich działania. Znajomość

stosowanej dawki i efektu jej działania jest w pełni wystarczająca dla określenia typu oddziaływania w terapii kombinowanej. Warto w tym miejscu podkreślić empiryczny charakter tak sformułowanego zagadnienia synergii bądź antagonizmu, których wyznaczenie musi zostać określone eksperymentalnie [92], [147]. Należy również zwrócić uwagę, iż wzrost działania wynikający z kombinacji dwóch czynników, który jest większy niż osobne działanie pojedynczych, nie zawsze oznacza synergizm [145].



Schemat 4

- a) zależność sigmoidalna dawka – efekt,
- b) zależność liniowa dawka – efekt [145]

Istotne znaczenie w synergii odgrywa obniżenie dawki leku opisane tzw. współczynnikiem redukcji dawki DRI (*ang.* dose reduction index), który określa ilu krotnie można zmniejszyć dawkę leku, aby osiągnąć rezultat porównywalny do działania każdego leku z osobna. Pozwala to na minimalizację skutków ubocznych, z jednoczesnym zachowaniem skuteczności. Współczynnik DRI dla kombinacji dwóch leków określa wzór:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{1}{(DRI)_1} + \frac{1}{(DRI)_2},$$

stąd;

$$DRI_1 = \frac{(D_x)_1}{(D)_1},$$

gdzie: D – dawka leku, D_x – dawka powodująca 50 % „efekt”.

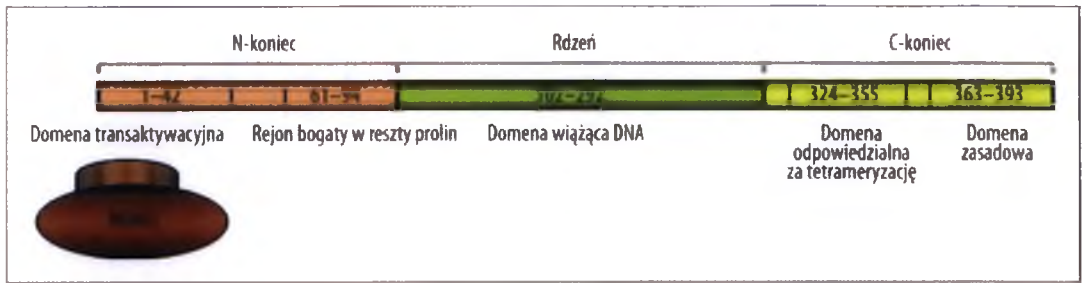
W celu ustalenia maksymalnej synergii prowadzi się eksperymenty mające na celu określenie optymalnej proporcji łączonych terapeutyków. Leki podawane są w różnych proporcjach, a następnie wybiera się tę, która odpowiada maksymalnemu działaniu synergicznemu. Rodzaj oddziaływania może zostać przedstawiony w graficznej postaci poligonogramu [145].

Badanie terapii kombinowanej *in vitro* nie stanowi problemu - jest stosunkowo szybkie, tanie, powtarzalne i dokładne. Badania *in vivo* są trudniejsze. Natomiast kliniczne zastosowanie terapii kombinowanej stanowi już znacznie bardziej złożony problem. Przyczyną jest w tym wypadku:

- duże zróżnicowanie pacjentów pod względem płci, wieku, rasy, historii choroby oraz stopnia jej zaawansowania
- problemy etyczne np. w stosunku do stosowania placebo bądź dawki suboptymalnej (mniejszej od standardowo przyjętej)
- brak możliwości nieograniczonego manipulowania dawką śmiertelną

2.12. Rola białka p53 w biochemii nowotworów

Białko p53 pełni niezwykle ważną rolę w ludzkim organizmie. Proteina ta jest kodowana przez gen supresorowy TP53, pełniący funkcje związane z hamowaniem nadmiernej proliferacji, regulacją cyklu komórkowego oraz naprawą DNA [149]. Mutacje w genie TP53 powodują powstawanie różnych rodzajów nowotworów. Nazwa białka p53 pochodzi od jego masy cząsteczkowej, a dokładnie od wzorca o masie 53 kDa, którego migracja w przyłożonym polu elektrycznym odbywa się analogicznie. W rzeczywistości masa p53 jest nieco mniejsza, a różnica związana jest z jego specyficzną budową. Najważniejsza funkcja p53 związana jest z indukowaniem apoptozy, będącej odpowiedzią komórki na uszkodzenia nici DNA, stres oksydacyjny oraz sygnały związane z różnymi mutacjami. W zależności od stopnia uszkodzeń białko p53 wyzwała w komórce mechanizmy naprawcze lub, w przypadku zbyt rozległych mutacji, uruchamia szlaki apoptotycznej śmierci komórki [150]. Wszystkie wymienione procesy mające na celu zahamowanie szlaków związanych z powstawaniem nowotworu są wyzwalane przez cały szereg genów, których aktywacja zachodzi pod wpływem p53. Do genów tych należą: CDKN1A i GADD45, związane z zahamowaniem cyklu



Schemat 5

Struktura pierwszorzędowa p53 [151]

komórkowego oraz naprawą DNA, oraz geny związane z inicjowaniem procesów apoptozy, takie jak BAX, CD95, DR5/KILLER, NOXA, PIG3, PUMA i inne [151]. Struktura pierwszorzędowa p53, przedstawiona na Schemacie 5, uwzględnia podział na poszczególne domeny odpowiedzialne za różne procesy. N-terminalny koniec proteiny odpowiada za wyzwalanie apoptozy poprzez oddziaływanie z różnymi białkami [152]. Domena wiążąca DNA, jak jej nazwa wskazuje, steruje procesami związanymi z przyłączeniem do helisy DNA, natomiast C-terminalny koniec pełni funkcje regulatorowe m. in. związane z przybieraniem aktywnej postaci tetrameru [153–155]. W wielu pracach zostały przedstawione badania dowodzące zwiększonego stężenia białka p53 w komórkach dotkniętych nowotworem [156], [157]. W komórkach prawidłowych poziom p53 jest utrzymywany na stałym, niskim poziomie, a samo białko związane jest w postaci nieaktywnego kompleksu przez białko MDM2 [151]. Liczne doniesienia wskazują, iż aktywność opisywanej proteiny jest zahamowana w komórkach dotkniętych mutacją nowotworową. Przywrócenie aktywności przez niektóre związki powoduje zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych [158]. W pierwszej fazie badań klinicznych znajdują się związki o nazwie nutliny, które poprzez wiązanie się z MDM2 hamują jego interakcję z p53 [159]. Innymi związkami mającymi podobne działanie są spiro-oksindole, powodujące zaburzenia w kompleksie p53-MDM2 [160]. Z kolei związek o nazwie RITA zapobiegał tworzeniu się wspomnianych kompleksów poprzez interakcję z p53 [161]. Istnieje jeszcze kilka związków mających działanie powodujące aktywację p53 [162], [163], jednak szczególną uwagę należy zwrócić na antybiotyk o nazwie aktynomycyna D. Obecnie lek ten został dopuszczony do stosowania, a jego działanie związane jest z uwalnianiem białek RPL11 i RPL5, wiążących białko MDM2 [164]. Interakcja z białkiem p53 zachodzi również w przypadku PpIX (Rysunek 3), co skutkuje wywoływaniem apoptozy w komórkach poddanych terapii PDT [165]. Najnowsze badania wskazują

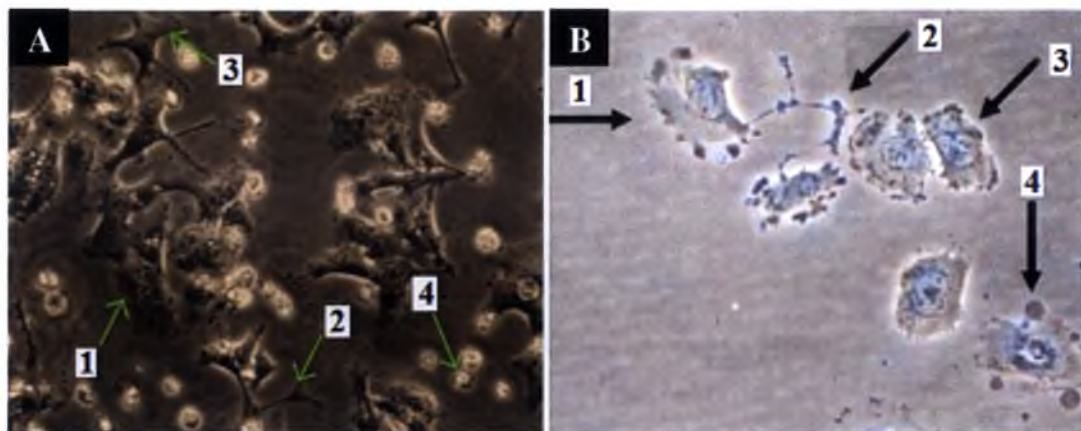
analogię w indukowaniu apoptozy przez białko p53 oraz jego pochodną p73 [166]. Podobieństwo strukturalne tych dwóch protein warunkuje przejmowanie niektórych funkcji w komórce, w tym procesów związanych z wyzwalaniem szlaków śmierci apoptotycznej [167]. Obecnie badania nad tym mało poznanym homologiem białka 53 cieszą się dużym zainteresowaniem czyniąc go nowym celem terapii antynowotworowej. Mutacje w genie kodującym białko p73 zachodzą o wiele rzadziej niż w TP53 [168]. Wspomniane wcześniej nutliny, aktywujące białko p53 poprzez interakcję z MDM2, aktywują również p73, co prowadzi do apoptotycznej śmierci komórek linii nowotworu jelita grubego pozbawionej genu kodującego p53 [169]. Badania te dowodzą, iż mechanizmy śmierci zachodzące w komórce są niezależne od p53. Odkryto również inne związki działające w sposób analogiczny [170], [171]. W świetle wyników wskazujących na fakt, iż 50 % nowotworów powstaje w wyniku mutacji w genie TP53 poszukiwanie związków aktywujących białko p73 oraz indukujących tym samym apoptozę stanowi nowy, obiecujący cel współczesnej terapii przeciwnowotworowej.

2.13. Mechanizmy śmierci komórkowej oraz wybrane sposoby ich detekcji

Rozważając procesy jakim ulega komórka w kontekście terapii przeciwnowotworowej wyróżniamy pięć rodzajów śmierci komórkowej: apoptoza, autofagia, nekroza, katastrofa mitotyczna oraz starzenie [172].

Apoptoza jest naturalnym procesem polegającym na usunięciu uszkodzonych, martwych bądź nieprawidłowych komórek. Jak dotąd ten rodzaj śmierci komórkowej został najlepiej poznany. Pierwsza praca na ten temat została opublikowana w 1972 roku [173], natomiast 30 lat później została przyznana Nagroda Nobla za badania dotyczące tego zjawiska. Morfologiczny obraz komórek apoptotycznych (Rysunek 13) [174], [175] przedstawia charakterystyczne cechy jak:

- 1) obkurczenie jąder i kondensacja chromatyny
- 2) obkurczenie komórek
- 3) występowanie pęcherzyków na powierzchni błony
- 4) występowanie ciałek apoptotycznych [176]

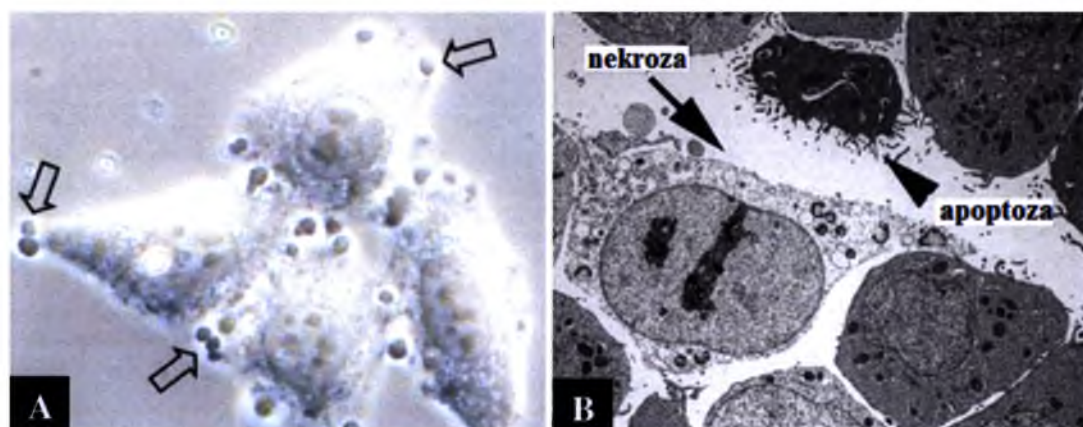


Rysunek 13

Zmiany apoptotyczne w komórkach linii **A** – HCT116 wg [174], **B** - CI80-13S wg [175]

Proces apoptozy zachodzi wg kilku ścieżek. Pierwsza z nich to tzw. zewnętrzny szlak apoptozy zachodzący pod wpływem receptorów błonowych. W komórce zostają pobudzone receptory z rodziny TNF [177], uaktywnione są również niektóre białka z rodziny kaspaz oraz białka adaptorowe [178]. Komórka może również wejść na drogę apoptozy przez tzw. wewnętrzny szlak związany z mitochondrium, który zachodzi m.in. pod wpływem stresu oksydacyjnego oraz reaktywnych form tlenu [179], [180]. W szlaku tym kanaliki mitochondrium ulegają rozluźnieniu, co prowadzi do uwolnienia szeregu białek m. in. cytochrom c oraz białek z rodziny Bcl-2 [181]. Ponadto rozróżnia się jeszcze kilka szlaków aktywowanych np. czynnikami stresu [182], bądź zwiększonym stężeniem ceramidów w komórce [172]. Ponadto w procesie apoptozy następuje zniszczenie takich białek jak aktyna bądź miozyna, co ostatecznie prowadzi do degeneracji DNA przez nukleazy [183]. Apoptoza, w odróżnieniu od nekrozy nie powoduje stanu zapalnego, ponieważ powstające ciała apoptotyczne są szybko fagocytowane [184]. Dotyczy to pojedynczych komórek, a nie, jak w przypadku nekrozy, większej ich liczby bądź całej tkanki. W przypadku gdy równowaga w organizmie zostaje zaburzona, np. poprzez wystąpienie zmian nowotworowych, wówczas proces apoptozy może ulec zahamowaniu, przez co komórki neoplastyczne nie zostają wyeliminowane.

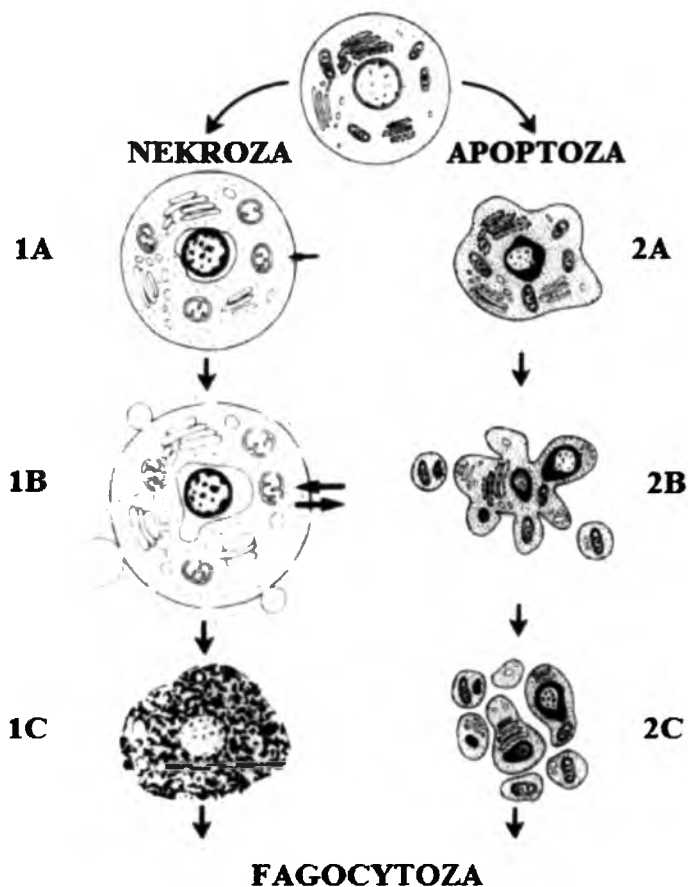
Nekroza jest procesem patologicznym, prowadzącym do wywołania stanu zapalnego. Komórka ulegająca nekrozie pęcznieje, po czym błona komórkowa ulega rozerwaniu i następuje całkowite zniszczenie struktur komórkowych [183]. Morfologiczny obraz zmian charakterystycznych dla nekrozy został przedstawiony na rysunku 14. Zdjęcie A przedstawia charakterystyczne pęcznienie komórki, której treść zaczyna wyciekać, o czym świadczy duża ilość pęcherzyków o różnych rozmiarach obecnych na błonie [185]. Na zdjęciu B przedstawiono obraz komórek linii HCT116 uzyskany przy użyciu mikroskopu elektronowego z rozróżnieniem komórki w stanie apoptozy oraz nekrozy [186].



Rysunek 14

Zmiany nekrotyczne w komórkach linii **A** – HeLa wg [185], **B** – HCT116 wg [186]

Przerwanie ciągłości błony komórkowej skutkuje spadkiem poziomu ATP oraz zwiększeniem stężenia niektórych jonów, jak np. Ca^{2+} co prowadzi do uruchomienia szlaków wiodących do destrukcji komórki [187], [188]. Na schemacie 6 przedstawiono podstawowe różnice w zmianach morfologicznych komórki ulegającej apoptozie i nekrozie [189]. Ostatni etap (1C i 2C) zaliczany jest przez autorów do nekrozy. Pozostałości komórki następnie zostają fagocytowane, jednakże w przypadku szlaku nekrotycznego wiąże się to z wystąpieniem stanu zapalnego. Fagocytoza komórki, której śmierć nastąpiła w wyniku apoptozy przebiega w sposób bardziej łagodny, najczęściej powstałe ciała apoptotyczne zostają usunięte przez makrofagi lub sąsiadujące komórki [189], [190].



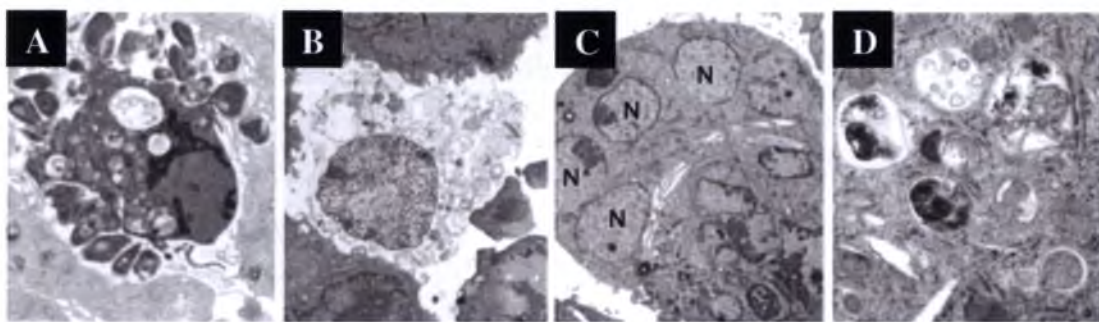
Schemat 6

Różnice w morfologii komórki w stanie **NEKROZY**

(**1A** – pęcznienie, **1B** – wakuolizacja, zwiększona przepuszczalność błony, tworzenie pęcherzyków, **1C** – kurczenie, rozpad jąder) oraz **APOPTOZY** (**2A** – obkurczenie, kondensacja chromaty, **2B** – tworzenie uwypukleń na błonie, rozpad jąder, **2C** – rozpad na ciała apoptotyczne) wg [189]

Kolejny szlak, któremu może ulec uszkodzona komórka to tzw. **katastrofa mitotyczna**. Niektórzy naukowcy klasyfikują ten rodzaj śmierci jako apoptozę bądź nekrozę, prowadzące do zaburzeń mitozy [191–193]. Konsekwencją tego rodzaju śmierci jest zahamowanie podziałów komórkowych. Morfologiczny obraz komórki przedstawia duże komórki z jednym dużym jądrem, bądź z kilkoma mniejszymi, jednak klasyfikacja tylko na podstawie obserwacji morfologii jest niezwykle trudna [194], [195]. W odróżnieniu od typowej apoptozy w przypadku śmierci mitotycznej nie obserwuje się pęknięć nici DNA oraz aktywacji niektórych kaspaz [196], [197].

Autofagia jest rodzajem śmierci komórkowej zachodzącym m. in. w wyniku niedoboru czynników wzrostowych oraz pod wpływem różnego rodzaju uszkodzeń. Proces ten mający na celu wyeliminowanie niepotrzebnych bądź uszkodzonych składników komórki jest zaliczany do drugiego typu zaprogramowanej śmierci komórki i występuje naturalnie w większości tkanek. Tak jak w przypadku apoptozy autofagia również jest kontrolowana przez białka z rodziny Bcl-2[198]. W wyniku tego procesu zbędne składniki zostają otoczone podwójną błoną tworząc autofagosom, który po połączeniu z lizosomem przekazuje mu się zawartość, która następnie zostaje zniszczona przez hydrolizę [192]. Na rysunku 15 [194] zostały przedstawione podstawowe różnice w morfologii komórek będących w stanie A – apoptozy, B – nekrozy, C – katastrofy mitotycznej oraz D – autofagii. Na zdjęciu D zobrazowano charakterystyczną wakuolizację, będącą wynikiem utworzenia autofagosomów.



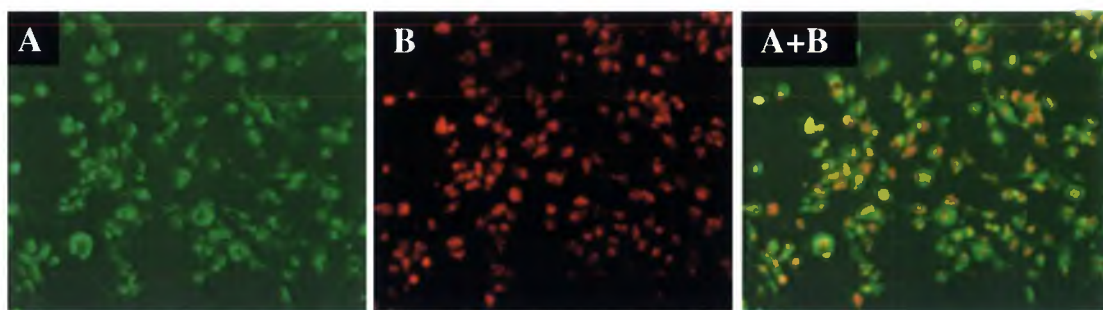
Rysunek 15

Morfologia charakterystyczna dla **A** – apoptozy linii HeLa, **B** – nekrozy linii CT26, **C** – katastrofy mitotycznej linii HCT116, **D** – autofagii komórek nerwowych wg [194]

Wszystkie wymienione dotychczas rodzaje śmierci komórkowej są wynikiem różnych zaburzeń bądź uszkodzeń, ostatni rodzaj jest jednak przypadkiem szczególnym, ponieważ dotyczy naturalnego procesu **starzenia**. Proces ten jest związany ze skracaniem telomerów, czyli końcowych fragmentów chromosomów [199]. W przypadku komórek nowotworowych proces ten ulega zaburzeniu w wyniku działania enzymu telomerazy, która powoduje odbudowanie telomerów i umożliwia nieskończoną liczbę podziałów komórkowych [200]. Należy jednak wspomnieć, że proces starzenia może być również wywołany przez czynniki powodujące uszkodzenia i wtedy stanowi rodzaj programowanej śmierci komórki, chroniącej organizm przed mutacjami [201].

Uniwersalnym przyrządem pozwalającym ocenić rodzaj szlaku śmierci, na jaki weszła komórka jest mikroskop elektronowy. Szczegółowa analiza morfologii komórki dostarcza cennych informacji o rodzaju programowanej śmierci komórki. Dodatkowo istnieje wiele różnych testów wykorzystujących techniki mikroskopii fluorescencyjnej, cytometrii przepływowej oraz elektroforezy.

Jedną z popularnych metod detekcji apoptozy jest test z aneksyną V sprzężoną z barwnikiem fluorescencyjnym – izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) [202], [203]. Komórka nieuszkodzona charakteryzuje się asymetrycznym rozmieszczeniem fosfolipidów błonowych np. fosfatydyloseryny (PS) w warstwie zewnętrznej i wewnętrznej [204]. Na skutek uszkodzeń PS ulega przemieszczeniu do zewnętrznej warstwy błony, co pozwala na rozpoznanie i usunięcie nieprawidłowej komórki na drodze fagocytozy. PS ma zdolność do wiązania się z aneksyną – białkiem błonowym wykazującym duże powinowactwo do ujemnie naładowanych fosfolipidów, jakim jest PS [205]. Sprzężenie aneksyny z FITC pozwala na detekcję komórek apoptotycznych za pomocą technik fluorescencyjnych [203]. Dodatkowo stosuje się kontrbarwienie przy pomocy jodku propidyny (JP), który wnika do komórek z uszkodzoną błoną [206]. Komórki emitujące czerwoną fluorescencję określa się jako nekrotyczne (Rysunek 16 B), natomiast te które emitują zieloną barwę pochodzącą od FITC uznaje się za komórki w stanie apoptozy (Rysunek 16 A) [207]. Barwienie JP pozwala wykluczyć błąd związany z zawyżoną emisją FITC spowodowaną wiązaniem się aneksyny do komórek nekrotycznych, których błona uległa rozerwaniu [208].



Rysunek 16

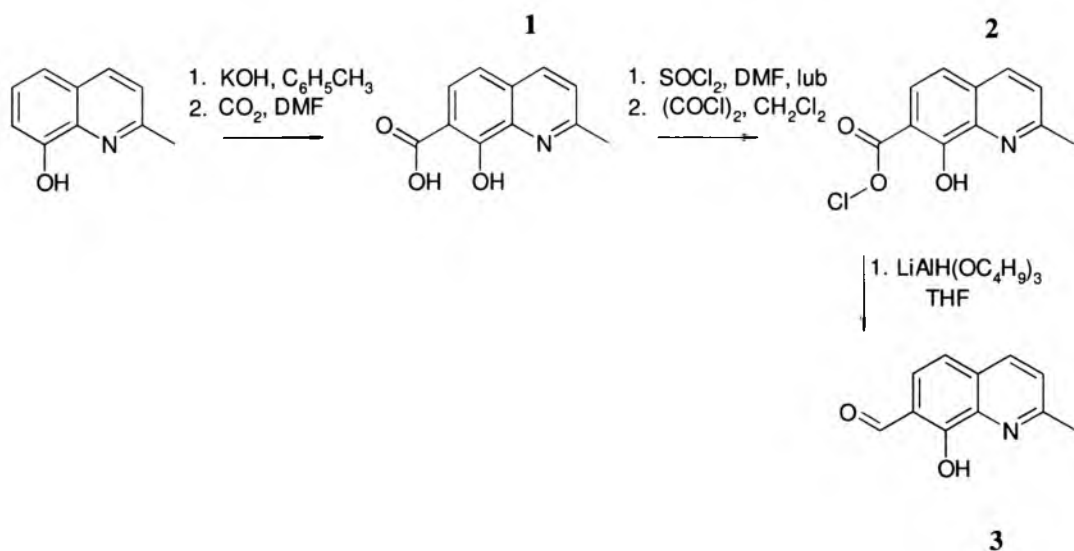
Komórki linii C6 barwione A – aneksyną V, B – jodkiem propidyny [207]

Kolejną metodą detekcji komórek będących w stanie apoptozy jest tzw. metoda TUNEL, w której pocięte fragmenty DNA są wykrywane przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej lub cytometrii przepływowej. Do oznaczenia wykorzystuje się enzym terminalnej transferazy [209], [210]. Metoda ta pozwala na obrazowanie komórek apoptotycznych oraz jak wspomniano wcześniej pozwala odróżnić apoptozę od katastrofy mitotycznej, w przypadku której nie obserwuje się pęknięć nici DNA [196], [200]. Do popularnych metod detekcji apoptozy należą również elektroforeza w żelu stosowana w technice Western blot, pozwalająca na rozdzielenie poszczególnych fragmentów DNA [211].

3. Badania własne

3.1. Przeprowadzone syntezy

Głównym celem prac syntetycznych niniejszej rozprawy była próba otrzymania 8-hydroksy-chinaldino-7-karbaldehydu (**3**), jako substratu do dalszych syntez właściwych tiosemikarbazonów. W tym celu zaplanowano wieloetapową syntezę z kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboxylowego (**1**), poprzez przekształcenie go w chlorek kwasowy (**2**) a następnie redukcję do aldehydu. Nieoczekiwanie okazało się, że produkt ostatniego etapu syntezy jest wysoce nietrwały i ulega rozkładowi podczas syntezy. Przeprowadzono szereg prób w różnych warunkach w obecności tri-tertbutoksyglinowodoru litu jako reduktora. W każdym przypadku otrzymywano produkty rozkładu lub ślady aldehydu rozkładające się podczas wyizolowania. Planowaną strategię syntezy przedstawiono na schemacie 7.



Schemat 7

Synteza 8-hydroksy-chinaldino-7-karbaldehydu

Wszystkie otrzymane związki zostały poddane analizie z wykorzystaniem technik chromatografii cienkowarstwowej (*ang.* thin layer chromatography; TLC) oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang.* nuclear magnetic resonance; NMR). Interpretacja widm ¹H NMR została umieszczona w rozdziale 5.2. Dalsze modyfikacje podejmowano we współpracy, wykorzystując reakcje McFaydena-

Stevensa z tosylohydrazyną jako reduktorem [212], jednak nie przyniosły one oczekiwanych rezultatów [213]. Docelowy produkt powstawał tylko w śladowych ilościach lub ulegał rozkładowi podczas prób wyizolowania.

W niniejszej pracy badaniom poddawano także szereg tiosemikarbazonów zaprojektowany i otrzymany w ramach badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Organicznej, Instytutu Chemii UŚ, w szczególności w ramach pracy doktorskiej wykonywanej przez mgr. inż. Macieja Serdę [214]. Poza naszym laboratorium związki te jako analogi triapiny poddawane są badaniom szerokiego spektrum działania biologicznego w kilku ośrodkach biologiczno-medycznych w tym Uniwersytetu Sydney oraz Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Pochodne **4 – 47**, **52** oraz **59 – 75** zostały otrzymane i zaprojektowane w ramach pracy doktorskiej mgr. inż. Macieja Serdy, który dostarczył próbki związków z przeznaczeniem do badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy. Pochodne **48 – 51** oraz **53 – 58** zostały otrzymane i zaprojektowane w laboratorium prof. Desa Richardsona z Uniwersytetu w Sydney. Pochodne **48 – 50** oraz **53** zostały zsyntezowane przez autorkę pracy.

3.1.1. Synteza kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyłowego

Pierwszy etap obejmował syntezę kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyłowego (**1**), z wykorzystaniem reakcji Kolbego-Schmidta polegającej na działaniu gazowym CO₂ na sól potasową 8-hydroksy-chinaldiny [215]. Otrzymano żółty, krystaliczny osad z 20 % wydajnością.

3.1.2. Synteza chlorku kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyłowego

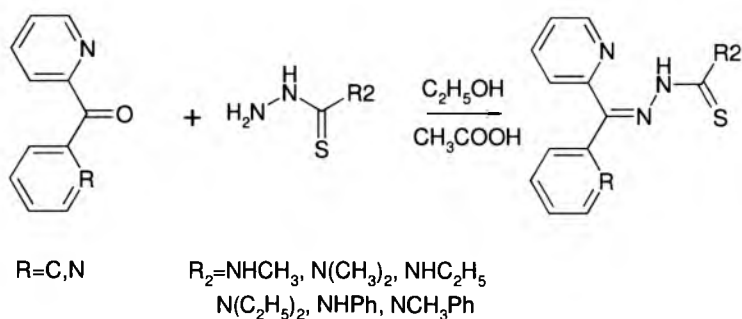
Chlorek kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyłowego (**2**) został otrzymany na dwa sposoby z wykorzystaniem chlorku tionylu [216], [217] oraz chlorku oksalilu [218]. Wygenerowany chlorek, w postaci cielistego osadu, ze względu na swą wysoką reaktywność został bezpośrednio użyty w następnym etapie bez wyodrębniania.

3.1.3. Próba syntezy 8-hydroksy-chinaldino-7-karbaldehydu

Próba syntezy 8-hydroksy-chinaldino-7-karbaldehydu (**3**) została prowadzona przy użyciu tri-tertbutoksyglinowodoru litu [219]. Powstały produkt reakcji poddano analizie z wykorzystaniem 2,4-dinitrofenylohydrazyny, która dała wynik negatywny. Ze względu na wysoką reaktywność użytego reduktora reakcja była prowadzona w niskiej temperaturze (-78°C). Niestety w tych warunkach reakcja nie zachodziła, a podniesienie temperatury prowadziło do dekarboksylacji substratu.

3.1.4. Synteza pochodnych tiosemikarbazonu

Tiosemikarbazony zostały otrzymane w reakcji kondensacji ketonu di-2-pirydylowego lub 2-benzoilopirydiny z odpowiednim tiosemikarbazidem [95], [220]. Schemat 8 przedstawia opisywane reakcje.



Schemat 8
Synteza tiosemikarbazonów

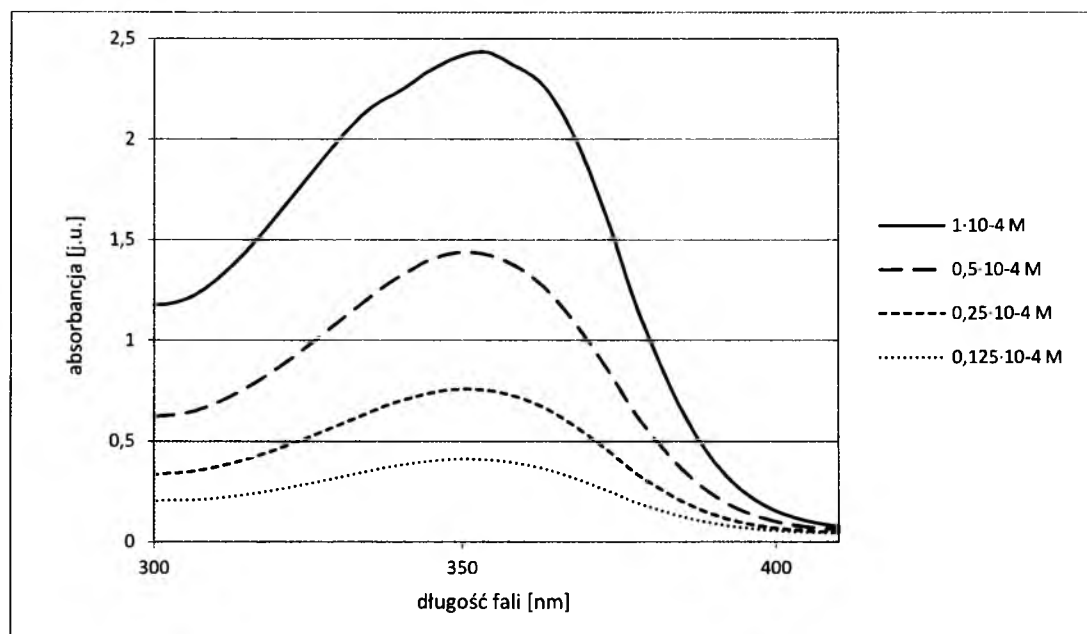
W rezultacie otrzymano szereg pochodnych z dobrymi wydajnościami. Struktury przedstawiono w tabeli 1.

Nr pochodnej	Struktura	Wydajność	Wydajność lit. [90], [95]
48 (Bp4mT)	$\text{R} = \text{C}, \text{R}_2 = \text{NHCH}_3$	85 %	92 %
49 (Bp44mT)	$\text{R} = \text{C}, \text{R}_2 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$	80 %	86 %
50 (Bp4eT)	$\text{R} = \text{C}, \text{R}_2 = \text{NHC}_2\text{H}_5$	83 %	91 %
53 (Dp4mT)	$\text{R} = \text{N}, \text{R}_2 = \text{NHCH}_3$	65 %	67 %

Tabela 1
Wydajności syntezy tiosemikarbazonów

3.2. Pomiary elektronowych widm absorpcji i emisji

W celu poznania własności spektralnych badanych związków przeprowadzono pomiary widm absorpcji i emisji. Widma zostały zmierzone dla związków **17**, **25** i **46** różniących się strukturalnie, oraz pochodnych **48 – 51**, **54**, **56 – 58**, **60** będących analogami tiosemikarbazonu opartego na strukturze ketonu 2-benzoilopirydyny i di-2-pirydyny. Związki **17**, **25**, **46** oraz **60** zostały wybrane ze względu na badania dotyczące ich wpływu na zwiększenie efektu terapii PDT (rozdział 3.6.). Pozostałe pochodne charakteryzowały się wysoką aktywnością antynowotworową, dlatego poznanie ich własności absorpcji i emisji promieniowania może zostać wykorzystane do dalszych badań. Pomiary widm absorpcji zostały przeprowadzone dla różnych stężeń związku, natomiast widma emisji dla stężenia pozwalającego obserwować największe natężenie fluorescencji. Poniżej przedstawiono przykładowe widmo absorpcji dla różnych stężeń związku **57** (Wykres 1). Dla reszty związków otrzymano analogiczne widma.



Wykres 1

Widmo absorpcji pochodnej **57**

W celu ilościowego określenia wartości absorpcji wyznaczono molowe współczynniki absorpcji ϵ korzystając ze wzoru:

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot l} \quad [M^{-1} \cdot cm^{-1}],$$

gdzie:

A – absorbancja [j.u.],

c – stężenie [M],

l – grubość warstwy roztworu [cm] [221].

W tabelach 2 i 3 zostały zebrane wartości ϵ wyznaczone dla stężenia równego 10^{-4} M oraz wartości długości fali, dla których występowało maksimum absorpcji i emisji.

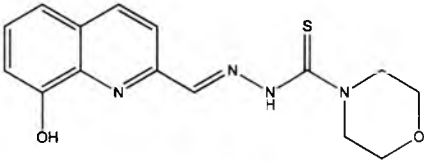
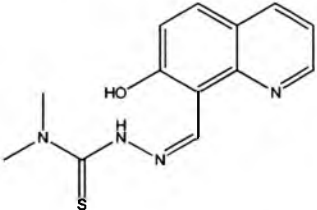
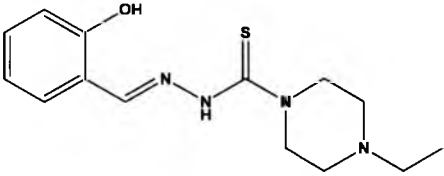
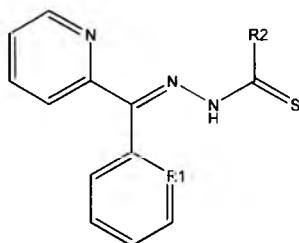
Nr związku	Struktura	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]	Absorpcja λ [nm]	Emisja λ_{max} [nm]
17 (MS168)		$1,25 \cdot 10^3$ (300nm) $1,02 \cdot 10^3$ (348nm)	300, 348	455
25 (MS46)		$1,90 \cdot 10^3$ (312nm) $1,34 \cdot 10^3$ (358nm)	312, 358	456
46 (MS193)		$1,40 \cdot 10^3$ (284nm) $1,13 \cdot 10^3$ (336nm)	284, 336	-

Tabela 2

Własności spektralne pochodnych 17, 25 i 46

POCHODNE 2-BENZOILOPIRYDINY ORAZ KETONU DI-2-PIRYDINY



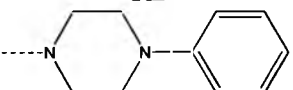
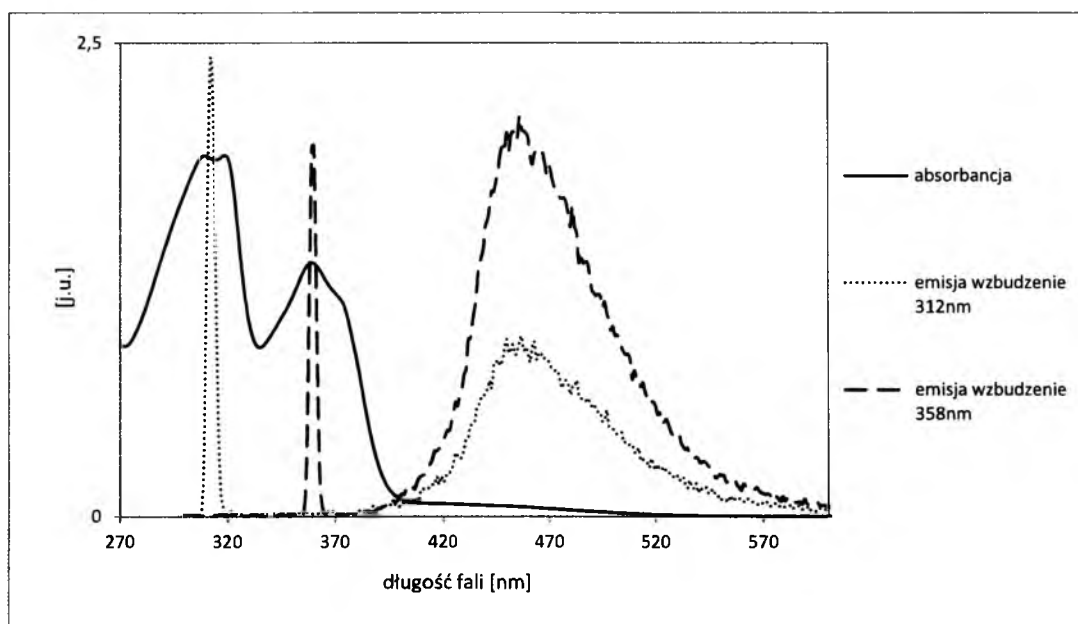
Nr związku	R1, R2	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Absorpcja λ [nm]	Emisja λ_{\max} [nm]
48 (Bp4mT)	R1 = C, R2 = NHCH ₃	1,83 · 10 ³	346	438
49 (Bp44mT)	R1 = C, R2 = N(CH ₃) ₂	1,15 · 10 ³	338	396
50 (Bp4eT)	R1 = C, R2 = NHC ₂ H ₅	1,90 · 10 ³	346	390
51 (Bp44eT)	R1 = C, R2 = N(C ₂ H ₅) ₂	1,39 · 10 ³	338	380
54 (Dp44mT)	R1 = N, R2 = N(CH ₃) ₂	1,42 · 10 ³ (278nm) 1,49 · 10 ³ (344nm)	278, 344	390
56 (Dp44eT)	R1 = N, R2 = N(C ₂ H ₅) ₂	1,51 · 10 ³	344	394
57 (Dp4pT)	R1 = N, R2 = NPh	2,44 · 10 ³	354	420
58 (Dp4mT4pT)	R1 = N, R2 = NCH ₃ Ph	1,69 · 10 ³	346	410
60 (MS154)	R1 = N, R2 = 	1,48 · 10 ³	344	-

Tabela 3

Własności spektralne pochodnych 48 - 51, 54, 56 - 58, 60

Dane zebrane w tabelach 2 i 3 dowodzą, iż otrzymane widma absorpcyjne prawdopodobnie wskazują na występowanie przejść elektronowych typu $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$ [222], [223]. Molowe współczynniki absorpcji wahały się w granicach od $1,02 \cdot 10^3$ do $2,44 \cdot 10^3$. Pochodna 8-hydroksy-chinazoliny (**17**) oraz 7-hydroksy-chinazoliny (**25**) posiadały bardzo podobne widmo absorpcyjne z dwoma pikami z zakresu 300 – 358 nm. Widmo fluorescencji, przesunięte w kierunku dłuższych fal, było niemal identyczne dla tych dwóch pochodnych. Na wykresie 2 zostało przedstawione przykładowe widmo absorpcji i emisji zmierzone dla pochodnej **25**. Intensywność pasm emisji została odpowiednio zmniejszona w celu zobrazowania kształtu oraz położenia poszczególnych pasm. Charakterystyczne przesunięcie Stokesa obrazuje pasmo emisji występujące przy 456 nm z różną intensywnością w zależności od długości fali wzbudzenia.



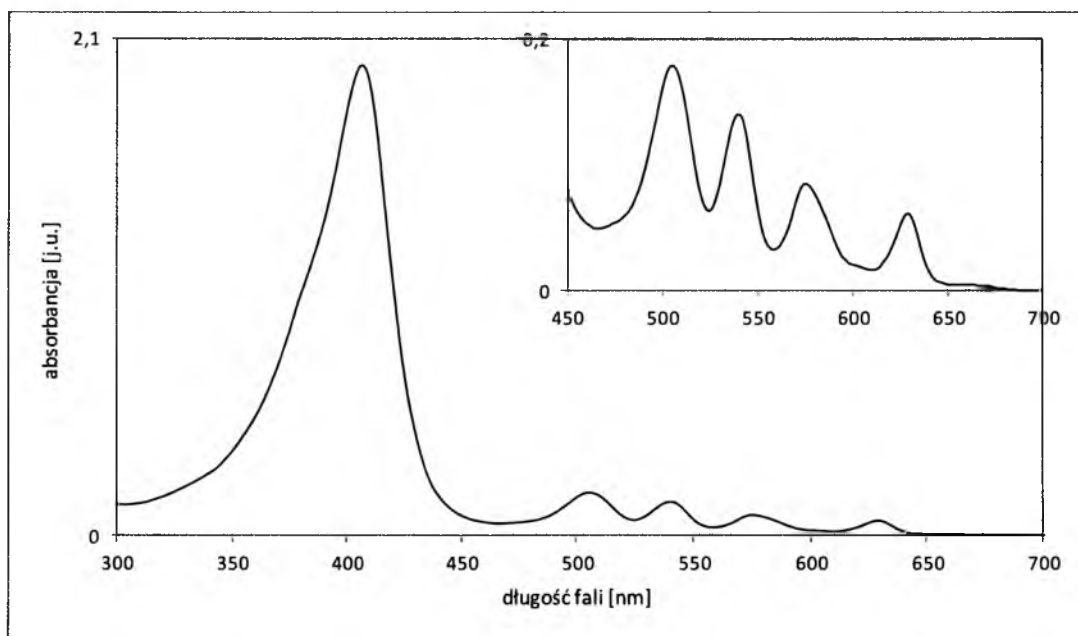
Wykres 2

Absorpcja i emisja pochodnej **25**

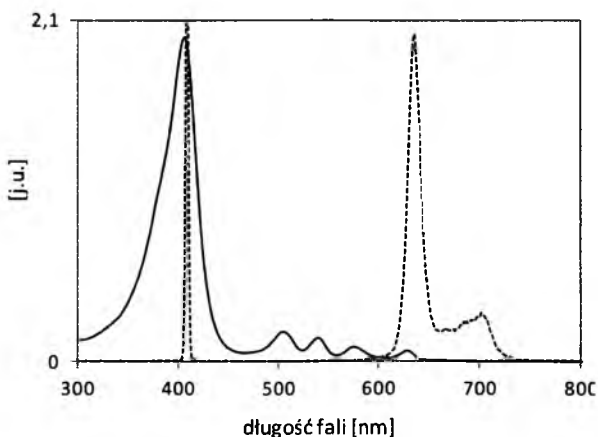
Długości fali przy których występowało maksimum absorpcji dla pozostałych pochodnych wahały się w zakresie 278 – 354 nm. Niektóre pochodne posiadały jedno pasmo absorpcji (pochodne **48** – **51**, **56** – **60**), natomiast pozostałe dwie pochodne, tak jak w przypadku analogów 7 i 8-hydroksychinoliny dwa pasma (pochodne **46** i **54**). Większość związków po wzbudzeniu odpowiednią długością fali generowały widma fluorescencji przy stężeniu 10^{-4} M. Natomiast związki **46** oraz **60** nie posiadały widma

emisji pomimo wielokrotnego rozcieńczenia roztworów, których końcowe stężenie wynosiło 10^{-8} M.

Jako że rozdział ten jest poświęcony własnościom spektralnym związków badanych w ramach przygotowania niniejszej pracy, na wykresie 3 prezentowane jest widmo absorpcji PpIX. Pasma Soreta występuje przy 407 nm, natomiast pozostałe cztery pasma Q są położone w zakresie 500 – 650 nm. Głównymi przejściami w widmach absorpcyjnych porfiryn są przejścia elektronowe $\pi \rightarrow \pi^*$ [224], [225]. Charakterystyczne piki emisji PpIX, występujące przy 638 nm oraz mniejszy przy 702 nm ($\lambda_{wzb} = 407$ nm), zostały przedstawione na wykresie 4 ilustrującym nałożenie widm absorpcji i emisji. Tak jak w przypadku wykresu 2 intensywność pasm emisji została odpowiednio zmniejszona.



Wykres 3
Widmo absorpcji PpIX



Wykres 4
Absorpcja i emisja PpIX

3.3. Testy cytotoksyczności

3.3.1. Test MTS

Test MTS jest kolorymetryczną metodą detekcji żywych, proliferujących komórek. Barwną substancją jest żółty 3-(4,5-dimetylotioazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenilo)-2-(4-sulfofenilo)-2H-tetrazol inaczej zwany solą błękitu tetrazolowego, która jest przekształcana przez żywe komórki w czerwono-purpurowy formazan. Przemiana ta zachodzi w metabolicznie czynnych komórkach przy udziale enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej. Ilość wytworzonego formazanu jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Odczyty absorbancji przy długości fali charakterystycznej dla formazanu pozwalają na określenie stopnia przeżywalności komórek – a w konsekwencji na wyliczenie wartości IC_{50} – stężenia powodującego 50 % zahamowanie wzrostu populacji komórek. W tabelach 4 – 13 zostały przedstawione struktury wszystkich badanych pochodnych wraz z otrzymanymi wartościami IC_{50} dla trzech linii komórkowych: HCT116 +/+, HCT116 -/- oraz NHDF. Wartości IC_{50} rzędu 10^{-3} μ M zostały wyróżnione czcionką pogrubioną.

Wyniki dotyczące analogów chinoliny zostały przedstawione w tabeli 4. Spośród związków tej serii najbardziej aktywna okazała się pochodna **5**. Związek ten wykazywał swoistą specyficzność, gdyż wartość IC_{50} wynosiła około 10^{-2} μ M dla linii HCT116 +/+, podczas gdy w przypadku linii HCT116 -/- osiągnięcie tego samego efektu było możliwe dopiero przy zastosowaniu ponad 10 razy większego stężenia. Porównując do linii komórek prawidłowych, dla których IC_{50} wynosiło około 10 μ M, można stwierdzić, że badana pochodna oznacza się również wysoką selektywnością. Analog pochodnej **5** zawierający w swej strukturze atom wodoru zamiast grupy metylowej na terminalnym atomie azotu (pochodna **4**) wykazywał brak aktywności w przypadku obu linii HCT116. Również pochodna **6**, z atomem wodoru i grupą etylową, wykazywała dość słabą aktywność. Można więc wnioskować, że obecność dwóch grup metylowych połączonych z terminalnym atomem azotu ma istotny wpływ na aktywność pochodnych z tej serii. Wysoką selektywnością w stosunku do komórek prawidłowych oraz aktywnością w przypadku linii nowotworowych odznaczały się również pochodne **9** i **13**.

STRUKTURA WIODĄCA – POCHODNE CHINOLINY

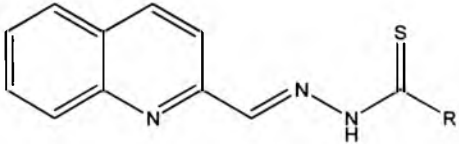

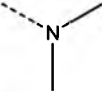
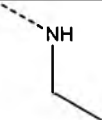
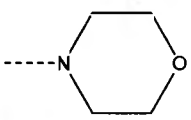
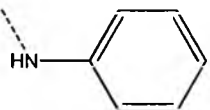
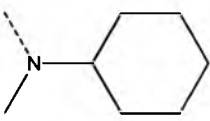
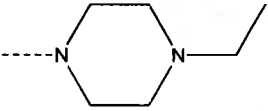
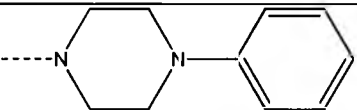
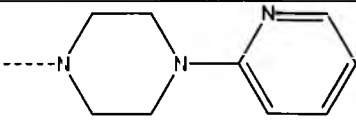
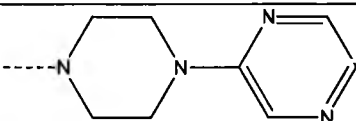
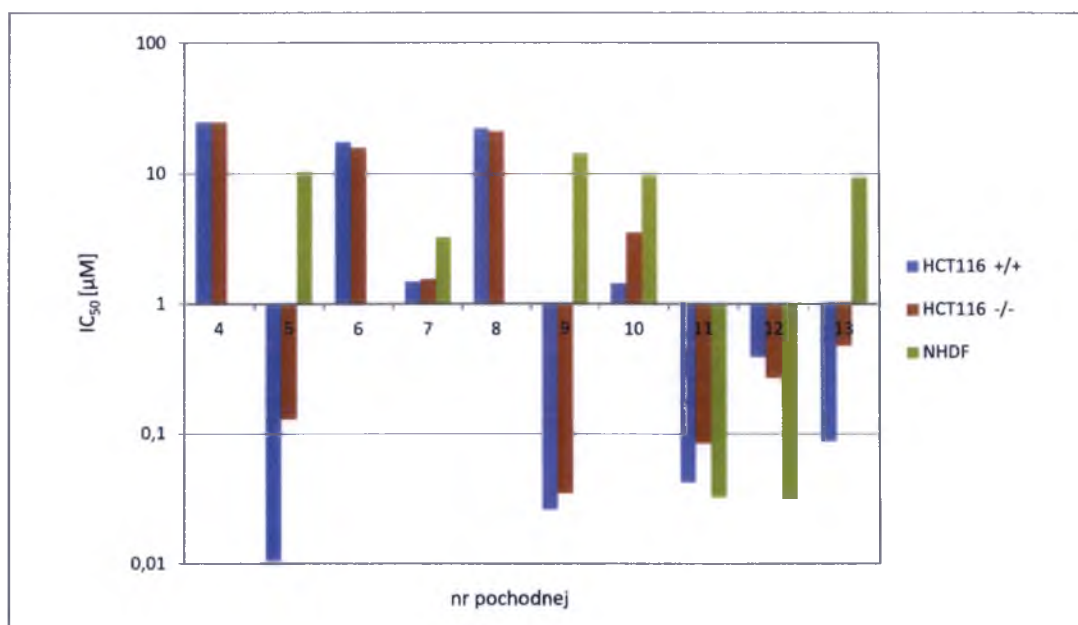
				
Nr związku	R	HCT116 +/- IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]	NHDF IC ₅₀ [μM]
4. MS20		>25	>25	-
5. MS2		10,69 · 10⁻³ ± 1,12 · 10 ⁻³	0,13 ± 0,06	10,58 ± 4,07
6. MS33		17,6 ± 2,98	15,87 ± 2,00	-
7. MS164		1,49 ± 0,02	1,56 ± 1,12	3,27 ± 0,88
8. MS45		22,34 ± 5,18	21,39 ± 5,69	-
9. MS139		26,16 · 10⁻³ ± 0,97 · 10 ⁻³	35,09 · 10⁻³ ± 2,61 · 10 ⁻³	14,49 ± 2,25
10. MS163		1,44 ± 0,69	3,55 ± 1,23	9,62 ± 1,80
11. MS165		42,24 · 10⁻³ ± 3,15 · 10 ⁻³	85,10 · 10⁻³ ± 36,80 · 10 ⁻³	32,53 · 10⁻³ ± 7,16 · 10 ⁻³
12. MS180		0,39 ± 0,15	0,27 ± 0,16	31,46 · 10⁻³ ± 8,17 · 10 ⁻³
13. MS179		87,70 · 10⁻³ ± 43,86 · 10 ⁻³	0,48 ± 0,15	9,44 ± 3,84

Tabela 4

Struktury i aktywności analogów chinoliny (pochodne 4-13)

Pochodna **9** posiadająca grupę metylową oraz pierścień cykloheksanu przyłączone do terminalnego atomu azotu, jest wyraźnie bardziej aktywna od pochodnej **8** z atomem wodoru oraz aromatycznym pierścieniem benzenu. Brak zdelokalizowanego wiązania π oraz obecność grupy metylowej ma istotny wpływ zarówno na selektywność jak i aktywność tych analogów. W przypadku pochodnej **13** istotna jest obecność dwóch atomów azotu w aromatycznym pierścieniu. Pojedynczy atom azotu, bądź jego brak powodował utratę selektywności, pomimo iż wszystkie analogii wykazywały aktywność na liniach komórek nowotworowych. Pochodne **7** i **10** przejawiały podobny poziom aktywności, sięgający kilku μM w przypadku komórek HCT116 oraz nieco więcej w przypadku NHDF. Wartości IC_{50} dla pochodnej **11** wynosiły od około 0,03 – 0,08 μM dla wszystkich linii, podczas gdy pochodna **12** wykazywała podobny, choć nieco mniejszy, poziom aktywności. Powyższa analiza została przedstawiona na wykresie 5 przedstawiającym zależność aktywności (wartości IC_{50}) na poszczególnych liniach od rodzaju analogu chinoliny. Dodatkowo wartości słupków na wykresie oznaczają wartości IC_{50} powyżej 1, ujemne poniżej 1, które obrazują związki o wysokiej aktywności.



Wykres 5

Aktywność analogów chinoliny w stosunku do komórek linii

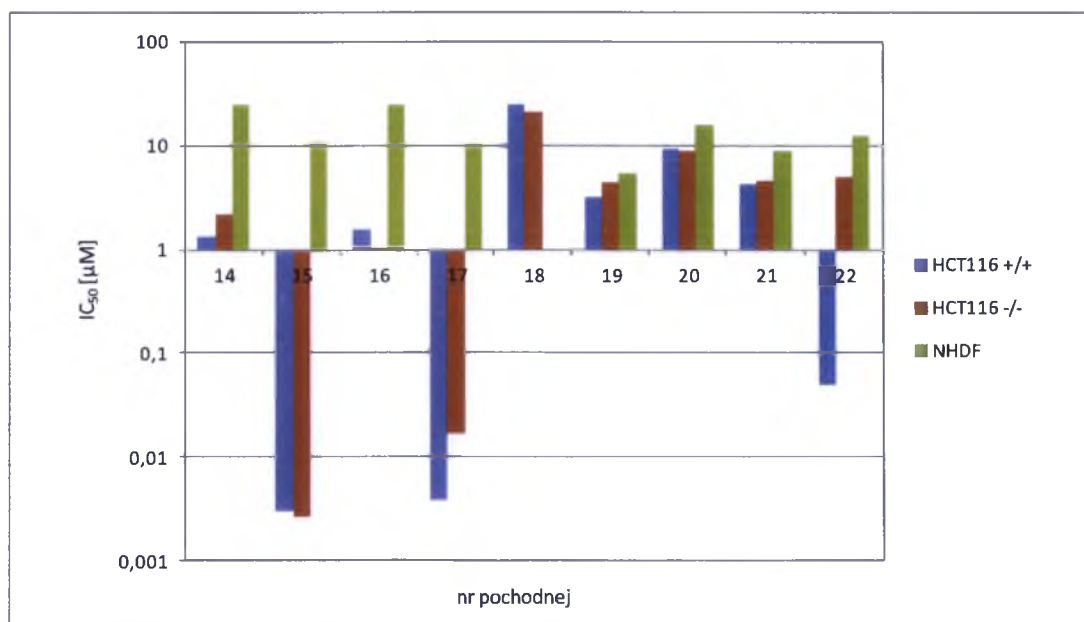
Kolejną badaną serią była grupa pochodnych 8-hydroksychinoliny. Wyniki są prezentowane w tabeli 5.

STRUKTURA WIODĄCA - POCHODNE 8-HYDROKSY-CHINOLINY				
Nr związku	R	HCT116+/+ IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]	NHDF IC ₅₀ [μM]
14. MS19		1,33 ± 0,35	2,21 ± 0,90	>25
15. MS1		$2,98 \cdot 10^{-3}$ ± $0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,69 \cdot 10^{-3}$ ± $0,56 \cdot 10^{-3}$	11,07 ± 4,31
16. MS29		1,57 ± 0,87	1,06 ± 0,26	>25
17. MS168		$3,84 \cdot 10^{-3}$ ± $1,46 \cdot 10^{-3}$	$16,77 \cdot 10^{-3}$ ± $5,58 \cdot 10^{-3}$	10,64 ± 3,48
18. MS44		24,97 ± 4,29	20,87 ± 3,22	-
19. MS142		3,11 ± 1,92	4,35 ± 1,35	5,36 ± 1,99
20. MS166		9,25 ± 1,42	8,83 ± 0,63	15,79 ± 4,63
21. MS167		4,18 ± 1,46	4,67 ± 2,04	8,88 ± 1,07
22. MS181		$50,45 \cdot 10^{-3}$ ± $28,14 \cdot 10^{-3}$	5,01 ± 2,55	12,14 ± 3,58

Tabela 5

Struktury i aktywności analogów 8-hydroksy-chinoliny (pochodne 5-22)

Spośród pochodnych 8-hydroksy-chinoliny najbardziej aktywny okazał się związek **15**. Wartości IC_{50} w przypadku obu linii komórek nowotworowych wynoszą około $3 \cdot 10^{-3}$ μM . Jednocześnie pochodna ta nie wykazuje aktywności w stosunku do linii prawidłowych fibroblastów. Wartość IC_{50} dla linii NHDF wynosi około 11 μM czyli jest około 3,5 tysiąca razy większa od wartości dla linii nowotworu jelita (Wykres 6). Wartości IC_{50} dla pochodnych **14** i **16** utrzymywały się na poziomie kilku mikromoli w przypadku linii nowotworowych, natomiast dla linii NHDF wartość ta przekraczała 25 μM . Porównując aktywności pochodnych **14** – **16**, jak również **4** – **6**, nasuwa się wniosek, iż obecność dwóch grup metylowych na terminalnym atomie azotu ma istotny wpływ na aktywność związku. Kolejnym ciekawym analogiem jest pochodna **17** o podobnych, nieznacznie wyższych, wartościach IC_{50} w przypadku linii bez zmian oraz ze zmianami nowotworowymi. W wyniku porównania związków **7** i **17** z podstawnikiem morfoliny nasuwa się wniosek, iż modyfikacja w postaci przyłączenia grupy hydroksylowej w pozycji 8 pierścienia chinoliny skutkowało przeszło 300 – krotnym wzrostem aktywności w przypadku linii HCT116 +/+ oraz 60 – krotnym dla linii HCT116 -/-. Poziom aktywności na linii NHDF zmienił się z wartości 3 μM na 10 μM , co w świetle dużej toksyczności w stosunku do linii nowotworowych znacznie polepszyło selektywność pochodnej **17**. Związki **15** i **17** posiadają cechy które predestynują je do dalszych badań. Interesującym związkiem z tej serii jest również

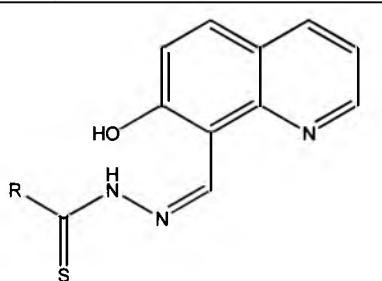
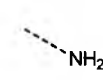
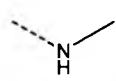
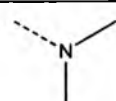


Wykres 6

Aktywność analogów 8-hydroksy-chinoliny w stosunku do komórek linii HCT116 +/+, HCT116 -/- oraz NHDF

pochodna **22**, której wartość IC_{50} wynosi około $0,05 \mu M$ dla linii HCT116 +/+, $5 \mu M$ dla linii HCT116 -/- oraz około $12 \mu M$ dla linii NHDF. Stukrotna różnica w aktywności względem dwóch linii nowotworowych może wskazywać, że mechanizm działania związku **22** jest związany z aktywnością białka p53. Analogiczne zależności obserwowane były w przypadku pochodnej **13**. Specyficzne oddziaływanie ze szczególnym rodzajem nowotworu, z jednoczesnym zachowaniem znikomej toksyczności w stosunku do zdrowych komórek jest bardzo korzystną cechą, pożądaną w dalszych badaniach. Pozostałe pochodne **19** – **21** wykazywały średni poziom aktywności, który był porównywalny dla wszystkich linii. Porównując wyniki aktywności dla pochodnych **9** i **19** oraz **11** i **21** stwierdza się, iż w tym przypadku obecność grupy hydroksylowej znacznie pogarsza aktywność związków **19** i **21**. Pochodna **18**, podobnie jak **8**, została uznana za nieaktywną dlatego, tak jak w przypadku innych nieaktywnych związków, nie została poddana testom na porównawczych liniach komórek bez zmian nowotworowych.

W wyniku kondensacji 7-hydroksy-8-karbaldehydu chinoliny z odpowiednim tiosemikarbazydem powstała kolejna seria pochodnych, której wyniki aktywności zostały przedstawione w tabeli 6.

STRUKTURA WIODĄCA - POCHODNE 7-HYDROKSY-CHINOLINY				
				
Nr związku	R	HCT116 +/+ IC_{50} [μM]	HCT116 -/- IC_{50} [μM]	NHDF IC_{50} [μM]
23. MS162		$21,18 \pm 5,18$	>25	-
24. MS48		$15,17 \pm 2,39$	$7,78 \pm 1,92$	>25
25. MS46		$20,75 \pm 5,34$	>25	>25

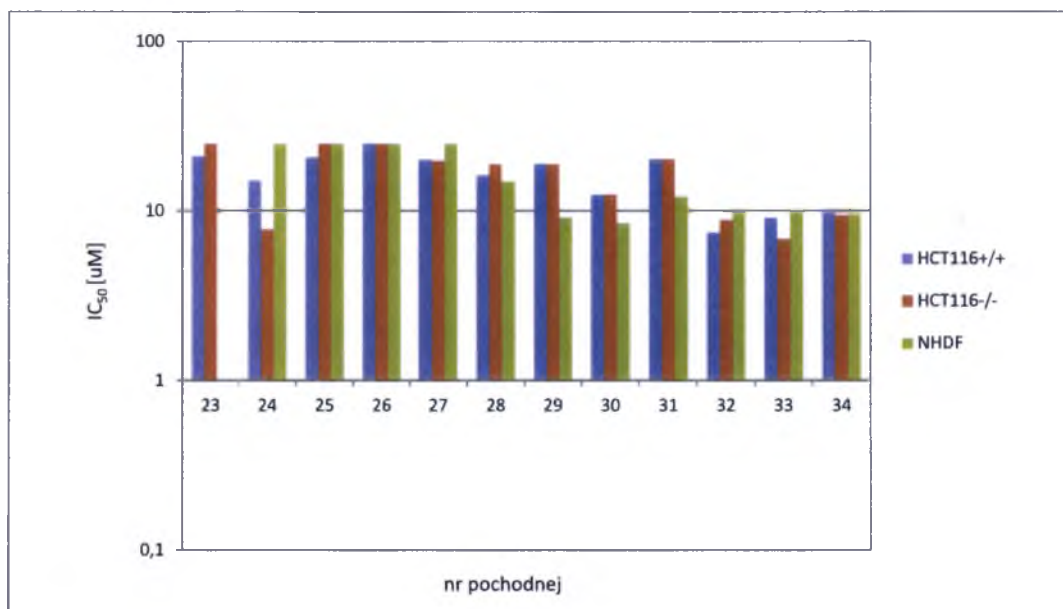
Nr związku	R	HCT116 +/+ IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]	NHDF IC ₅₀ [μM]
26. MS47		>25	>25	>25
27. MS161		20,09 ± 0,28	19,84 ± 4,87	>25
28. MS49		16,28 ± 1,69	18,62 ± 2,79	14,94 ± 1,61
29. MS138		18,99 ± 0,54	18,89 ± 3,65	9,18 ± 3,68
30. MS176		12,46 ± 2,08	12,54 ± 1,69	8,48 ± 1,66
31. MS159		20,20 ± 0,26	20,33 ± 0,86	12,14 ± 4,17
32. MS160		7,45 ± 0,66	8,88 ± 2,53	10,08 ± 1,23
33. MS177		9,15 ± 1,19	6,84 ± 5,48	10,12 ± 2,71
34. MS178		10,09 ± 0,70	9,44 ± 1,35	9,56 ± 1,44

Tabela 6

Struktury i aktywności analogów 7-hydroksy-chinoliny (pochodne 23-34)

W tej serii układ chinoliny zawierał grupę hydroksylową w pozycji 7, natomiast grupa tiosemikarbazydu została podstawiona w pozycji 8. Ta modyfikacja negatywnie wpłynęła na aktywność osiąganą przez badane związki. Wszystkie pochodne przedstawione w tabeli 4 można uznać za nieaktywne, bądź słabo aktywne zarówno względem komórek nowotworowych jak i prawidłowych (Wykres 7). IC₅₀ najbardziej aktywnej pochodnej **33** wynosiło niecałe 7 μM (dla linii HCT116 -/-). Podstawienie

grupy tiosemikarbazydu w pozycję 8 pierścienia chinoliny najprawdopodobniej pogarszało zdolność chelatowania jonów metali. W przypadku analogów tej serii odległość pomiędzy dwoma sąsiednimi atomami azotu tiosemikarbazydu, a atomem azotu pierścienia chinoliny wynosi 3 atomy węgla. W przypadku podstawienia grupy tiosemikarbazydu w pozycję 2 pierścienia chinoliny odległość ta wynosi 2 atomy węgla, i to właśnie takie rozmieszczenie strukturalne okazało się najkorzystniejsze dla tworzenia kompleksów z jonami metali.

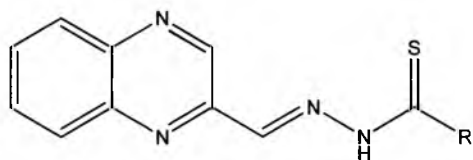


Wykres 7

Aktywność analogów 7-hydroksy-chinoliny w stosunku do komórek linii HCT116 +/+, HCT116 -/- oraz NHDF

Wysokie aktywności uzyskane dla analogów chinoliny oraz jej modyfikacji w postaci podstawienia grupy hydroksylowej w pozycji 8 zainspiowały syntezę kolejnej grupy związków opartych na strukturze chinoksaliny. Analogii mające w pierścieniu dodatkowy atom azotu wraz z wartościami IC₅₀ dla trzech linii komórkowych, zostały przedstawione w tabeli 7.

STRUKTURA WIODĄCA - POCHODNE CHINOKSALINY



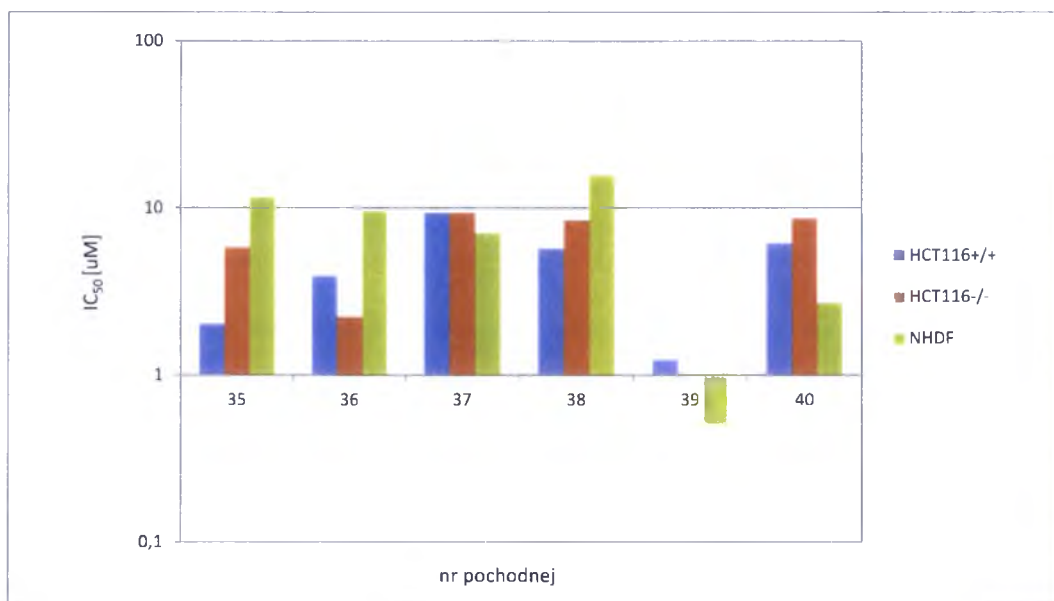
Nr związku	R	HCT116 +/- IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]	NHDF IC ₅₀ [μM]
35. MS185		2,03 ± 1,24	5,84 ± 1,65	11,62 ± 1,76
36. MS187		3,92 ± 0,74	2,24 ± 1,47	9,61 ± 0,90
37. MS188		9,40 ± 0,79	9,41 ± 1,04	7,13 ± 0,82
38. MS189		5,73 ± 0,75	8,49 ± 3,05	15,81 ± 5,08
39. MS190		1,24 ± 0,45	1,02 ± 0,54	0,50 ± 0,21
40. MS186		6,15 ± 1,28	8,72 ± 1,64	2,73 ± 1,77

Tabela 7

Struktury i aktywności analogów chinoksaliny (pochodne 35-40)

Wyniki aktywności uzyskane dla tej grupy pochodnych są niezwykle interesujące. Obecność drugiego atomu azotu w pierścieniu ma bowiem decydujący wpływ na aktywność tych pochodnych. Wyniki dla pochodnych chinoliny 11 – 13 wskazują ich wysoką aktywność. Uległa ona drastycznemu pogorszeniu w przypadku pochodnych 36 – 38. Modyfikacja pierścienia chinoliny polegająca na dodaniu heteroatomu wpłynęła na utratę toksyczności na wszystkich badanych liniach komórkowych. Sytuacja była podobna w przypadku porównania pochodnych 9 i 39. Pochodna 9 wykazywała wysoką aktywność w stosunku do linii nowotworu jelita z jednoczesnym zachowaniem selektywności w stosunku do fibroblastów. Wartość IC₅₀ dla pochodnej 39 z atomem azotu w pozycji *para* w stosunku do heteroatomu chinoliny wynosiła około 1 μM, więc

zaobserwowano około 30 – krotny spadek aktywności w porównaniu do aktywności pochodnej **9**. Selektyność uległa drastycznemu pogorszeniu, pochodna **39** wykazywała słabą toksyczność w stosunku do komórek prawidłowych. Prawdopodobną przyczyną utraty aktywności dla serii pochodnych chinoksaliny może być wpływ wolnej pary elektronowej dodatkowego atomu azotu, utrudniającej tworzenie kompleksu z jonem metalu. Wyniki powyższej analizy zostały przedstawione na wykresie 8.



Wykres 8

Aktywność analogów chinoksaliny w stosunku do komórek linii

Jako jedyna z pojedynczym pierścieniem spośród wszystkich zbadanych serii wyróżniała się grupa pochodnych fenolu. Wyniki dla związków tego rodzaju są prezentowane w tabeli 8.

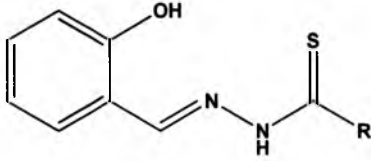
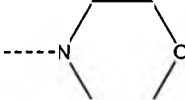
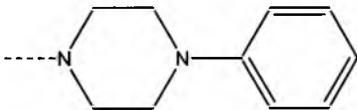
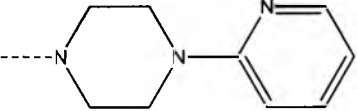
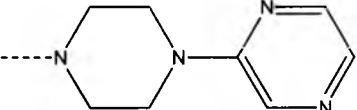
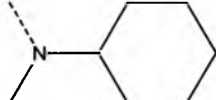
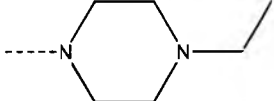
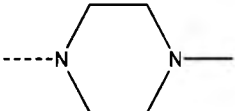
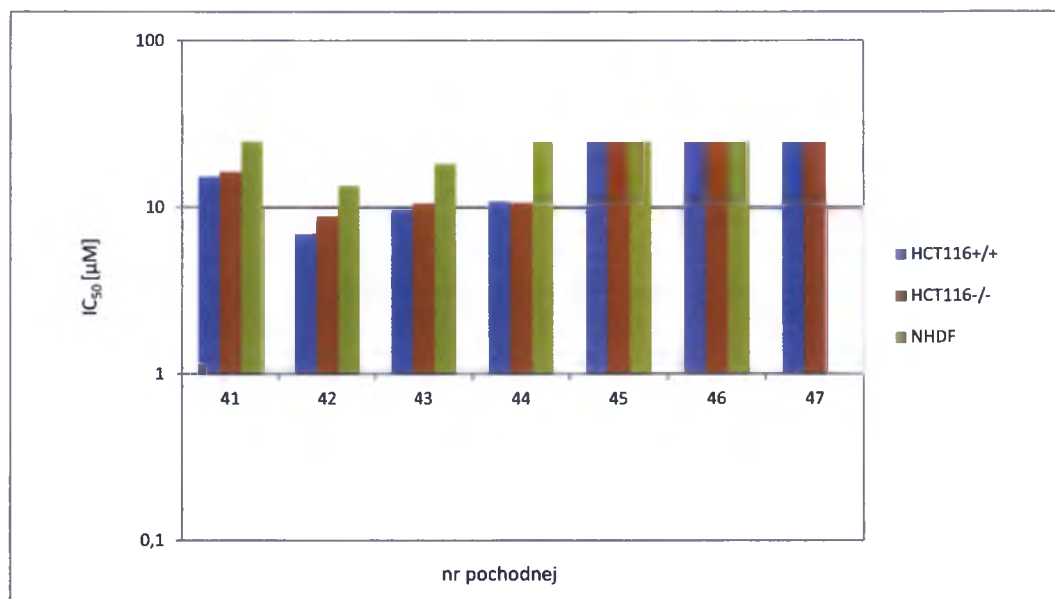
STRUKTURA WIODĄCA - POCHODNE FENOLU				
				
Nr związku	R	HCT116 +/+ IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]	NHDF IC ₅₀ [μM]
41. MS192		15,39 ± 1,66	16,44 ± 3,11	>25
42. MS191		6,94 ± 2,30	8,86 ± 1,46	13,52 ± 4,76
43. MS194		9,66 ± 2,50	10,59 ± 1,19	18,41 ± 1,91
44. MS195		10,88 ± 0,65	10,69 ± 1,03	>25
45. MS141		>25	>25	>25
46. MS193		>25	>25	>25
47. MS196		>25	>25	-

Tabela 8

Struktury i aktywności analogów fenolu (pochodne 41-47)

Wszystkie pochodne z tej serii wykazywały słabą aktywność na wszystkich badanych liniach komórkowych. Wyniki dowodzą, że obecność dwóch pierścieni, bądź co bardziej prawdopodobne, obecność heteroatomu może mieć istotny wpływ na aktywność pochodnych tiosemikarbazonu. Wartość IC_{50} najbardziej aktywnej pochodnej **42** wynosiła prawie $7 \mu\text{M}$ na linii HCT116 +/+. W większości przypadków aktywności analogów z tej grupy przedstawione w postaci IC_{50} wynosiły kilkanaście μM (pochodne **41**, **43** i **44**) na liniach komórek nowotworowych. Dla pozostałych związków przekraczały $25 \mu\text{M}$. Wyniki zostały przedstawione na wykresie 9.

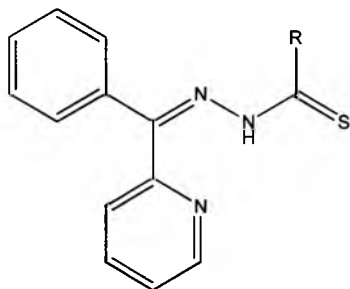


Wykres 9

Aktywność analogów fenolu w stosunku do komórek linii

Wcześniej prezentowane wyniki aktywności odnosiły się do związków zaprojektowanych, syntezowanych i opatentowanych w grupie prof. Jarosława Polańskiego. Kolejna seria analogów 2-benzoilopirydyny została opisana wcześniej w zespole prof. Desa Richardsona z Uniwersytetu w Sidney. Związki te posiadają wysoką aktywność biologiczną (Tabela 9) oraz selektywność [90], [121], [122], [226].

STRUKTURA WIODĄCA - POCHODNE 2-BENZOILOPIRYDYNY



Nr związku	R	HCT116 +/+ IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]
48. Bp4mT		$13,10 \cdot 10^{-3} \pm 2,72 \cdot 10^{-3}$	$16,62 \cdot 10^{-3} \pm 4,35 \cdot 10^{-3}$
49. Bp44mT		$1,41 \cdot 10^{-3} \pm 0,32 \cdot 10^{-3}$	$2,75 \cdot 10^{-3} \pm 0,77 \cdot 10^{-3}$
50. Bp4eT		$6,14 \cdot 10^{-3} \pm 1,25 \cdot 10^{-3}$	$54,34 \cdot 10^{-3} \pm 24,82 \cdot 10^{-3}$
51. Bp44eT		$3,21 \cdot 10^{-3} \pm 0,37 \cdot 10^{-3}$	$9,91 \cdot 10^{-3} \pm 0,71 \cdot 10^{-3}$

Tabela 9

Struktury i aktywności analogów 2-benzoilopirydyny (pochodne 48-51)

Otrzymane wartości IC₅₀ potwierdziły wcześniejsze badania prowadzone przez zespół prof. Richardsona. Aktywność pochodnych z tej serii waha się od $1,41 \cdot 10^{-3}$ do $16,62 \cdot 10^{-3}$ μM. Pochodna 50 wykazywała dość słabą aktywność (w porównaniu do reszty analogów) na linii HCT116 -/-. Dla związków tych nie zostały określone toksyczności względem linii zdrowych komórek, ponieważ dane pochodzą z publikacji [90]. Seria pochodnych 2-benzoilopirydyny jest jednym z najbardziej aktywnych szeregów badanych w niniejszej pracy. Swoista specyficzność w stosunku do zdrowych komórek, jak i wysoka aktywność stwierdzona na trzech liniach komórek nowotworowych czyni te związki niezwykle interesującym obiektem do dalszych badań.

Modyfikacja związana ze zmianą położenia heteroatomu w pierścieniu benzoilopirydyny miała na celu sprawdzenie wpływu pozycji atomu azotu na aktywność pochodnych tej serii. Struktura pochodnej 4-benzoilopirydyny wraz z aktywnością na liniach komórkowych HCT116 +/- oraz -/- zostały przedstawione w tabeli 10.

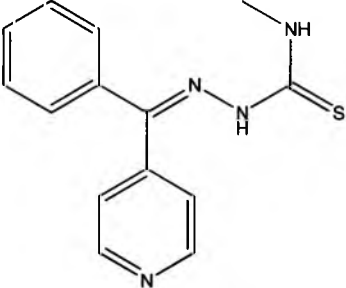
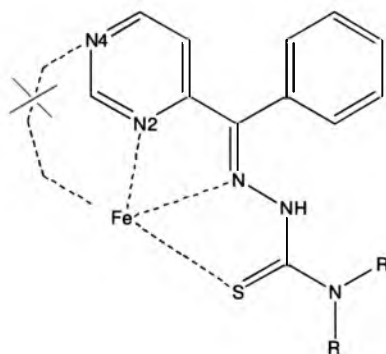
4-BENZOILOPIRYDINO-TIOSEMIKARBAZON			
Nr związku	Struktura	HCT116 +/- IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]
52. MS113		>25	>25

Tabela 10

Struktura i aktywność pochodnej 4-benzoilopirydyny (pochodna 52)

Pochodna 4-benzoilopirydyny okazała się nieaktywna na badanych liniach komórek nowotworowych. Wartość IC₅₀ w przypadku obu linii wynosiła ponad 25 μM. Prawdopodobną przyczyną jest brak możliwości chelatowania jonów żelaza. Związanie jest to z uczestnictwem atomu azotu z pierścienia w tworzeniu wiązania koordynacyjnego ligandu z jonem metalu. Na schemacie 9 zostały przedstawione schematyczne wiązania koordynacyjne pomiędzy jonem metalu, a atomem siarki i azotu łańcucha tiosemikarbazonu. W tworzeniu kompleksu uczestniczyć może również atom heterocyklicznego azotu. Jednak w przypadku pozycji 4 (N4) wiązanie nie może zostać utworzone ze względów sterycznych. Struktury krystalograficzne kompleksów tiosemikarbazonu opisane dla takich metali jak żelazo, mangan, nikiel czy miedź wydają się potwierdzać powyższą hipotezę [83], [96],



Schemat 9

Wiązania koordynacyjne pomiędzy jonem Fe a S, N, N2

[103], [227], [228]. Otrzymane wyniki były przyczyną zaniechania dalszych badań dotyczących tej serii. Należy jednak podkreślić, że uzyskane wyniki stanowią dobre uzasadnienie dla proponowanego mechanizmu działania badanych związków, który opiera się na tworzeniu kompleksów żelaza. Związki posiadające cechy strukturalne utrudniające powstanie takich kompleksów okazują się nieaktywne.

Kolejna seria dotyczy analogów ketonu di-2-pirydylowego (Tabela 11). Pochodne **53** – **58** są kontynuacją badań grupy prof. Richardsona nad analogami 2-benzoilopirydyny. Związki te zostały szeroko opisane w pracach [95], [117], [120], [229], [230]. Pozostałe pochodne **59** – **64** to wynik prac syntetycznych prowadzonych przez mgr. Macieja Serdę.

STRUKTURA WIODĄCA – POCHODNE KETONU DI-2-PIRYDYLOWEGO				
Nr związku	R	HCT116 +/+ IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]	NHDF IC ₅₀ [μM]
53. Dp4mT		0,27 ± 0,04	2,37 ± 0,97	-
54. Dp44mT		1,42 · 10 ⁻³ ± 0,13 · 10 ⁻³	5,27 · 10 ⁻³ ± 1,59 · 10 ⁻³	15,38 ± 5,06
55. Dp4eT		51,76 · 10 ⁻³ ± 7,30 · 10 ⁻³	0,30 ± 0,07	-
56. Dp44eT		2,27 · 10 ⁻³ ± 0,22 · 10 ⁻³	12,97 · 10 ⁻³ ± 3,22 · 10 ⁻³	-
57. Dp4pT		30,13 · 10 ⁻³ ± 4,99 · 10 ⁻³	64,53 · 10 ⁻³ ± 25,92 · 10 ⁻³	-

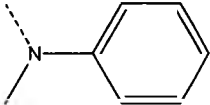
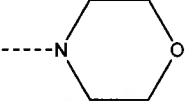
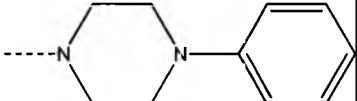
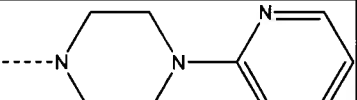
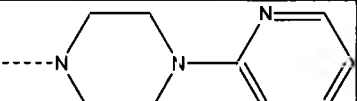
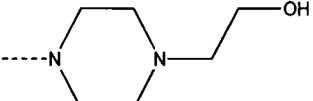
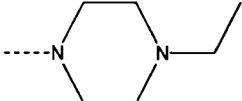
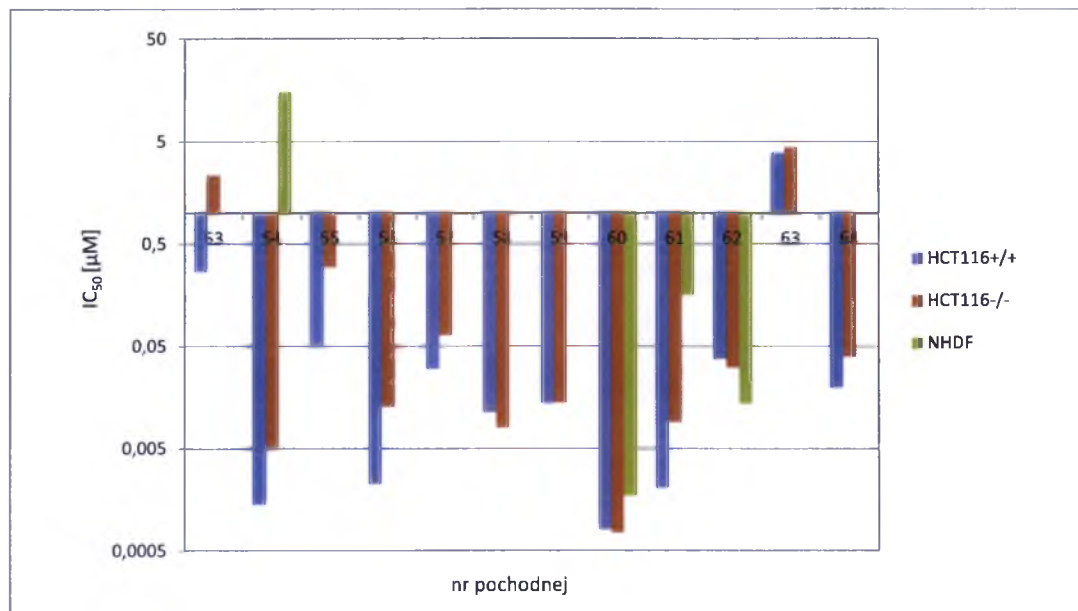
Nr związku	R	HCT116 +/- IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]	NHDF IC ₅₀ [μM]
58. Dp4m4p T		$11,26 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2,55 \cdot 10^{-3}$	$8,13 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,64 \cdot 10^{-3}$	-
59. MS155		$13,80 \cdot 10^{-3}$ $\pm 5,37 \cdot 10^{-3}$	$14,09 \cdot 10^{-3}$ $\pm 5,78 \cdot 10^{-3}$	-
60. MS154		$0,81 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,13 \cdot 10^{-3}$	$0,76 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,07 \cdot 10^{-3}$	$1,73 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,71 \cdot 10^{-3}$
61. MS199		$2,06 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,88 \cdot 10^{-3}$	$9,16 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,41 \cdot 10^{-3}$	0,16 $\pm 0,04$
62. MS200		$37,81 \cdot 10^{-3}$ $\pm 3,05 \cdot 10^{-3}$	$31,28 \cdot 10^{-3}$ $\pm 3,22 \cdot 10^{-3}$	$13,85 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,03 \cdot 10^{-3}$
63. MS104		3,91 $\pm 0,63$	4,43 $\pm 0,36$	-
64. MS153		$19,84 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,77 \cdot 10^{-3}$	$39,95 \cdot 10^{-3}$ $\pm 3,44 \cdot 10^{-3}$	-

Tabela 11

Struktury i aktywności analogów ketonu di-2-pirydylowego (pochodne 53-64)

Otrzymane wyniki aktywności dla pochodnych tej serii dowodzą, iż związki zawierające w swej strukturze układ podwójnego pierścienia ketonu di-2-pirydylowego odznaczają się wysoką aktywnością biologiczną. Wszystkie związki przedstawione w tabeli 11 posiadały wartość IC₅₀ poniżej 4 μM, przy czym zdecydowana większość wykazywała poziom aktywności rzędu nanomoli (Wykres 10). Aktywność pochodnych z serii Dp (53 – 58) na liniach komórek nowotworowych była bardzo wysoka – wartość IC₅₀ dla najbardziej aktywnego analogu (54) wynosiła około $1 \cdot 10^{-3}$ μM dla linii HCT116 +/+. Związek ten posiadał w swej strukturze dwie grupy metylowe na terminalnym atomie azotu, co potwierdza wcześniejsze wyniki wysokiej aktywności oraz selektywności dla związków tego rodzaju (pochodne 5, 15, 49). Zastąpienie jednej grupy metylowej atomem wodoru (pochodna 53) spowodowało około 200 – krotny

spadek aktywności (wzrost IC_{50}) dla linii HCT116 +/+ oraz 450 - krotny dla linii HCT116 -/-. Podobna sytuacja występowała dla pochodnych **4** oraz **14**. Porównanie pochodnych **55** i **56** nasuwa wniosek, iż obecność dwóch grup etylowych jest bardziej korzystne z punktu widzenia aktywności biologicznej. Selektywność związków **53** – **58** została opisana w pracach [118], [130]. Pochodna **54** jako jedyna została wybrana do testów na linii NHDF, a otrzymane wyniki potwierdziły wyniki zawarte w cytowanych pracach.

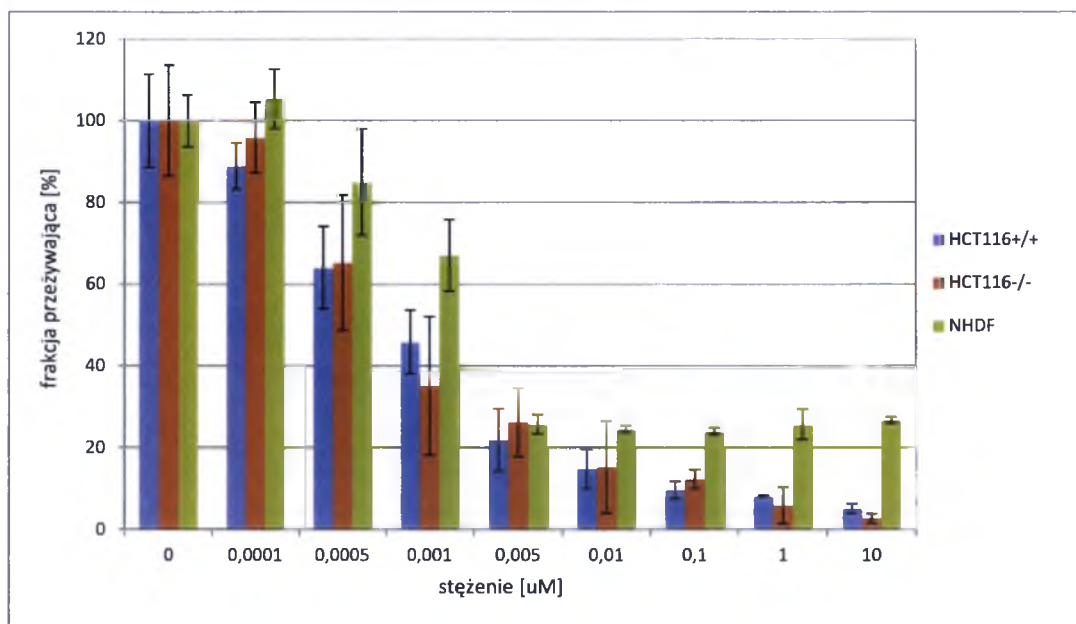


Wykres 10

Aktywność analogów ketonu di-2-pirydylowego w stosunku do komórek linii

Związki z serii MS (pochodne **59** – **64**), oprócz analogu **63** posiadały niskie wartości IC_{50} rzędu nanomoli (wysokie aktywności). Pochodna **60** jest najbardziej aktywnym związkiem ze wszystkich 72 zbadanych. Wartość IC_{50} w przypadku obu linii nowotworowych wynosi około $0,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$. Jednak tak jak w przypadku pozostałych pochodnych nie wykazuje selektywności w stosunku do komórek prawidłowych. Porównując pochodne **60** – **62** można stwierdzić, iż wraz ze wzrostem ilości atomów azotu w aromatycznym pierścieniu podstawnika maleje aktywność. Co ciekawe, jedynie pochodna **61** odznaczała się niską toksycznością w stosunku do linii NHDF, która w przypadku związków **60** i **62** była znacznie wyższa. Porównanie pochodnych **63** i **64** nasuwa wniosek, iż wpływ grupy hydroksylowej podstawnika wpływa negatywnie na aktywność tych związków.

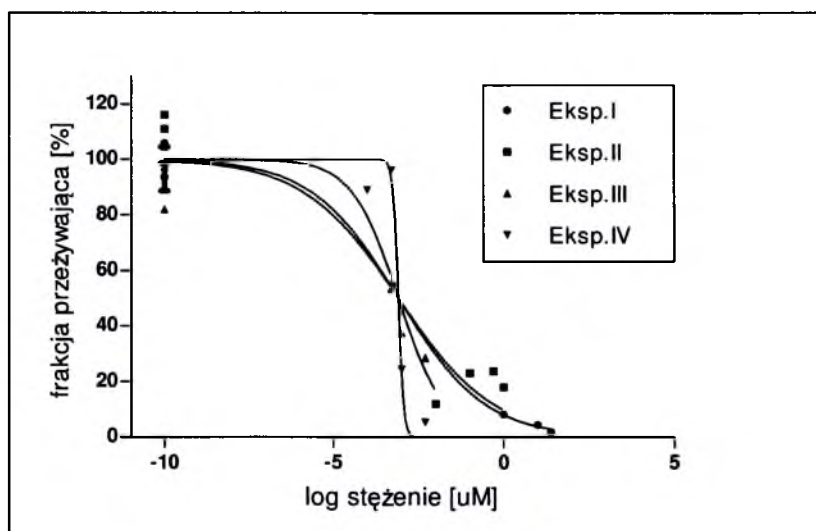
Na wykresie 11 przedstawiono zależność frakcji komórek przeżywających (linii HCT116 +/+, HCT116 -/- oraz NHDF) od stężenia dla najbardziej aktywnej pochodnej **60**.



Wykres 11

Przeżywalność komórek linii HCT116 +/+, HCT116 -/- oraz NHDF po 96 godzinnej inkubacji z pochodną **60**

Wszystkie wartości IC_{50} zostały obliczone w programie GraphPad Prism w oparciu o dopasowanie do funkcji dawka – efekt dla związków działających hamująco na proliferację. Przekład takiej krzywej został przedstawiony na wykresie 12.



Wykres 12

Krzywa dawka – efekt dla linii HCT116 +/+ po 96 godzinnej inkubacji ze związkiem **60**

Aktywności związków opartych na strukturze (3,3-dimetylobut-1-yno)-benzenu na dwóch liniach komórek nowotworowych przedstawiono w Tabeli 12.

STRUKTURA WIODĄCA - POCHODNE (3,3-DIMETYLOBUT-1-YNO)-BENZENU			
Nr związku	R	HCT116 +/+ IC ₅₀ [μM]	HCT116 -/- IC ₅₀ [μM]
65. SM22		-	>25
66. MS112		>25	>25
67. SM25		-	>25
68. SM24		-	>25

Tabela 12

Struktury i aktywności analogów (3,3-dimetylobut-1-yno)-benzenu (pochodne **65-68**)

Wszystkie pochodne (3,3-dimetylobut-1-yno)-benzenu nie wykazywały aktywności względem komórek nowotworowych. Niska aktywność na linii HCT116 -/- była powodem, iż zaniechano dalszą analizę na komórkach bez nokautu genu kodującego białko p53. Obecność potrójnego wiązania w strukturze tiosemikarbazonu prawdopodobnie usztywnia cząsteczkę, która traci tym samym możliwość chelatowania żelaza. Także brak heteroatomu w pierścieniu prawdopodobnie ma istotny wkład w brak aktywności przeciwnowotworowej.

Ostatnia seria pochodnych dotyczy kompleksów z jonami rutenu oraz cynku (Tabela 13).

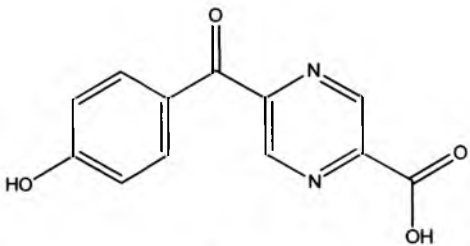
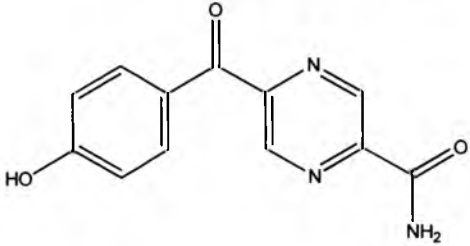
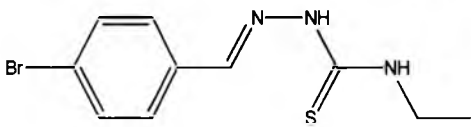
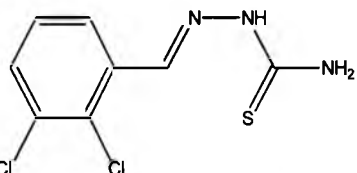
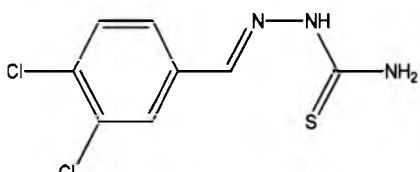
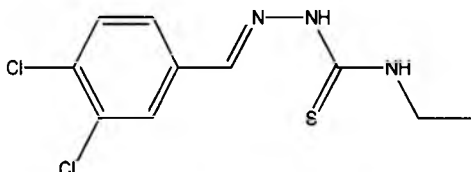
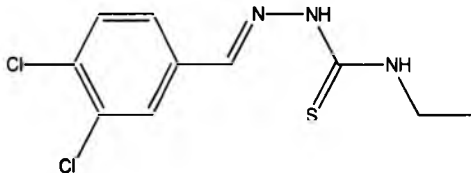
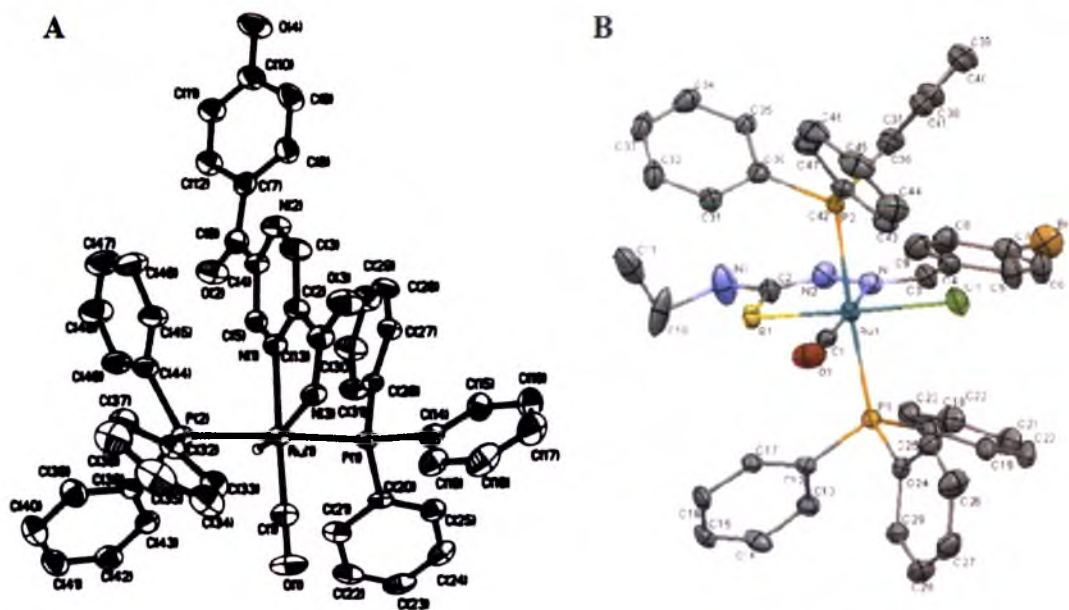
KOMPLEKSY Z RUTENEM I CYNKIEM		
Nr związku	Struktura ligandu	HCT116 -/ IC ₅₀ [μM]
69. SM3-Ru		>25
70. SM8-Ru		>25
71. MS100-Ru		>25
72. MS91-Ru		>25
73. MS97Ru		>25
74. MS96-Ru		>25
75. MS96-Zn		>25

Tabela 13

Struktury i aktywności kompleksów z rutenem i cynkiem (pochodne 69-75)

Dane zebrane w tabeli 13 dowodzą, iż kompleksy pochodnych tiosemikarbazonu z jonami rutenu oraz cynku nie wykazują aktywności względem linii HCT116 -/-. Struktury krystalograficzne pochodnych **69** – **74** zostały przedstawione w pracach [231], [232].



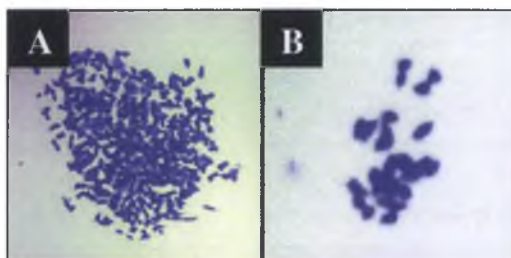
Rysunek 17

A - pochodna 70 w postaci kompleksu $[\text{RuH}(\text{CO})(\text{SM8})(\text{PPh}_3)_2]$ [231],
B – pochodna 71 w postaci kompleksu $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{MS100})(\text{PPh}_3)_2]$ [232]

Struktury kompleksów przedstawione na rysunku 17 wskazują na S, N - donorowy charakter ligandu, podobnie tak w przypadku kompleksów z żelazem (rysunek 6). Pomimo braku aktywności na liniach komórek nowotworowych związki te dostarczają cennych informacji na temat struktury utworzonych kompleksów. Ponadto związki te mogą znaleźć zupełnie inne zastosowanie np. jako katalizatory w utlenianiu pierwszo i drugorzędowych alkoholi [233] lub redukcji ketonów [234].

3.3.2. Test klonogenności

W celu określenia tzw. toksyczności przewlekłej badanych związków w stosunku do linii komórek nowotworowych przeprowadzono test klonogenności. Test ten ilustruje zdolność komórek do tworzenia kolonii, po wcześniejszym zaaplikowaniu testowanego związku. Pozwala stwierdzić czy dany związek hamuje rozwój komórek oraz czy niszczy systemy odpowiedzialne za naprawę uszkodzeń DNA, a więc czy posiada zdolność do regeneracji i dalszej proliferacji [235]. Komórki, które po zaaplikowaniu badanej substancji zachowały zdolność do wytworzenia klonów, posiadają tak zwany potencjał klonogeny. Wykonanie oznaczenia polegało na podaniu komórkom badanego związku, dziewięciodniowej inkubacji, a następnie zliczeniu powstałych kolonii. Za kolonię uznawano klaster liczący co najmniej 50 komórek, odpowiadający 6 podziałom mitotycznym. Pomiar weryfikowało przy użyciu mikroskopu odwróconego za pomocą którego liczono komórki w koloniach uznanych za wątpliwe (Rysunek 18). Ze względu na losową śmierć w wyniku różnych uszkodzeń nie wszystkie posiane komórki utworzyły kolonie, dlatego dla komórek kontrolnych obliczono tzw. wydajność posiewu (*ang.* plating efficiency; PE);



Rysunek 18

A – kolonia licząca więcej niż 50 komórek, B – kolonia wątpliwa

$$PE = \frac{L_k}{L_0},$$

gdzie: L_k - liczba wytworzonych na szalce kolonii,

L_0 - liczba posianych komórek.

Następnie korzystając z PE obliczono frakcję komórek przeżywających (*ang.* surviving fraction; SF). SF dla komórek kontrolnych przyjęto za równe 1.

$$SF = \frac{L_k}{(L_0 \cdot PE)}$$

Oznaczenia zostały przeprowadzone dla wybranych pochodnych 2-benzoilopirydyny oraz ketonu di-2-pirydyny, których struktury wraz z wartościami IC_{50} dla linii HCT116 +/+, użytej w teście klonogenności, zostały zebrane w tabeli 14. Pochodne **49**, **51** i **56** zostały wytypowane do opisywanego testu ze względu na fakt, iż są to jedne z

najbardziej aktywnych związków przebadanych w ramach przygotowania niniejszej pracy. Pochodne **55** i **53**, posiadające niższą aktywność, zostały wybrane w celu porównania z ich bardziej aktywnymi analogami. Ze względu na znaczną różnicę w aktywnościach opisywanych pochodnych, wyniki zostały przedstawione na dwóch wykresach 13 i 14.

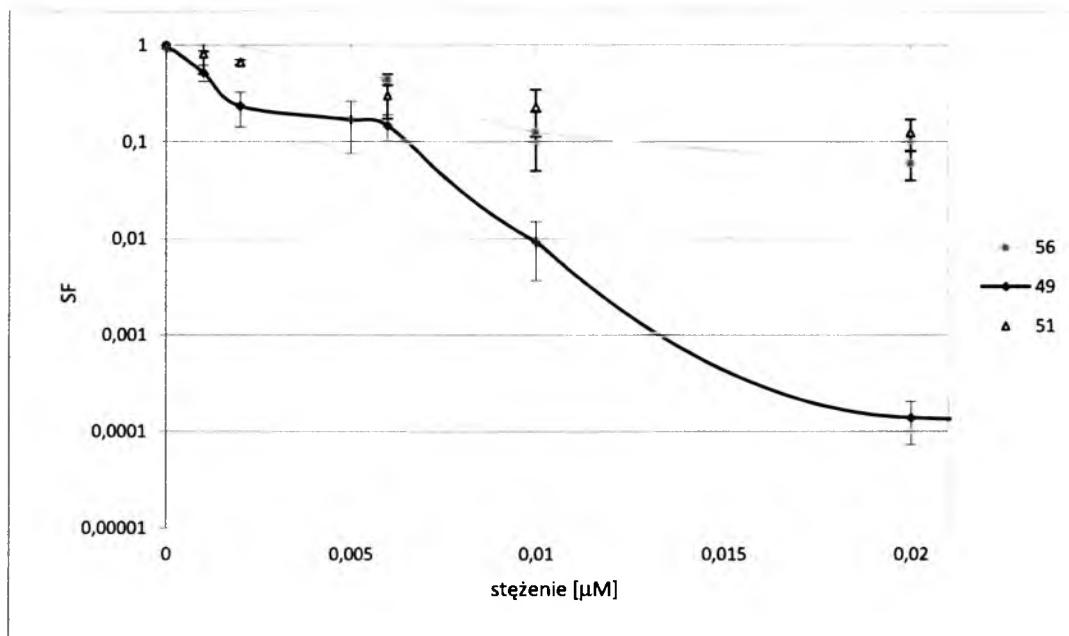
POCHODNE 2-BENZOILOPIRYDINY ORAZ KETONU DI-2-PIRYDINY			
Nr związku	R1, R2	HCT116 +/- IC ₅₀ [μM]	SF dla c = 0,02 μM
49 (Bp44mT)	R1 = C, R2 = N(CH ₃) ₂	1,41 · 10 ⁻³ ± 0,32 · 10 ⁻³	1,39 · 10 ⁻⁴
56 (Dp44eT · H ₂ O)	R1 = N, R2 = N(C ₂ H ₅) ₂	2,27 · 10 ⁻³ ± 0,22 · 10 ⁻³	6,00 · 10 ⁻²
51 (Bp44eT)	R1 = C, R2 = N(C ₂ H ₅) ₂	3,21 · 10 ⁻³ ± 0,37 · 10 ⁻³	1,24 · 10 ⁻¹
55 (Dp4eT)	R1 = N, R2 = NHC ₂ H ₅	51,76 · 10 ⁻³ ± 7,30 · 10 ⁻³	2,04 · 10 ⁻¹
53 (Dp4mT)	R1 = N, R2 = NHCH ₃	0,27 ± 0,04	5,85 · 10 ⁻¹

Tabela 14

Struktury, aktywności oraz współczynnik SF dla pochodnych **49**, **56**, **51**, **55**, **53**

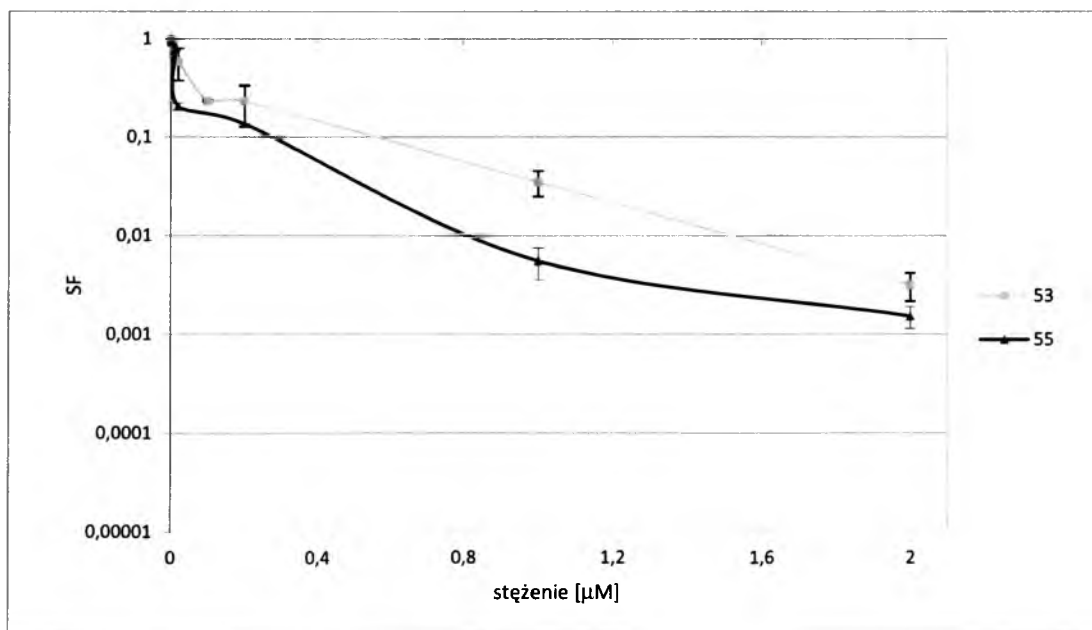
Otrzymane wartości współczynnika SF dobrze korelują z wartościami IC₅₀ (Tabela 14). W przypadku najbardziej aktywnych pochodnych (**49**, **56** i **51**) nie udało się wyhodować koloni dla stężeń powyżej 0,2 μM, dlatego pomiary prowadzono w zakresie obejmującym stężenia od 10⁻³ do 0,02 μM. W przypadku najbardziej aktywnej pochodnej **49** przy stężeniu 0,01 μM obserwowano drastyczny spadek proliferacji komórek. Sytuacja była odmienna w przypadku związków mniej aktywnych. Pomiary dla pochodnych **55** i **53** prowadzono w szerszym zakresie stężeń, nawet do 2 μM.

Niskie stężenia (poniżej $5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$) wymagały posiewu niewielkiej ilości komórek. Dopiero stężenie około $1 \mu\text{M}$ powodowało istotny spadek żywotności komórek. Wyniki obrazują wykresy 13 i 14.



Wykres 13

Zależność frakcji przeżywającej (SF) od stężenia dla pochodnych 49, 51 i 56

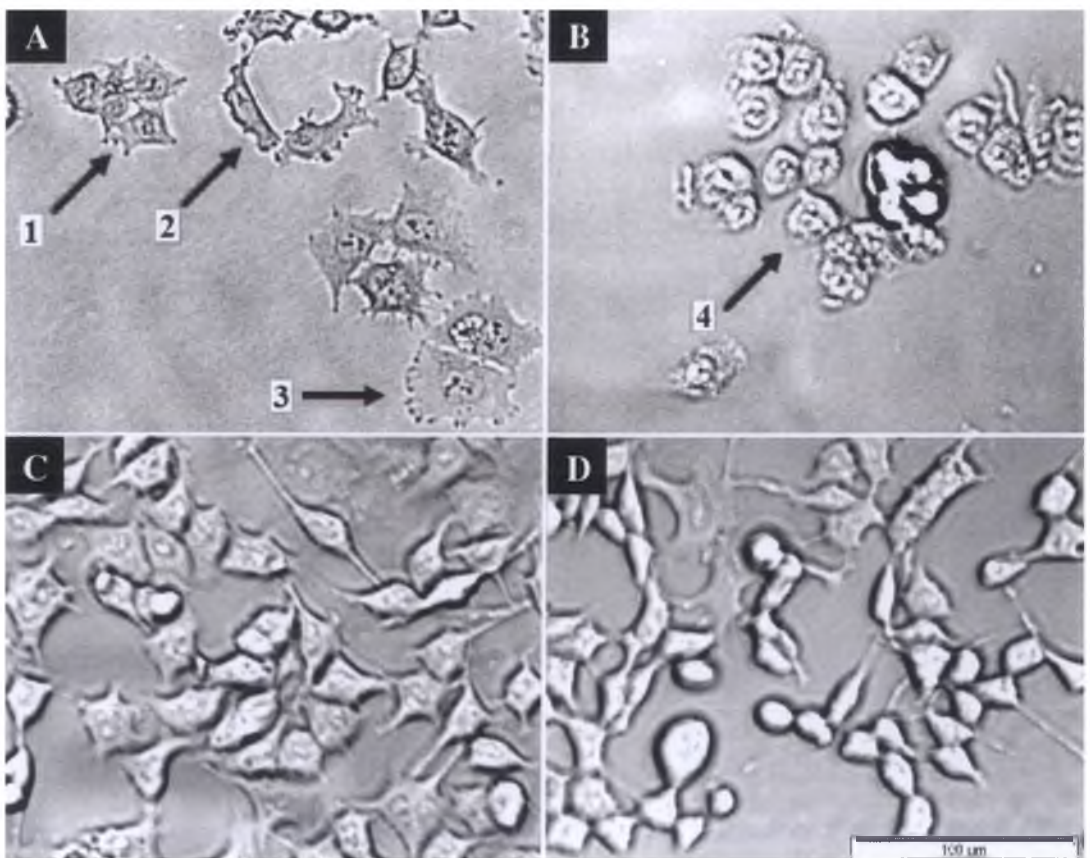


Wykres 14

Zależność frakcji przeżywającej (SF) od stężenia dla pochodnych 53 i 55

3.4. Morfologia komórek – mechanizm śmierci

W celu zobrazowania morfologii komórek po inkubacji z badanymi związkami wykonano zdjęcia w świetle przechodzącym. Do badań zostały wybrane dwa związki - najbardziej aktywna pochodna **60** oraz pochodna **46** uznana za nieaktywną. Stężenia związków (związek **60** – $2 \cdot 10^{-3}$ μM , związek **46** – 25 μM) dobrano na podstawie przeprowadzonego wcześniej testu MTS. Obrazy morfologii komórek w przypadku pochodnej **60** zostały zarejestrowane w dwóch punktach czasowych 24 i 96 godzin. W przypadku pochodnej **46** nie obserwowano istotnej różnicy w morfologii komórek po czasie 24 i 96 godzin. Na rysunku 19 przedstawiono zmiany morfologiczne komórek linii HCT116 +/- po inkubacji z pochodnymi **60** i **46**. Zdjęcie 19 A wykonane po 24 godzinach inkubacji przedstawia cechy charakterystyczne dla apoptozy; (strzałki) **1** obkurczenie jąder i kondensacja chromatyny, **2** obkurczenie komórek, **3** występowanie pęcherzyków na powierzchni błony. Nie obserwowano jednak występowania charakterystycznych ciałek apoptotycznych. Po 96 godzinnej inkubacji obraz

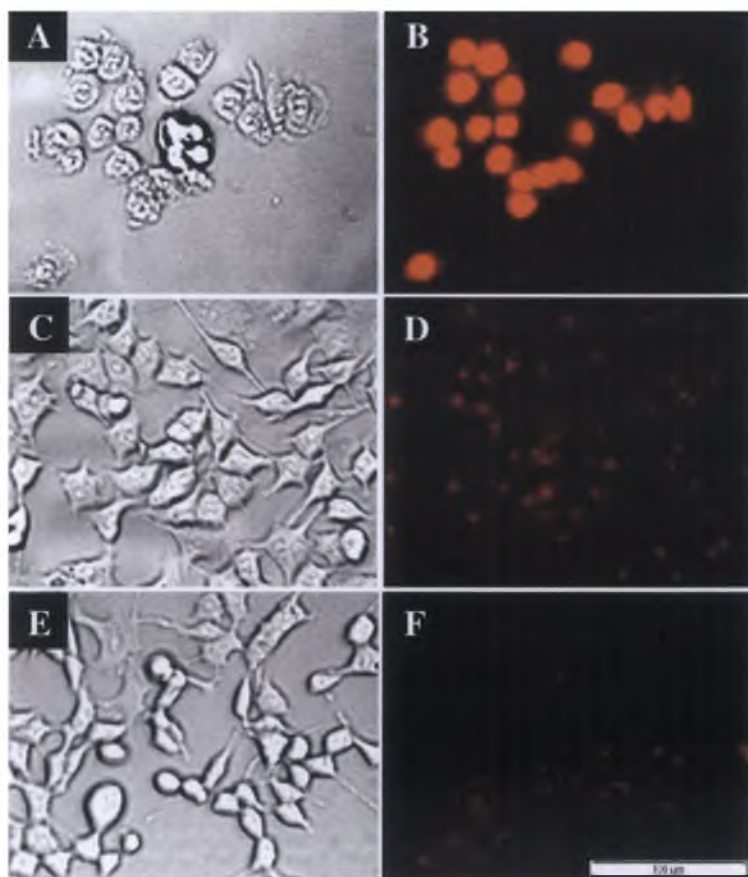


Rysunek 19

Zmiany morfologiczne w komórkach linii HCT116 +/-; **A** – 24 h z pochodną 60, **B** – 96 h z pochodną 60, **C** – 96 h z pochodną 46, **D** – kontrole, skala 100 μm

morfologiczny uległ drastycznej zmianie. Komórki wykazywały już znaczny stopień degeneracji, były zaokrąglone, a treść komórkowa przedostała się na zewnątrz błony komórkowej (zdjęcie 19 B, strzałka 4). W przypadku obrazów uzyskanych dla pochodnej 46 (zdjęcie 19 C) nie zaobserwowano istotnych różnic w morfologii komórek inkubowanych z opisywaną pochodną oraz komórek kontrolnych (zdjęcie 19 D). W obu przypadkach komórki zachowały swój pierwotny kształt, były adherentne oraz dobrze zachowane.

W celu bardziej dokładnego określenia mechanizmu śmierci, jakiemu ulegają komórki po 96 - godzinnej inkubacji z badanymi związkami wykonano barwienie jodkiem propidyny. W oznaczeniu tym wykorzystuje się zdolność JP do wiązania z DNA, które zachodzi tylko w przypadku komórek z uszkodzoną błoną [236]. Maksimum absorpcji JP występuje przy 535 nm, natomiast widmo emisji charakteryzuje się maksimum dla długości fali również 617 nm. Rezultaty przedstawia rysunek 20.



Rysunek 20

Zmiany morfologiczne oraz barwienie JP komórek linii
HCT116 +/-;

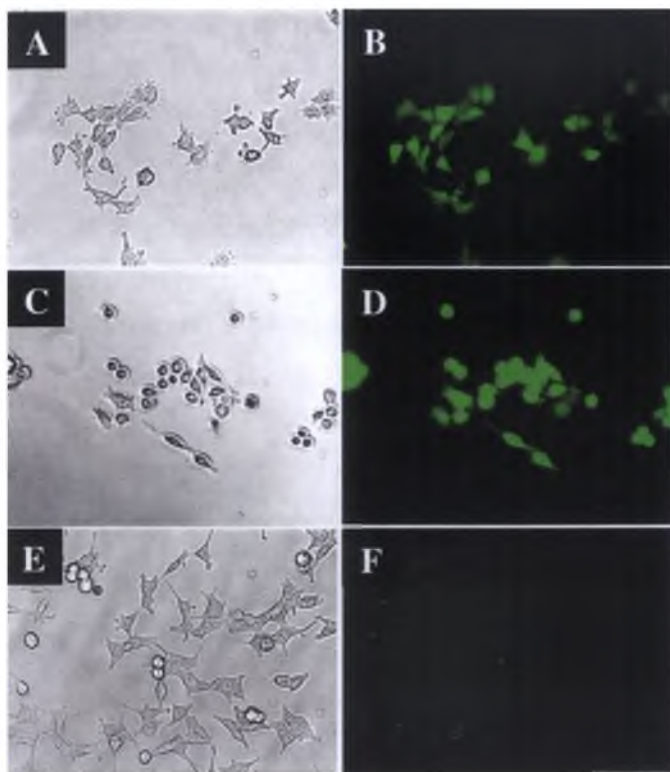
A, B – pochodna 60, C, D – pochodna 46, E, F – kontrole,
skala 100 µm

Otrzymane zdjęcia dowodzą, iż po 96 godzinach inkubacji ze związkami **60** (Zdjęcia 20 A i B) komórki wykazywały cechy typowe dla nekrozy lub później apoptozy. Błona komórkowa uległa rozerwaniu o czym świadczy czerwona fluorescencja (Zdjęcie 20 B). W przypadku komórek inkubowanych z pochodną **46** (Zdjęcia 20 C i D) oraz komórek kontrolnych (Zdjęcia 20 E i F) nie obserwowano powyższych zmian, a komórki nie emitowały czerwonej barwy. Obrazy morfologii komórek po 24 - godzinnej inkubacji z pochodną **60** nasuwają wniosek, iż komórki wstąpiły na apoptotyczny szlak śmierci. Jednak brak charakterystycznych ciałek apoptotycznych oraz wyniki barwienia JP dla 96 – godzinnej inkubacji, nie dają jednoznacznych wyników. Na podstawie testów przeprowadzonych w niniejszej pracy można wysunąć przypuszczenie, iż komórki po 24 godzinach inkubacji ulegają apoptozie, jednakże dłuższe czasy powodują całkowite zniszczenie komórki, która traci integralność błony. Przeprowadzone wcześniej testy cytotoksyczności zostały wykonane po 96 godzinach inkubacji ze związkami. W wyniku przeprowadzonych testów oceny morfologii oraz barwienia JP stwierdza się, iż taki czas inkubacji w przypadku pochodnej **60** powoduje degradację komórki. W przypadku pochodnej **46**, która nie wykazywała toksyczności w stosunku do linii komórek HCT116 +/- otrzymane obrazy morfologii oraz test z barwieniem JP potwierdzają obojętność tej pochodnej w stosunku do badanej linii komórkowej.

3.5. Mechanizm działania – generowanie reaktywnych form tlenu

W celu określenia mechanizmu działania badanych związków przeprowadzono test określający generowanie reaktywnych form tlenu. W teście tym wykorzystuje się acetylowaną pochodną 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H_2DCFDA). W reakcji odłączenia grup acetylowej oraz utlenienia przez wewnątrzkomórkowe esterazy powstaje pochodna 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF) emitująca zieloną fluorescencję, będącą indykatorem ROS [237–239]. Maksimum absorpcji barwnika występuje w zakresie 492 – 495 nm, natomiast emisja jest obserwowana dla długości fali z zakresu 517 – 527 nm. Test został przeprowadzony dla najbardziej aktywnej pochodnej **60** w stężeniu $10^{-2} \mu M$. Czas inkubacji komórek ze związkiem został skrócony do 24 godzin, w oparciu o wcześniej przeprowadzone testy oceniające morfologię komórek. W przypadku 96 – godzinnej inkubacji komórki wykazywały już znaczny stopień degeneracji, a obserwacja ROS nie byłaby możliwa. W celu porównania z kontrolą negatywną i pozytywną zastosowano również barwienie komórek niczym nie

traktowanych, oraz komórek inkubowanych 10 minut ze 100 μM roztworem H_2O_2 .
Rezultaty przedstawiono na rysunku 21.



Rysunek 21

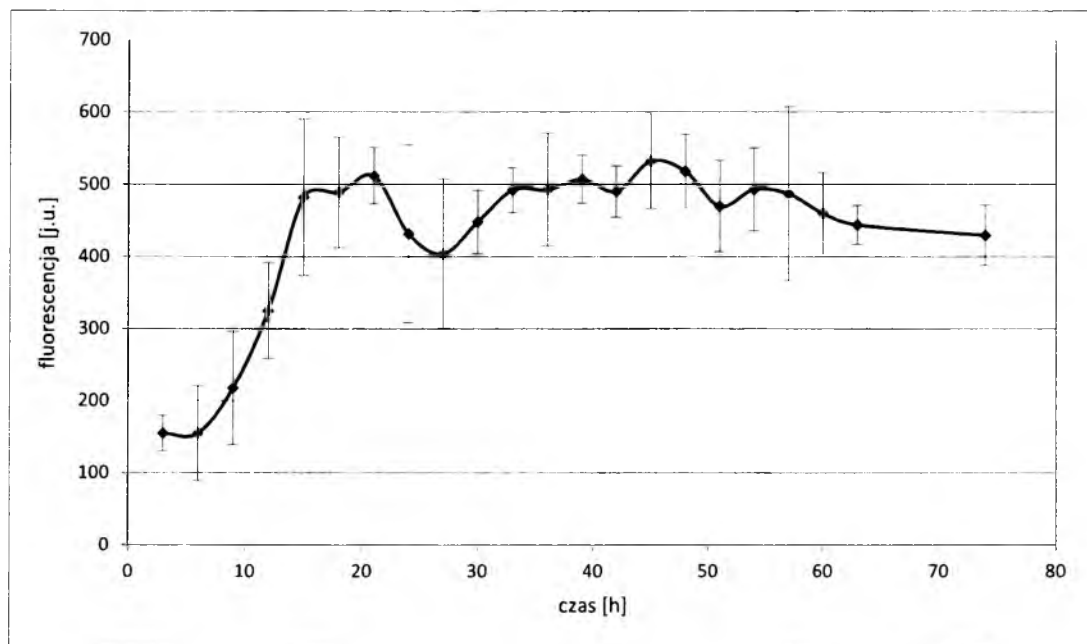
Generowanie ROS - komórki linii HCT116 +/+;
A, B – pochodna 60, C, D – H_2O_2 , E, F – kontrole,
skala 100 μm

Otrzymane zdjęcia dowodzą, iż po 24 godzinach inkubacji ze związkami **60** (Zdjęcia 21 A i B) komórki emitują zieloną fluorescencję, która świadczy o generowaniu ROS. Komórki traktowane H_2O_2 (Zdjęcia 21 C i D) również wykazują cechy świadczące o utworzonych reaktywnych formach tlenu. Sytuacja jest odmienna w przypadku komórek kontrolnych (Zdjęcia 21 E i F), które nie emitują zielonej barwy. Otrzymane rezultaty są zgodne z wynikami uzyskanymi w zespole prof. Richardsona dla analogów ketonu di-2-pirydylowego [103], [117]. Mechanizm działania tego typu pochodnych jest w dużej mierze związany z generowaniem reaktywnych form tlenu.

3.6. Badania nad wpływem chelatorów na zwiększenie efektu terapii PDT

3.6.1. Kinetyka powstawania PpIX po egzogennym podaniu ALA

W celu wyznaczenia maksymalnego stężenia PpIX w komórkach przeprowadzono eksperymenty dla różnych czasów inkubacji z ALA. Rodzaj linii komórkowej, ilość komórek oraz czas ich wzrostu zostały wyznaczone we wcześniejszych eksperymentach opierając się na doniesieniach literaturowych. Wyniki są prezentowane na wykresie 15, przedstawiającym zależność intensywności fluorescencji PpIX od czasu inkubacji z ALA.

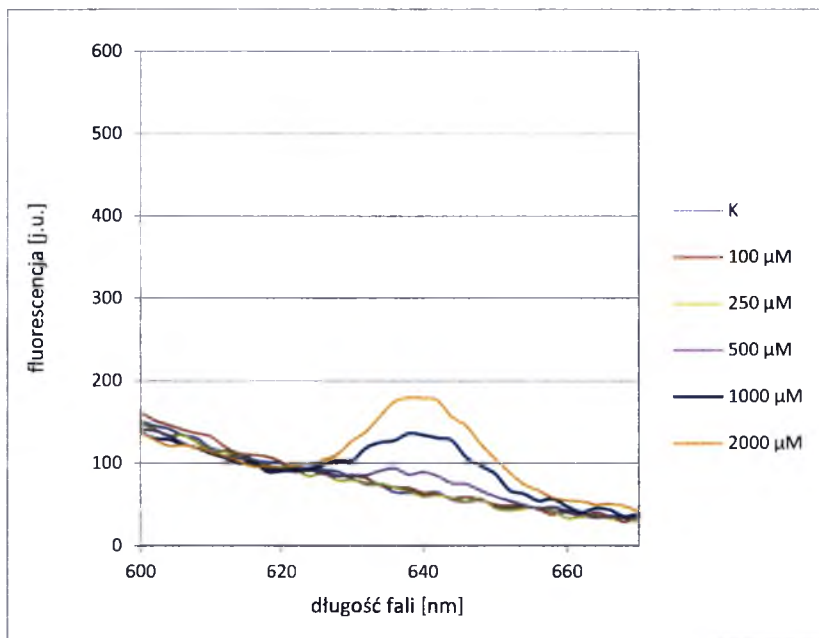


Wykres 15

Kinetyka powstawania PpIX

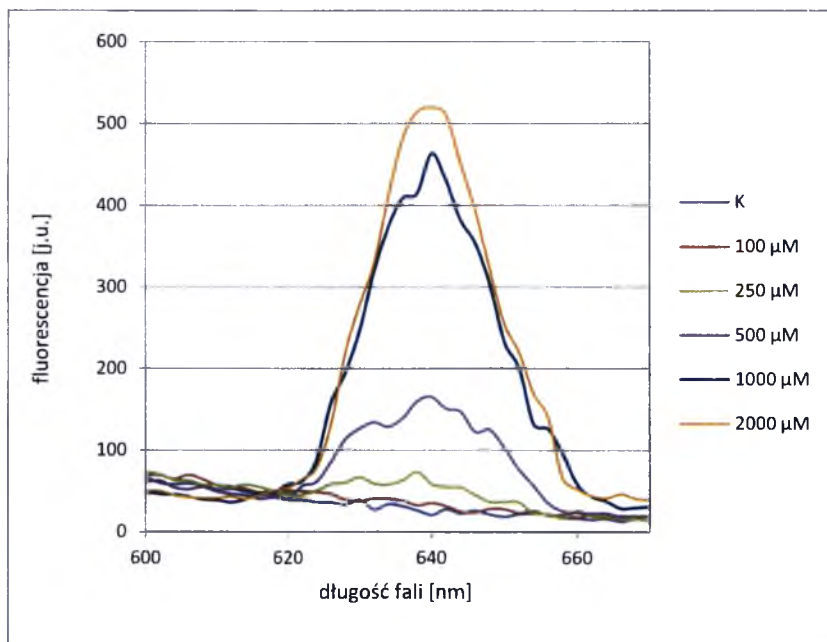
Interpretacja otrzymanych wyników pozwoliła wyznaczyć najbardziej efektywny czas inkubacji komórek z ALA, który wynosi około 24 h. Dłuższe czasy nie powodowały wzrostu stężenia PpIX w komórkach. W czasie pomiarów sprawdzano żywotność komórek przy pomocy testu MTS. Przez cały okres trwania pomiaru (74 h) komórki wykazywały aktywność enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej, co powodowało zmianę zabarwienia medium świadczącą o obecności formazanu. Brak surowicy nie powodował zahamowania proliferacji komórek. Zmiany intensywności fluorescencji w czasie prawdopodobnie świadczą o zależności powstawania PpIX od fazy cyklu komórkowego. Pomiarzy zostały przerwane po zaobserwowaniu niewielkiego spadku

intensywności fluorescencji oraz osiągnięciu maksymalnego stopnia konfluencji. Powyższe wyniki dotyczą stężenia ALA równego 1000 μM , które zostało wybrane po przeprowadzeniu wcześniejszych eksperymentów z różnymi stężeniami. Wyniki są prezentowane na wykresach 16 i 17 przedstawiających widma fluorescencji PpIX w wybranych punktach czasowych (6 i 24 h) dla różnych stężeń ALA:



Wykres 16

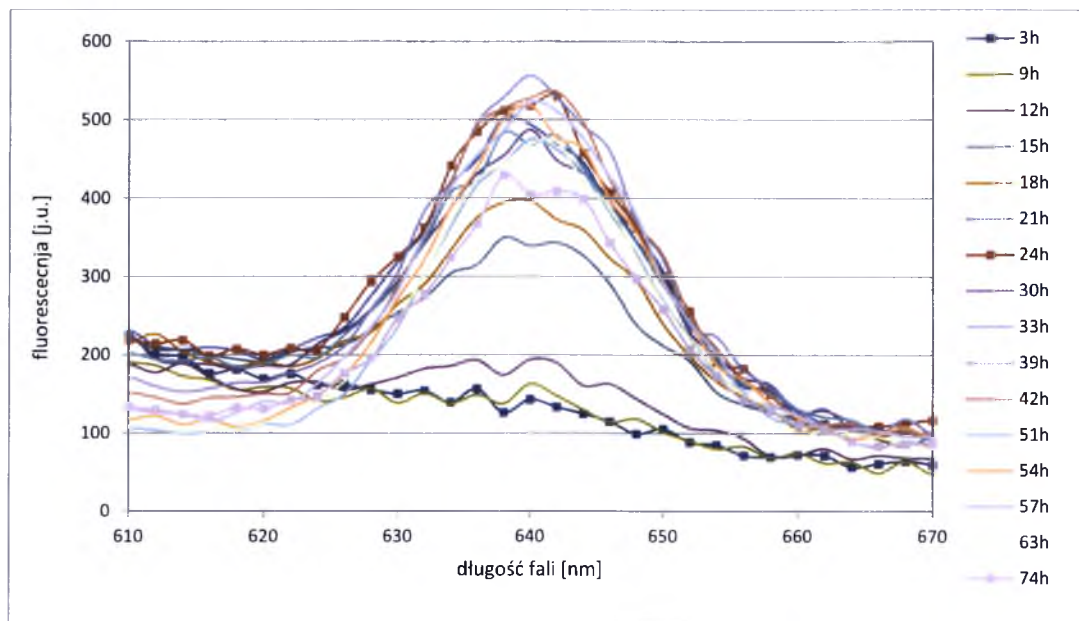
Intensywność fluorescencji PpIX po 6 h inkubacji z ALA



Wykres 17

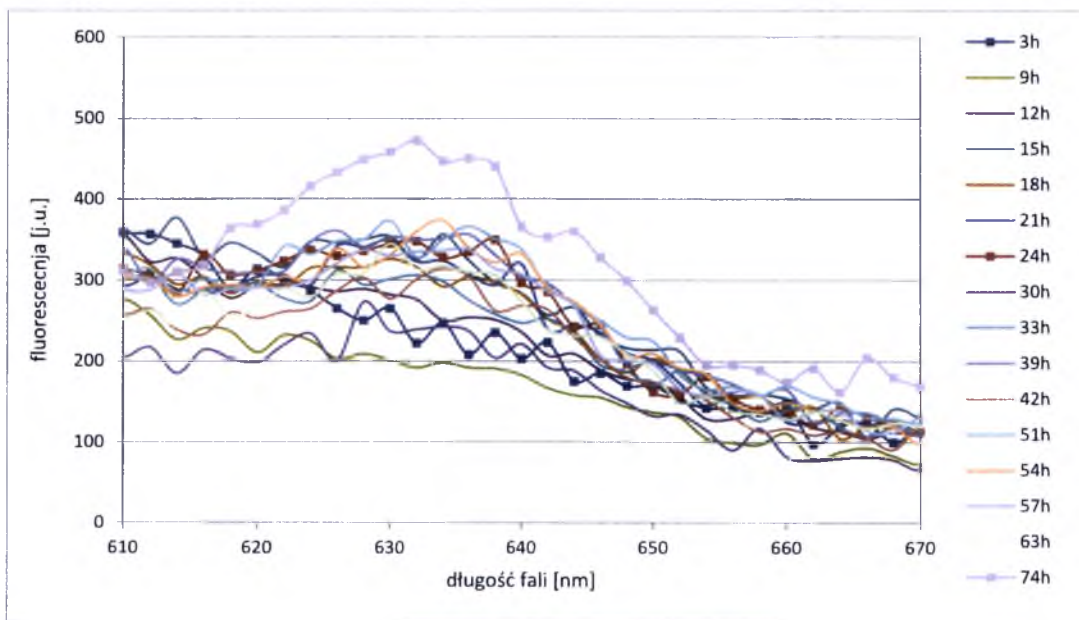
Intensywność fluorescencji PpIX po 24 h inkubacji z ALA

Eksperymenty prowadzono w medium pozbawionym surowicy oraz czerwieni fenolowej. Wskaźnik fenolowy został wykluczony ze względu na możliwość absorpcji promieniowania wzbudzającego PpIX. Obecność surowicy wygasza sygnał fluorescencji z powodu wiązania się PpIX z jej białkami [66]. Poniższe wykresy (18 i 19) przedstawiają wpływ surowicy na intensywność sygnału pochodzącego od fluorescencji PpIX.



Wykres 18

Intensywność fluorescencji PpIX po inkubacji z ALA w medium **bez surowicy**

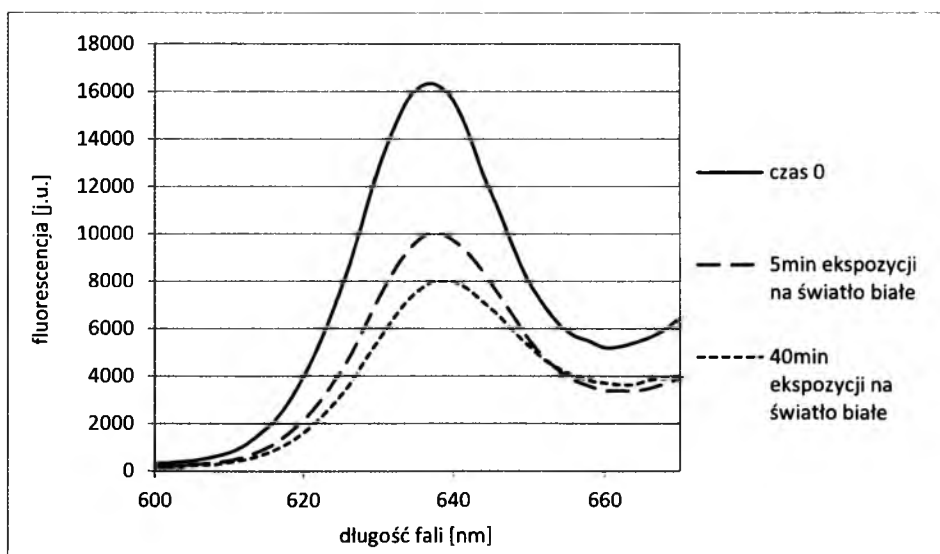


Wykres 19

Intensywność fluorescencji PpIX po inkubacji z ALA w medium **z surowicą**

Na wykresach zostały wyszczególnione punkty czasowe 3, 24 i 74 h. Porównując intensywności sygnału po 24 h widać, że w przypadku braku surowicy wartość wynosi około 530 j.u., podczas gdy dodanie surowicy pozwoliło na osiągnięcie jedynie około 330 j.u. i brak wzrostu fluorescencji przez niemal cały czas trwania pomiarów. Znaczący wzrost został zarejestrowany dopiero po upływie przeszło 70 h, kiedy większość białek surowicy została już związana, a proliferujące komórki wytworzyły kolejną porcję PpIX. Sytuacja była odmienna w przypadku pomiarów prowadzonych w medium bez surowicy. Znaczący wzrost został osiągnięty po około 24 h i pozostawał na tym poziomie, aż do czasu, gdy komórki pozbawione czynników wzrostowych zaczęły obumierać. Przyjęty model postępowania pozwala łatwo obserwować badane zjawiska, jednocześnie eliminując wpływ dodatkowych zmiennych.

Eksperymenty dotyczące kinetyki powstawania PpIX zostały przeprowadzone w warunkach zredukowanego natężenia światła. Liczne doniesienia literaturowe udowadniają wpływ promieniowania na fotowybielenie PpIX [240–243]. Spadek intensywności emisji jest spowodowany oddziaływaniem kwantów światła z cząsteczką fotouczulacza. Przeprowadzono eksperyment potwierdzający ten fakt. W tym celu płytka zawierająca 100 μM roztwór PpIX w DMSO została poddana działaniu promieniowania pochodzącego z żarówki halogenowej. Eksperyment miał charakter czysto poglądowy, dlatego nie podaje się dawek promieniowania tylko czas ekspozycji PpIX na działanie światła białego. Wyniki są prezentowane na Wykresie 20.



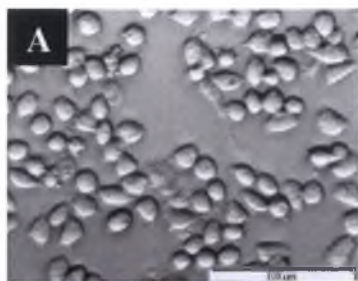
Wykres 20
Fotowybielenie PpIX

Przeprowadzony eksperyment potwierdził zasadność prowadzenia badań w warunkach zredukowanego natężenia światła, nie przekraczającego około 50 lx. Powyższy wykres dowodzi, iż po 5 minutach fluorescencja próbki zawierającej 100 μM PpIX spada mniej więcej o połowę. Dalsze naświetlanie nie powoduje już tak znaczącego spadku jak w pierwszych minutach naświetlania.

3.6.2. Morfologia komórek po inkubacji z ALA oraz lokalizacja powstałej PpIX

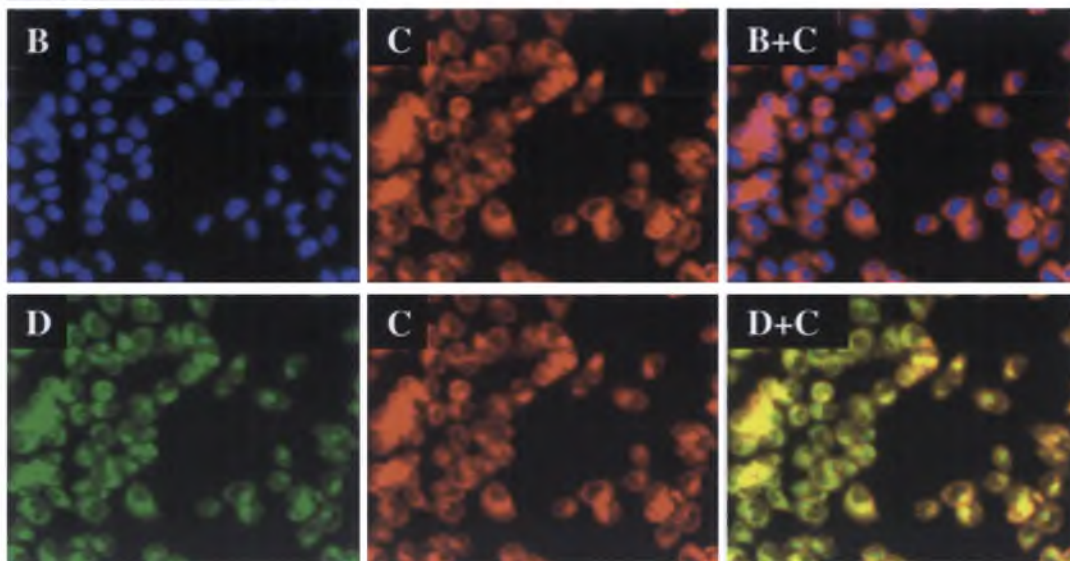
Prowadzenie eksperymentu w medium bez surowicy, dostarczającej komórkom czynników wzrostowych, wymagało kontrolowania morfologii komórek w czasie inkubacji z ALA. Ponadto, jak wspomniano, w trakcie eksperymentu sprawdzano żywotność komórek przy pomocy testu MTS. Na rysunku 22 (zdjęcie A) przedstawiono morfologiczny obraz komórek, które wykazywały żywotność i brak cech świadczących o ich degradacji. Potwierdzeniem był test na aktywność enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej. Dobry stan komórek świadczy również o braku toksyczności ciemnej egzogennie podanego ALA oraz powstałej endogennie PpIX.

Ponadto wykonano barwienie komórek po 24 – godzinnej inkubacji ze 1000 μM roztworem ALA w celu określenia lokalizacji PpIX. Jądra zostały wybarwione barwnikiem DAPI, który ma zdolność przenikania przez nieuszkodzone błony komórkowe i wiązania się do DNA [244]. Maksimum absorpcji DAPI występuje przy 358 nm, natomiast maksimum emisji przy 461 nm. Mitochondria barwiono odczynnikami MitoTracker[®] Orange CMTMRos, którego widmo absorpcji charakteryzuje się maksimum występującym przy 554 nm, natomiast maksimum emisji obserwuje się przy 576 nm. Powstała endogennie PpIX została wzbudzana długością fali z zakresu uwzględniającego jej maksimum absorpcji (407 nm), natomiast emisja występowała przy 638 nm. Rezultaty barwienia przedstawia rysunek 22. Zdjęcie 22 B, obrazuje jądra komórkowe, które nie wykazują cech świadczących o uszkodzeniach (np. kondensacji chromatyny, rozpadu lub obkurczenia). Zdjęcie 22 C przedstawia czerwoną emisję PpIX. Na zdjęciu B+C przedstawiono nałożenie obrazów emisji jąder oraz PpIX, które wskazuje, że powstały fotouczulacz znajduje się w obszarze pozajądrowym. Zdjęcie 22 D przedstawia zieloną fluorescencję wybarwionych mitochondriów. Nałożenie zdjęć D i B świadczy o mitochondrialnej lokalizacji PpIX, co jest potwierdzeniem jej endogennej syntezy [245–247].



Rysunek 22

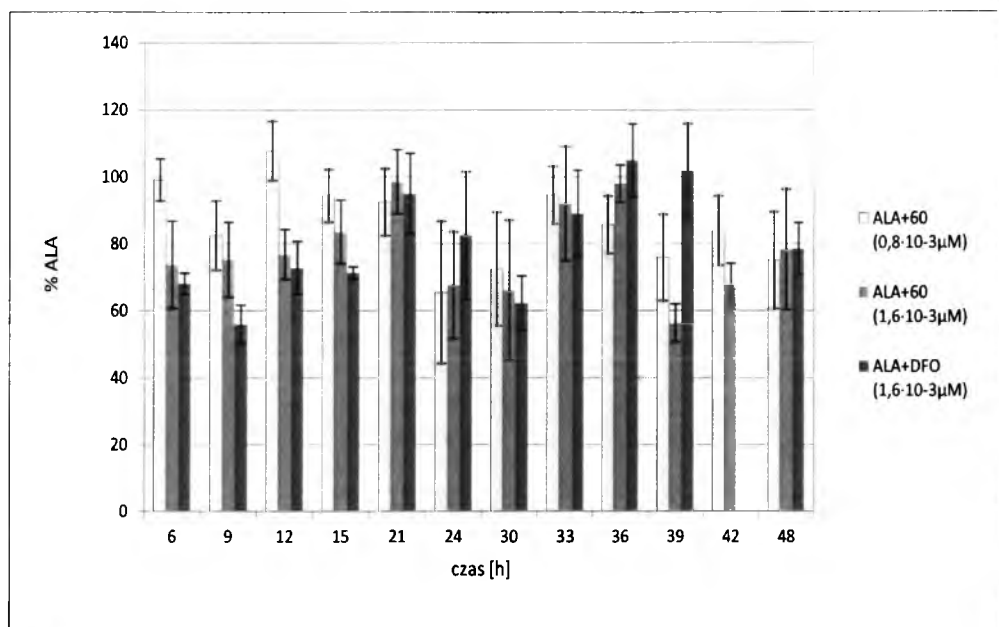
Komórki linii HCT116 +/+;
 A- po 24 godzinnej inkubacji z ALA
 B – DAPI, C – PpIX, D – MitoTracker,
 skala 100 μ m



3.6.3. Wpływ chelatorów na powstawanie PpIX

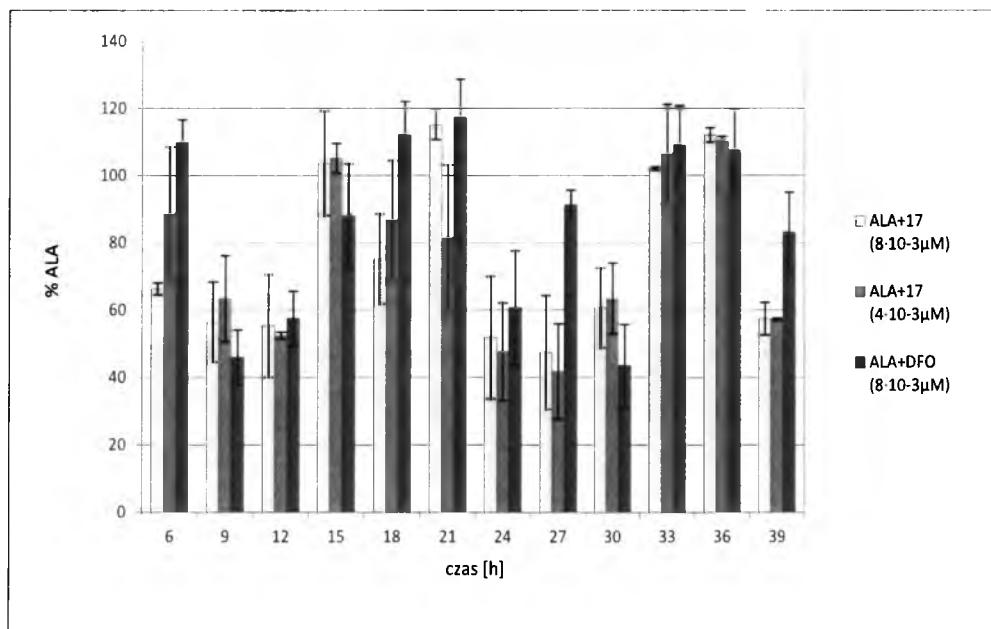
W celu określenia wpływu badanych związków na powstawanie PpIX w komórkach przeprowadzono eksperymenty dla różnych czasów inkubacji z 1000 μ M roztworem ALA oraz różnych stężeń czterech wybranych pochodnych: **17**, **60**, **25** oraz **46**. Związki te zostały wybrane w oparciu o ich wcześniej wyznaczone aktywności na liniach komórek nowotworowych oraz prawidłowych. Pochodna **60** jest najbardziej aktywnym związkiem spośród wszystkich 72 zbadanych, jednak wykazuje toksyczność również na linii NHDF. Pochodna **17** posiada również wysoką aktywność, ale dodatkowo odznacza się wysoką selektywnością w stosunku do zdrowych komórek. Pochodne **25** i **46** posiadają IC_{50} powyżej 25 μ M. Pomiary prowadzono w krótszym zakresie czasowym od 3 do około 50 godzin, w oparciu o wcześniejsze pomiary kinetyki z samym ALA. Dodatkowo związkiem referencyjnym była DFO, ponieważ związek ten powoduje wzrost stężenia PpIX dla wielu linii komórek nowotworowych [68], [112], [113]. Stężenia wybranych pochodnych zostały dobrane w oparciu o wyznaczone wartości IC_{50} . Wybrana wartość była ograniczona z góry, gdyż w

przypadku aktywnych pochodnych wyższe stężenia powodowały śmierć komórek. Stężenie DFO było porównywalne do stężenia badanych związków.



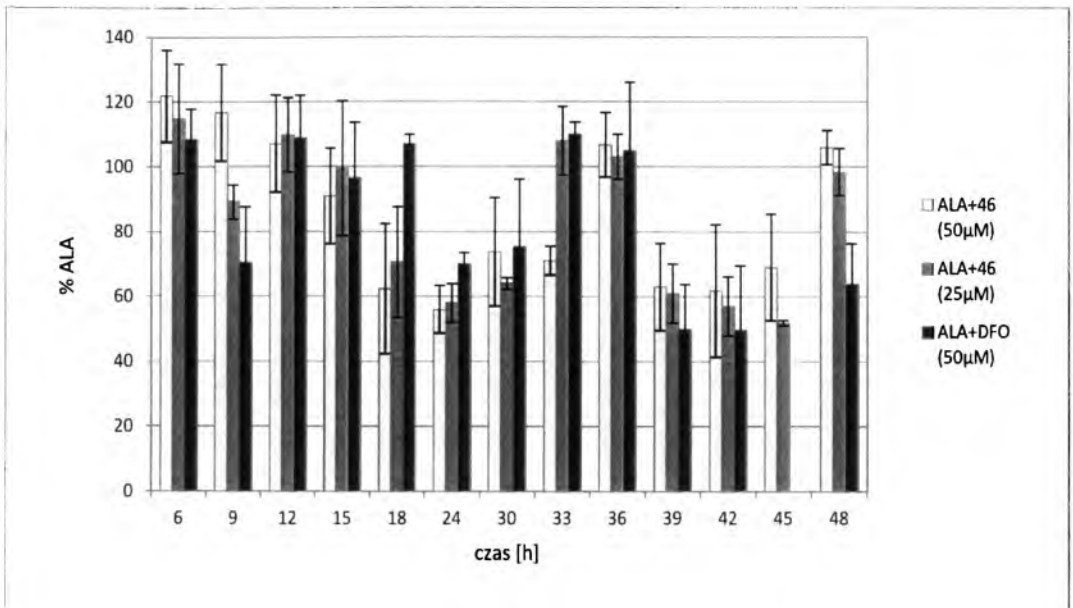
Wykres 21

Wpływ pochodnej 60 oraz DFO na powstawanie PpIX w komórkach linii HCT116+/-



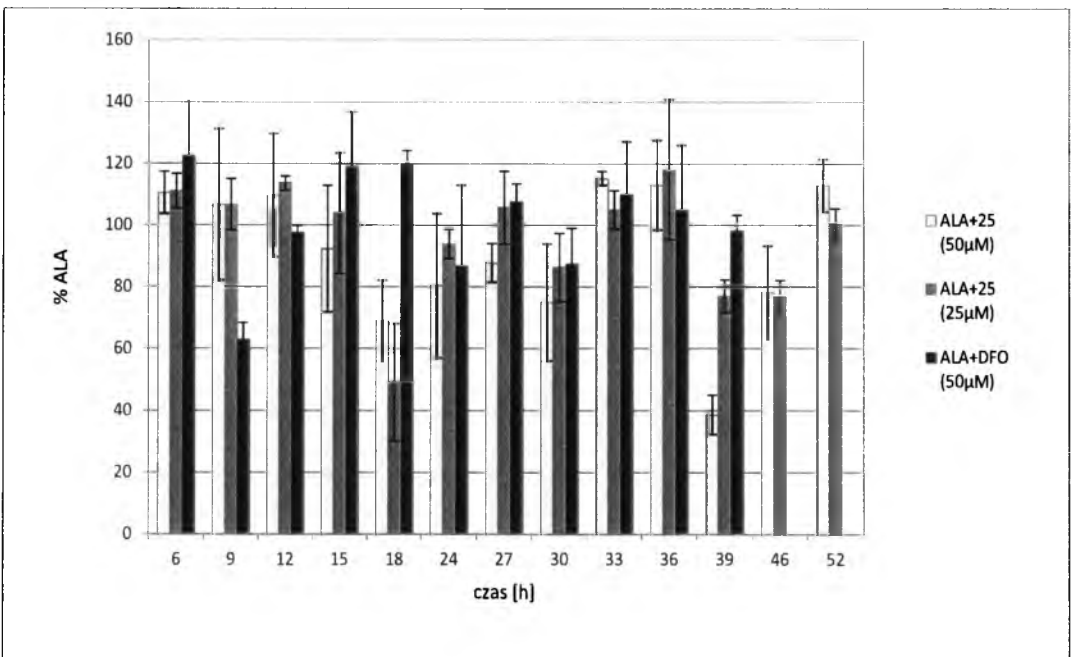
Wykres 22

Wpływ pochodnej 17 oraz DFO na powstawanie PpIX w komórkach linii HCT116+/-



Wykres 23

Wpływ pochodnej **46** oraz DFO na powstawanie PpIX w komórkach linii HCT116/+

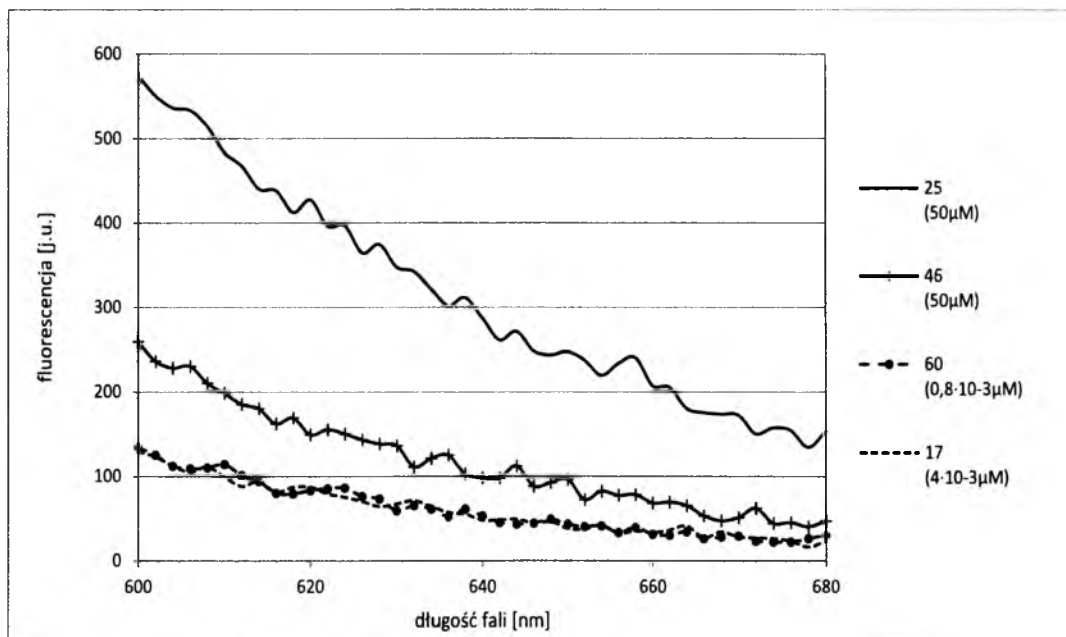


Wykres 24

Wpływ pochodnej **25** oraz DFO na powstawanie PpIX w komórkach linii HCT116/+

Na osi odciętych oznaczono procent intensywności fluorescencji PpIX w stosunku do kontroli, jaką były komórki traktowane samym 1000 µM roztworem ALA. Powyższe wykresy (21 – 24) wskazują na brak wpływu badanych związków na zwiększone

powstawanie PpIX w komórkach linii HCT116 +/- . W przypadku aktywnych pochodnych stężenie wynosiło od $0,8 \cdot 10^{-3}$ do $8 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$, więc zgodnie ze stechiometrią reakcji chemicznej tak małe stężenie substratów powoduje utworzenie niewielkiej ilości kompleksu z żelazem. Stężenie to wydaje się niewystarczające aby wpływ chelatorów na cykl syntezy hemu był zauważalny. Większe stężenie powodowało śmierć komórek. W przypadku nieaktywnych pochodnych najwyższe stężenie wynosiło $50 \mu\text{M}$, jednakże również nie obserwowano wzrostu stężenia PpIX. Stosowany związek referencyjny - DFO w stężeniu $50 \mu\text{M}$, tak jak w przypadku reszty związków, nie zwiększał stężenia fotouczulacza. Prawdopodobnym wyjaśnieniem jest więc wpływ ferrochelatazy, której ekspresja w komórkach badanej linii jest obniżona [70], [71]. Obserwacje przyniosły dość nieoczekiwany rezultat w świetle licznych doniesień dotyczących wpływu chelatorów żelaza na hamowanie syntezy hemu poprzez kompleksowanie jonów żelaza. Przeprowadzone badania wskazują, że w przypadku linii HCT116 +/- przy badanych stężeniach chelatorów mechanizm ten nie jest obserwowany. Dodatkowo dla wszystkich badanych związków zostały zmierzone widma fluorescencji przy wzbudzeniu $\lambda = 407 \text{ nm}$, w celu wykluczenia ewentualnego nakładania się ich widm z widmem PpIX. Wykres 25 wskazuje na brak interferencji pików pochodzących od badanych związków z pikami PpIX.

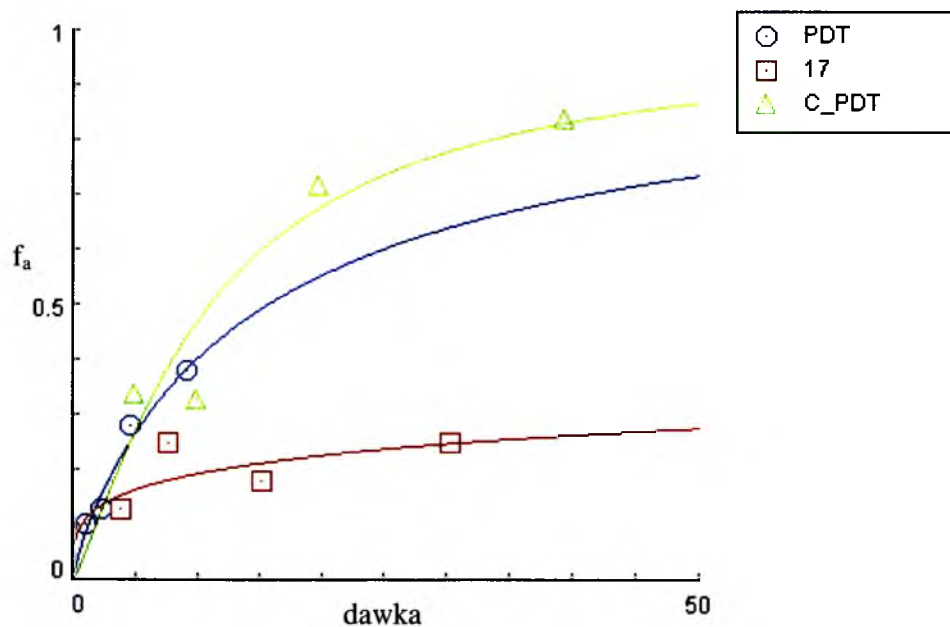


Wykres 25

Widma emisji badanych związków $\lambda_{\text{ex}} = 407 \text{ nm}$

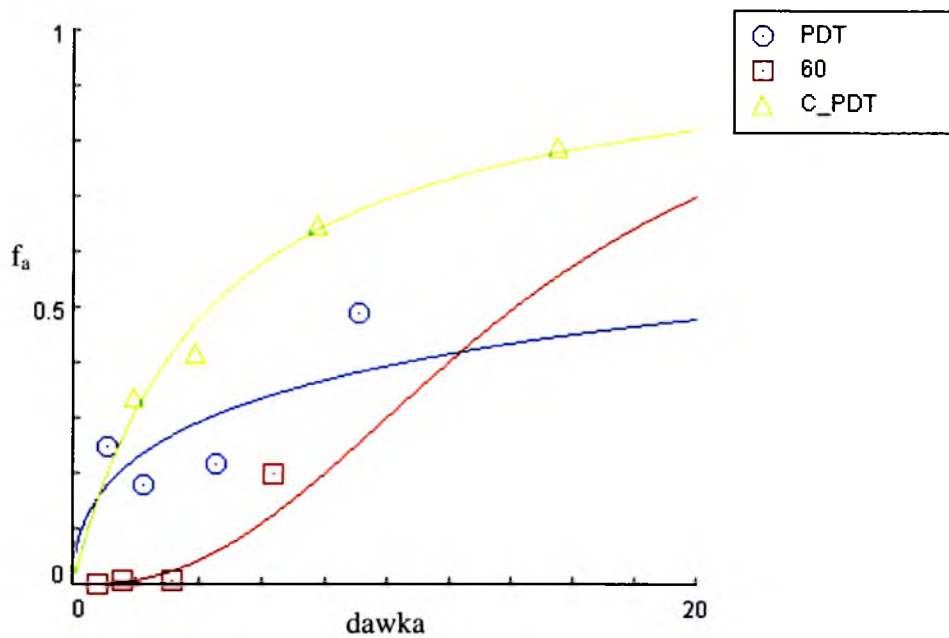
3.6.4. Synergiczne działanie tiosemikarbazonów i ALA

Badania nad terapią kombinowaną rozpoczęto od opracowania optymalnej dawki, czasu inkubacji oraz kolejności podawania poszczególnych składowych. W rezultacie najefektywniejsza okazała się metoda z jednoczesnym podaniem ALA i tiosemikarbazonu, połączona z 24 godzinną inkubacją zakończoną naświetleniem komórek. Badania zostały prowadzone dla różnych stężeń czterech pochodnych: 17, 60, 25 oraz 46, których wpływ na szlak syntezy hemu został zbadany we wcześniejszych testach. Tak jak w przypadku poprzednich badań stężenia związków zostały wybrane w oparciu o wyznaczoną wartość IC_{50} . Stężenie roztworu ALA wynosiło 1000 μM . 24 godziny po naświetleniu frakcja komórek przeżywających została oznaczona przy pomocy testu MTS. Następnie korzystając z programu CompuSyn wyznaczono współczynnik CI oraz DRI dla dawek powodujących 90 % zahamowanie proliferacji komórek. Wykresy (24 – 27) przedstawiają zależności frakcji komórek, w których proliferacja została zahamowana w odpowiedzi na terapię (f_a), od stosowanej dawki chelatora (czerwony kwadrat), dawki promieniowania wzbudzającego PpIX (niebieskie koło – PDT) lub kombinacji tych dwóch czynników (zielony trójkąt – C_PDT). Zgodnie z założeniami zagadnienia synergii dawka jest wartością bezwymiarową.

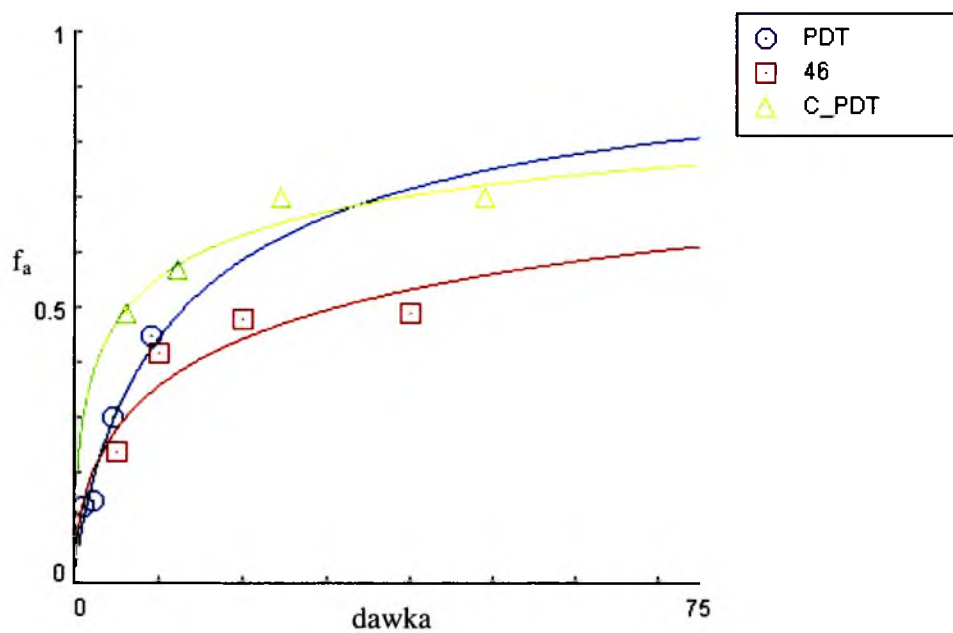


Wykres 24

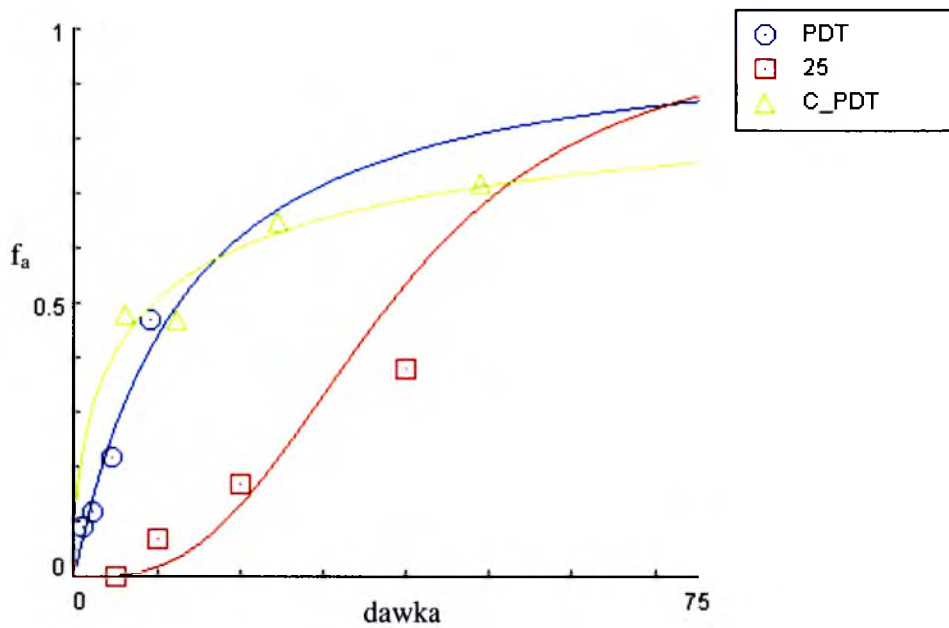
Krzywa dawka – efekt dla pochodnej 17



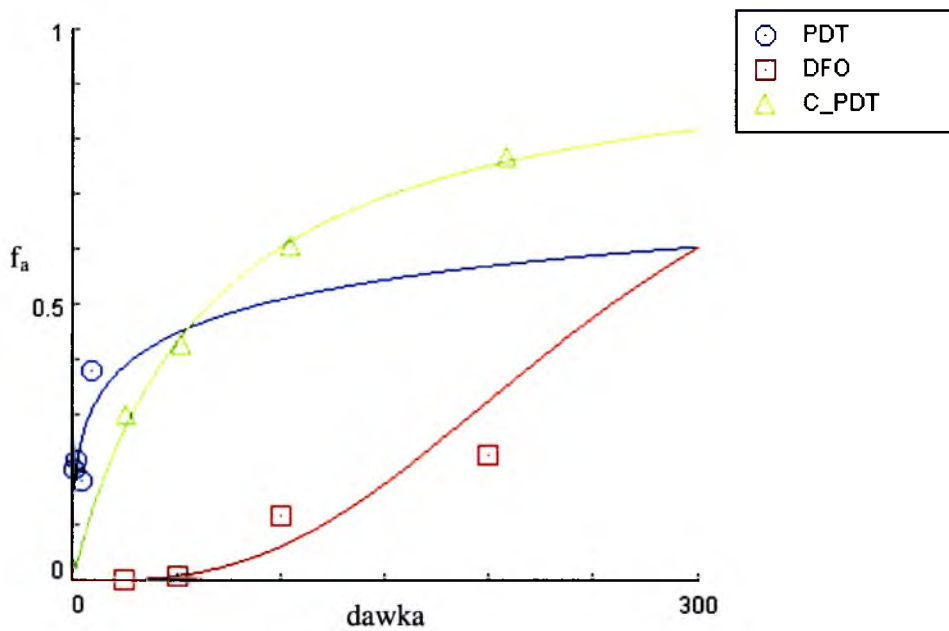
Wykres 25
 Krzywa dawka – efekt dla pochodnej 60



Wykres 26
 Krzywa dawka – efekt dla pochodnej 46

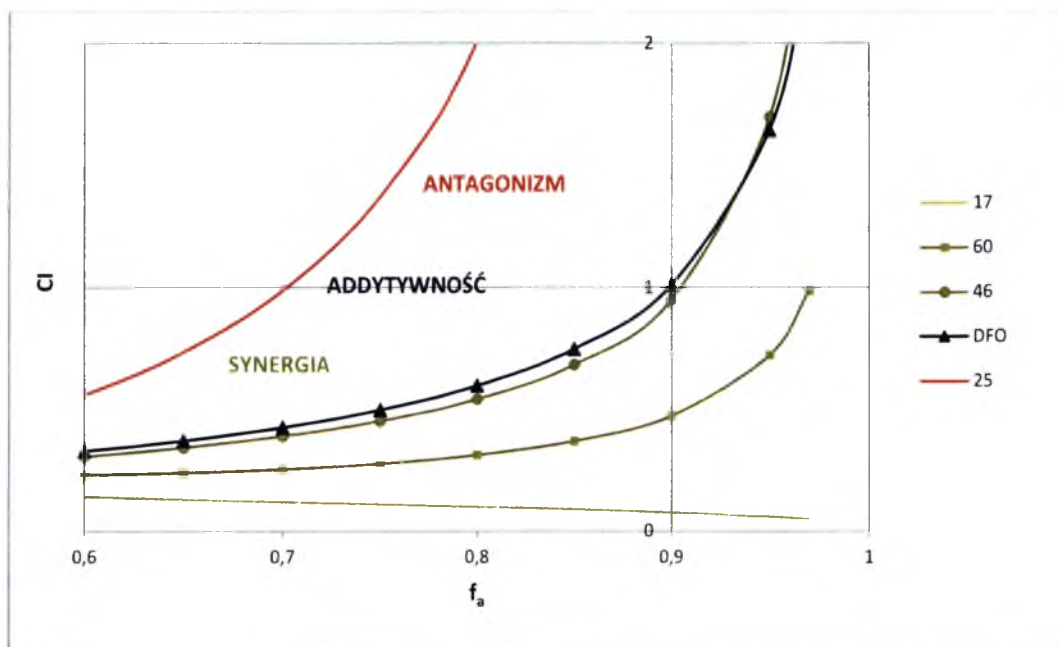


Wykres 27
 Krzywa dawka – efekt dla pochodnej 25



Wykres 28
 Krzywa dawka – efekt dla DFO

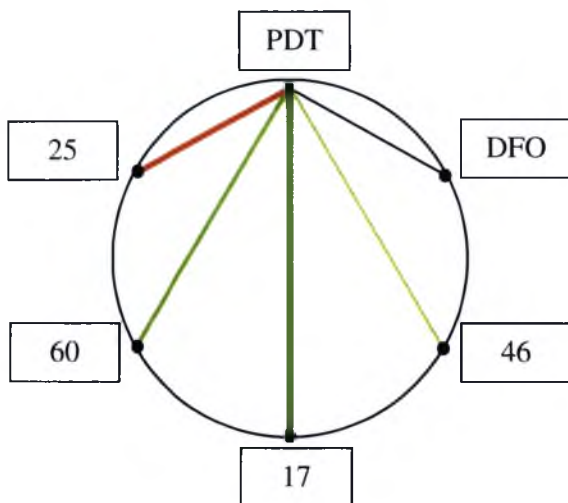
Na podstawie powyższych wykresów obliczono wartość współczynnika kombinacji (CI). Na wykresie 29 przedstawiono zależność CI dla poszczególnych pochodnych od frakcji komórek, których proliferacja została zahamowana w odpowiedzi na terapię (f_a). Wartości $CI < 1$ wskazują na synergję, $CI = 1$ oznacza addytywność, natomiast $CI > 1$, antagonizm.



Wykres 29

Zależność CI od f_a

Powyższe wyniki wskazują, że połączenie działania naświetlonej PpIX i pochodnych **17** i **60** przyniosło efekt synergii, która była najsilniejsza w przypadku pierwszej pochodnej. Analogi uznane za nieaktywne wykazywały słabą synergję (pochodna **46**) bądź antagonizm (pochodna **25**). Związek referencyjny DFO wykazywał efekt działania addytywnego. Wyniki są przedstawione również w postaci poligonogramu, który schematycznie przedstawia rodzaj oraz siłę danego oddziaływania (Schemat 10). Zielona kreska oznacza synergję, czerwona antagonizm, czarna addytywność. Grubość kreski odpowiada za siłę oddziaływania. Rezultat połączenia działania PpIX i pochodnej **17** przyniósł niezwykle interesujący wynik. Badana pochodna tiosemikarbazonu wykazuje bowiem, oprócz wysokiej aktywności antynowotworowej, wysoką selektywność w stosunku do zdrowych komórek.



Schemat 10

Poligonogram

Korzystając z programu CompuSyn wyliczono również ilu krotnie można zmniejszyć dawkę chelatora (współczynnik DRI) w terapii kombinowanej dla uzyskania takiego samego efektu 90 % skuteczności, w porównaniu do stosowania samego chelatora (Tabela 15).

Pochodna	CI, $f_a = 0,9$	DRI, dla chelatora $f_a = 0,9$	Rodzaj oddziaływania
17	0,08	61507,5	Synergia
60	0,47	2,16	Synergia
46	0,95	3,84	Synergia
25	6,06	0,20	Antagonizm
DFO	1,01	0,99	Addytywność

Tabela 15

Współczynnik kombinacji (CI) oraz redukcji dawki (DRI) dla pochodnych 17, 60, 46, 25 oraz DFO

4. Podsumowanie

Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na opisanie tiosemikarbazonowych chelatorów o najwyższej kiedykolwiek opisanej w literaturze aktywności przeciwnowotworowej. Jednym z najbardziej interesujących aplikacji takich związków może być ich synergiczne zastosowanie w kombinowanej terapii ALA-PDT-chelator. W ramach przygotowania niniejszej pracy zaplanowano oraz przeprowadzono próby wieloetapowej syntezy 8-hydroksy-chinaldino-7-karbaldehydu. Redukcja otrzymanego kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyłowego przy użyciu tri-tertbutoksyglinowodorku litu nie przyniosła oczekiwanych rezultatów, ze względu na wąski zakres energii aktywacji tego procesu. Wysoka temperatura powodowała rozkład lub całkowitą dekarboksylację produktu, natomiast zbyt niska nie prowadziła do reakcji substratu. Przeprowadzono ponadto syntezy 4 znanych pochodnych tiosemikarbazonu w reakcjach kondensacji ketonu di-2-pirydyłowego lub 2-benzoilopirydiny z odpowiednim tiosemikarbazylem.

W następnym etapie przeprowadzono pomiary elektronowych widm absorpcji i emisji 12 pochodnych tiosemikarbazonu. Widma absorpcji zostały zmierzone dla kilku stężeń w celu sprawdzenia liniowości prawa Lamberta-Beera. Na ich podstawie wyznaczono molowe współczynniki absorpcji. Ponadto zmierzono widma fluorescencji dla stężeń odpowiadających maksymalnej emisji.

W ramach badania aktywności pochodnych tiosemikarbazonu przeprowadzono test cytotoksyczności (test MST) dla 62 pochodnych zsyntezowanych przez mgr. inż. Macieja Serda (doktoranta Zakładu Chemii Organicznej UŚ) oraz 10 pochodnych otrzymanych przez zespół prof. Desa Richardsona (Uniwersytet w Sydney). Łącznie zbadano 72 związki w większości na dwóch liniach komórkowych HCT116 typu dzikiego oraz z nokautem genu kodującego białko p53. Dla większości związków, które wykazywały znaczącą aktywność przeciwnowotworową test MTS został wykonany na komórkach prawidłowych typu fibroblastów w celu określenia ich selektywnego działania. Wszystkie otrzymane wyniki zostały poddane analizie zależności dawka – efekt przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism.

W celu potwierdzenia toksyczności najbardziej aktywnych pochodnych przeprowadzono test klonogenności pozwalający określić tzw. toksyczność przewlekłą badanego związku. Test został przeprowadzony dla wybranych 5 pochodnych o

wysokiej aktywności antynowotworowej. Wyniki potwierdziły wysoką skuteczność badanych związków w zwalczaniu komórek nowotworowych, utrzymującą się pomimo usunięcia czynnika powodującego uszkodzenia.

Dla najbardziej aktywnej pochodnej **60** zostały przeprowadzone badania oceniające morfologię komórek po inkubacji ze związkiem oraz przeprowadzono test z barwieniem wskazujący prawdopodobny rodzaj śmierci komórkowej. Opisywane badania zostały również przeprowadzone dla pochodnej **46** celem porównania związku aktywnego z nieaktywnym.

Ponadto przeprowadzono test określający prawdopodobny mechanizm działania najbardziej aktywnego związku **60**. W tym celu wykonano test pozwalający na detekcję reaktywnych form tlenu. Otrzymane wyniki potwierdzają mechanizm działania zgodny z tym, określonym przez zespół prof. Richardsona dla analogów ketonu di-2-pirydylowego, czyli potwierdzający generowanie ROS.

W ramach badań nad wpływem chelatorów na zwiększenie efektu terapii PDT przeprowadzono szereg testów uwzględniających kinetykę powstawania protoporfiryny IX po egzogennym dodaniu kwasu 5-aminolewulinowego w komórkach linii HCT116 +/- bez dodania chelatora oraz z jego dodaniem. Wykonano również testy określające rodzaj oddziaływania występującego po jednoczesnym podaniu pochodnej tiosemikarbazonu, ALA oraz naświetleniu. Testy dotyczące kinetyki powstawania PpIX bez dodania chelatora zostały przeprowadzone w oparciu o wcześniej ustalony protokół postępowania uwzględniający długie czasy inkubacji oraz brak surowicy w medium hodowlanym. W ramach potwierdzenia braku toksyczności powstałej endogennie PpIX (bez naświetlania) oraz jej lokalizacji w komórce przeprowadzono testy określające morfologię komórek po 24-godzinnej inkubacji z ALA oraz test z barwieniem. Ponadto przeprowadzono testy kinetyki powstawania PpIX wewnątrz komórek traktowanych ALA oraz pochodną tiosemikarbazonu. Jako związku referencyjnego użyto DFO. Obserwacje nie potwierdzają wyników licznych doniesień dotyczących wpływu chelatorów żelaza na hamowanie syntezy hemu poprzez kompleksowanie jonów żelaza. W przypadku badanych związków oraz DFO ten mechanizm na linii HCT116 +/- prawdopodobnie nie zachodzi. Przeprowadzono również badania dotyczące połączenia działania tiosemikarbazonów oraz naświetlanej PpIX. Testy zostały przeprowadzone dla 4 związków. Pochodne **17** i **60** (związki aktywne) oddziaływały w sposób synergiczny, natomiast pochodne uznane za nieaktywne (**25** i **46**) wykazywały słabą synergię bądź antagonizm. Dodatkowo testy zostały przeprowadzone dla DFO, wykazującej efekt

działania addytywnego. W przypadku pochodnej **17** wynik jest niezwykle interesujący, ponieważ badana pochodna wykazuje, oprócz wysokiej aktywności przeciwnowotworowej (rzędu nanomoli), wysoką selektywność. Zwiększenie efektywności terapii PDT przy tak niskim stężeniu oraz braku toksyczności w stosunku do zdrowych komórek predestynują pochodną **17** do dalszych badań.

5. Część eksperymentalna

5.1. Sprzęt i czynności wstępne

5.1.1. Pomiary instrumentalne

Widma ^1H NMR rejestrowano na spektrometrze Bruker Biospin model Avance III 400 MHz FT-NMR, przy częstotliwości 400 MHz.

Widma absorpcyjne i emisyjne zostały zarejestrowane na spektrofotometrach U-2900 i F-7000 (Hitachi) oraz czytniku płytek wielodołkowych Synergy4 (Bio-Tek).

Do oceny morfologii komórek niezbędnej do prowadzenia hodowli korzystano z mikroskopu odwróconego Olympus CKX31.

Liczba komórek niezbędna po posiewów była ustalana za pomocą licznika komórek TC10 (Bio-Rad).

Obrazy komórek wybarwionych uzyskano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX81 zaopatrzonego w kamerę Hamamatsu C10600 oraz komorę inkubacyjną.

Ponadto korzystano ze standardowego wyposażenia pracowni chemicznych oraz biologicznych niezbędnego do prowadzenia syntez oraz utrzymania hodowli komórkowej.

5.1.2. Przygotowanie rozpuszczalników do syntez

Bezwodny dimetyloformamid (DMF) przygotowano przez umieszczenie go nad sitami molekularnymi. Sita zostały wcześniej wygrzane palnikiem gazowym w atmosferze zredukowanego ciśnienia.

Bezwodny tetrahydrofuran (THF) przygotowano przez kilkudniowe ogrzewanie z mieszaniną benzofenonu i potasu w atmosferze argonu.

5.1.3. Odczynniki używane do syntez

POCH S.A.: aceton, chlorek wapnia bezwodny, chloroform, dichlorometan, DMF, etanol, eter dietylowy, n-heptan, jod, kwas octowy 99,5 %, kwas solny 35-38 %,

metanol, octan etylu, octan sodu bezwodny, propan-2-ol, wodorotlenek potasu, wodorotlenek sodu, THF, toluen.

Sigma – Aldrich: 2-benzoilopirydyna, deuterowany chloroform, 4,4-dimetylo-3-tiosemikarbazyd, deuterowany dimetylosulfotlenek (DMSO), 4-etylo-3-tiosemikarbazyd, 8-hydroksy-2-metylocholinina, keton di-2-pirydylowy, 4-metylo-3-tiosemikarbazyd, tri-tertbutoksyglinowodorek litu.

5.1.4. Odczynniki używane do badań *in vitro*

Buforowany roztwór soli fizjologicznej - PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (Immuniq), DMSO, kwas 5-animolewulinowy (Sigma), etanol (POCH), fiolet krystaliczny (POCH), gentamycyna (Roth), jodek propidyny (Clontech), nadtlenek wodoru (POCH), odczynnik do barwienia jąder DAPI (Molecular Probes), odczynnik do detekcji reaktywnych form tlenu H_2DCFDA (Invitrogen), odczynnik do barwienia mitochondrium MitoTracker[®] Orange CMTMRos (Molecular Probes), odczynnik do testu MTS - CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation (Symbios), pożywka hodowlana Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 (DMEM) z czerwienią fenolową, bez czerwieni fenolowej (Sigma-Aldrich), protoporfiryna IX (Sigma), surowica płodów wołowych - FBS (*ang.* foetal bovine serum) (Gibco, Invitrogen), trypsyna r-r EDTA (Immuniq).

5.1.5. Linie komórkowe wykorzystane w eksperymentach

Doświadczenia zostały przeprowadzone na linii HCT116 typu dzikiego oraz linii z unieczynnieniem genu kodującego białko p53 wyizolowane z guza okrężnicy. Ponadto wykorzystano komórki prawidłowe NHDF typu fibroblastów wyizolowane ze skóry. Wszystkie linie zostały pozyskane z banku ATCC.

5.1.6. Hodowla komórek

Komórki hodowano w pożywce DMEM F12, zawierającej 12 % surowicy płodów wołowych w przypadku linii HCT116, oraz 15 % surowicy płodów wołowych, nieinaktywowanej w przypadku linii NHDF. Pożywka zawierała również antybiotyk w

standardowych ilościach 100 μL gentamycyny/200 mL pożywki. Hodowle komórkowe przechowywane były w inkubatorach o stałej zawartości CO_2 (5 %) i wilgotności (95 %). Temperatura wnętrza ciepłarki wynosiła 37 °C. W celu utrzymania hodowli komórki pasażowano przy użyciu 0,25 % roztworu trypsyny. Doświadczenia na komórkach *in vitro* prowadzone były w warunkach sterylnych.

5.2. Przeprowadzone syntezy

Ta część badań została przeprowadzona w Zakładzie Chemii Organicznej Instytutu Chemii UŚ.

5.2.1. Kwas 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyłowy (1)

Mieszaninę 10 g (62,8 mmola) 8-hydroksy-2-metylocholinoliny rozpuszczonej w 45 mL toluenu i 3,75 g (62,8 mmola) wodorotlenku potasu umieszczono w kolbie zaopatrzonej w aparat Dean-Starka i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 24 godziny. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej dodano 33 mL DMF, a aparat Dean-Starka zastąpiono kolumną destylacyjną połączoną z chłodnicą. Ogrzewano do oddestylowania większości toluenu, a następnie po osiągnięciu temperatury 140 °C za pomocą kapilary przepuszczano CO_2 . Oddestylowanie toluenu kontynuowano aż temperatura mieszaniny osiągnęła 150 - 160 °C. W takiej temperaturze przepuszczano CO_2 przez 2 godziny. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej i odłączeniu strumienia CO_2 , dodano 82 mL wody i zobojętniono stężonym kwasem solnym do pH około 7. Następnie ekstrahowano octanem etylu, a otrzymaną fazę wodną zakwaszono do pH = 4,2. Powstały żółty osad odsączono i dwukrotnie krystalizowano z propan-2-olu i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 100 °C. Wydajność reakcji 20 % [249].

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ [ppm]: 2,81 (s, 3H), 7,21 (d, 1H, $J = 8,58$ Hz), 7,72 (d, 1H, $J = 8,45$ Hz), 7,87 (d, 1H, $J = 8,56$ Hz), 8,54 (d, 1H, $J = 8,48$ Hz).

5.2.2. Chlorek kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyłowego (2)

Metoda I - Mieszaninę 0,6 g (3 mmola) kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyłowego rozpuszczonego w 20 mL bezwodnego DMF i 0,26 mL (3,5 mmola) chlorku tionylu (SOCl_2) ogrzewano przez 4 godziny w kolbie zaopatrzonej w chłodnicę

zwrotną w temperaturze 60 - 70 °C. Całość aparatury zabezpieczono przed dostępem wilgoci. Następnie odparowano nadmiar SOCl₂ oraz DMF otrzymując cielisty, krystaliczny osad, który bez oczyszczania wykorzystano w następnym etapie reakcji.

Metoda II - 0,25 g (1,23 mmola) kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyowego rozpuszczono w 25 mL bezwodnego dichlorometanu. Całość umieszczono w łaźni z lodem i stopniowo wkraplano 1 mL (11,65 mmola) chlorku oksalilu (COCl)₂, po czym kontynuowano mieszanie na łaźni przez 1 godzinę. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono do ogrzania do temperatury pokojowej. Po około 2 godzinach osad zmienił barwę na cielistą i został użyty bez oczyszczania do następnego etapu reakcji.

5.2.3. Próby otrzymania 8-hydroksy-chinaldino-7-karbaldehydu (3)

0,29 g (1,3 mmola) chlorku kwasu 8-hydroksy-chinaldino-7-karboksyowego rozpuszczono w 25 mL bezwodnego THF po czym dodano 0,31 g (1,3 mmola) tri-tertbutoksyglinowodoru litu rozpuszczonego w 5 mL bezwodnego THF. Kolbę umieszczono w łaźni z mieszaniną etanolu i ciekłego azotu (-78 °C) i kontynuowano mieszanie przez 3 godziny. Po tym czasie mieszaninę wylano do rozkruszonego lodu i odsączono.

5.2.4. 2-benzoilopirydylo-4-metylo-3-tiosemikarbazon (48 - Bp4mT)

Mieszaninę 0,157 g (0,86 mmola) 2-benzoilopirydyny rozpuszczonej w 1 mL alkoholu etylowego, 0,090 g (0,86 mmola) 4-metylo-3-tiosemikarbazydu rozpuszczonego w 2 mL wody i 2 krople stężonego kwasu octowego ogrzewano przez 3 godziny w kolbie zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną. Po wystudzeniu wypadł żółty osad 2-benzopirydylo-4-metylo-3-tiosemikarbazonu, który dwukrotnie krystalizowano z etanolu i eteru dietylowego. Wydajność reakcji 85 %.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ [ppm]: 3,05 (d, 3H, J = 4,63 Hz), 7,36 (dt, 1H), 7,46 - 7,48 (m, 3H), 7,60 - 7,66 (m, 3H), 8,00 - 8,05 (td, 1H), 8,87 - 8,89 (m, 1H).

5.2.5. 2-benzoilopirydylo-4,4-dimetylo-3-tiosemikarbazon (49 - Bp44mT)

Mieszaninę 0,915 g (5 mmola) 2-benzoilopirydyny rozpuszczonej w 7,5 mL alkoholu etylowego, 0,595 g (5 mmola) 4,4-dimetylo-3-tiosemikarbazydu rozpuszczonego w 7,5 mL wody i 3 krople stężonego kwasu octowego ogrzewano przez 3 godziny w kolbie zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną. Po wystudzeniu wypadł żółty osad 2-benzopirydylo-4,4-dimetylo-3-tiosemikarbazonu, który dwukrotnie krystalizowano z etanolu i eteru dietylowego. Wydajność reakcji 80 %.

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ [ppm]: 3,33 (s, 3H), 3,38 (s, 3H), 7,36 (d, 1H, $J = 8,07$ Hz), 7,48 - 7,55 (dd, 4H), 7,59 - 7,62 (dd, 2H), 8,00-8,05 (td, 1H), 8,89 (d, 1H, $J = 4,22$ Hz).

5.2.6. 2-benzoilopirydylo-4-etylo-3-tiosemikarbazon (50 - Bp4eT)

Mieszaninę 0,40 g (2,16 mmola) 2-benzoilopirydyny rozpuszczonej w 1,5 mL alkoholu etylowego, 0,26 g (2,16 mmola) 4-etylo-3-tiosemikarbazydu rozpuszczonego w 3,5 mL wody i 2 krople stężonego kwasu octowego ogrzewano przez 3 godziny w kolbie zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną. Po wystudzeniu wypadł żółty osad 2-benzopirydylo-4-etylo-3-tiosemikarbazonu, który dwukrotnie krystalizowano z etanolu i eteru dietylowego. Wydajność reakcji 83 %.

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ [ppm]: 1,14 - 1,18 (t, 3H), 3,59 - 3,66 (m, 2H), 7,34 - 7,37 (dt, 1H), 7,44 - 7,48 (m, 3H), 7,59 - 7,65 (m, 3H), 8,00 - 8,04 (td, 1H), 8,75 - 8,78 (t, 1H).

5.2.7. Di-2-pirydylo-4-metylo-3-tiosemikarbazon (53 - Dp4mT)

Mieszaninę 0,645 g (3,5 mmola) ketonu di-2-pirydylowego rozpuszczonego w 5 mL alkoholu etylowego, 0,366 g (3,5 mmola) 4-metylo-3-tiosemikarbazydu rozpuszczonego w 5 mL wody i 3 krople stężonego kwasu octowego ogrzewano przez 3 godziny w kolbie zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną. Po wystudzeniu wypadł żółty osad 4-metylo-3-tiosemikarbazonu, który dwukrotnie krystalizowano z etanolu i eteru dietylowego. Wydajność reakcji 65 %.

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ [ppm]: 3,07 (d, 3H, $J = 4,60$ Hz), 7,46 - 7,60 (m, 3H), 7,94 - 8,02 (m, 2H), 8,24 (d, 1H, $J = 7,96$ Hz), 8,57 - 8,59 (dq, 1H), 8,83 - 8,84 (dq, 1H).

5.3. Pomiary elektronowych widm absorpcji i emisji

Ta część badań oraz kolejne zostały wykonane w Zakładzie Fizyki Ciała Stałego Instytutu Fizyki UŚ.

5.3.1. Widma absorpcyjne

Elektronowe widma absorpcyjne zarejestrowano przy pomocy spektrofotometru U-2900 wyposażonego w lampę deuterową oraz wolframową o zakresie spektralnym 190 – 1100 nm i monochromator z siatką dyfrakcyjną o wysokiej rozdzielczości. Pomiary prowadzono dla kilku różnych stężeń: $0,125 \cdot 10^{-4}$, $0,25 \cdot 10^{-4}$, $0,5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} M w temperaturze pokojowej. Szybkość skanowania wynosiła 1200 nm/min, krok 2 nm, szerokość szczeliny 1,50 nm, zakres spektralny 200 – 750 nm. Roztwory zostały przygotowane w chloroformie bezpośrednio przed eksperymentem. Interpretacja otrzymanych wyników została przygotowana przy użyciu oprogramowania UV-Solution.

5.3.2. Widma emisyjne

Elektronowe widma emisyjne zarejestrowano przy pomocy spektrofotometru F-7000 wyposażonego w lampę ksenonową o mocy 150 W i monochromator z siatką dyfrakcyjną o wysokiej rozdzielczości. Pomiary prowadzono dla różnych stężeń związku w chloroformie (w zależności od rodzaju pochodnej) w temperaturze pokojowej. Stężenia zostały wybrane ze względu na otrzymanie maksymalnego natężenia fluorescencji. Szybkość skanowania wynosiła 1200 nm/min, krok 2 nm, szerokość szczeliny ekscytacji 5 nm, szerokość szczeliny emisji 5 nm, zakres spektralny 200 – 750 nm. Interpretacja otrzymanych wyników została przygotowana przy użyciu oprogramowania FL-Solution.

5.4. Testy cytotoksyczności

5.4.1. Test MTS

Ustalenie toksyczności badanych związków zostało przeprowadzone w oparciu o test MTS. W tym celu komórki zostały wysiane na 96-dołkowe płytki w ilości 3500 komórek/dołek. Po 24 godzinnej inkubacji wzrastające stężenia badanych związków zostały podane na płytki (3 – 10 dołków na stężenie), a komórki poddano 96 - godzinnej inkubacji. Roztwory wyjściowe zostały przygotowane w DMSO, a następnie rozcieńczone medium hodowlanym, tak aby stężenie DMSO nie przekroczyło 0,2 %. Komórki w medium hodowlanym zostały przyjęte jako kontrole. Po 96 godzinach został przeprowadzony test MTS, polegający na dodaniu 20 μ L barwnika (CellTiter 96® AQueous One Solution) do dołków zawierających 100 μ L medium bez czerwieni i godzinnej inkubacji. Po tym czasie zmierzono absorbancję powstałego formazanu przy długości fali 490 nm, za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4. Wyniki, jako średnia z minimum 3 powtórzeń zostały przedstawione w formie wartości IC_{50} , która została wyliczona w programie GraphPad Prism 5.

5.4.2. Test klonogenności

W celu ustalenia tzw. toksyczności przewlekłej badanych związków komórki linii HCT116 +/- zostały wysiane na szalki o średnicy 3 cm w ilości 85 000 komórek/szalkę. Po 24 godzinach wzrastające stężenia badanych związków zostały podane na szalki. Roztwory zostały przygotowane w sposób analogiczny jak w teście MTS. Po 96-godzinnej inkubacji komórki zostały zebrane, zliczone i wysiane na szalki o średnicy 6 cm w odpowiednich, wzrastających ilościach. Po dziewięciodniowej inkubacji powstałe kolonie zostały utrwalone 96 % roztworem etanolu, wybarwione 0,4 % roztworem fioletu krystalicznego w soli fizjologicznej, a następnie zliczone. Wyniki, jako średnia z minimum 3 powtórzeń zostały przedstawione w formie wartości SF.

5.5. Morfologia komórek – mechanizm śmierci

Komórki linii HCT116 +/+ zostały wysiane na płytce 8-dołkowe (Lab-Tek) przeznaczone do hodowli preparatów mikroskopowych w ilości 10 000 komórek/dołek. Po 48 godzinnej inkubacji dodano wzrastające stężenia badanych związków a komórki poddano 96 - godzinnej inkubacji. Roztwory zostały przygotowane w sposób analogiczny jak w teście MTS. Komórki w medium hodowlanym zostały przyjęte jako kontrole. Po 96 godzinach dołki przeznaczone do barwienia zostały przepłukane PBS, a następnie dodano do nich roztwór jodku propidyny (1 $\mu\text{g/mL}$) i inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie komórki przepłukano PBS i obserwowano w świetle przechodzących oraz po wzbudzeniu filtrem przepuszczającym promieniowanie z zakresu 600 – 640 nm.

5.6. Mechanizm działania – generowanie reaktywnych form tlenu

Komórki linii HCT116 +/+ zostały wysiane na płytce 8-dołkowe (Lab-Tek) przeznaczone do hodowli preparatów mikroskopowych w ilości 11 000 komórek/dołek. Po 48 godzinnej inkubacji dodano 10^{-2} μM roztwór pochodnej **60** a komórki poddano 24 - godzinnej inkubacji. Roztwór został przygotowany w sposób analogiczny jak w teście MTS. Komórki w medium hodowlanym zostały przyjęte jako kontrole. Dodatkowo jako pozytywną kontrolę przyjęto komórki traktowane 100 μM roztworem H_2O_2 (inkubowane 10 minut). Po 24 godzinach dołki przeznaczone do barwienia zostały przepłukane PBS, a następnie dodano do nich roztwór H_2DCFDA (5 μM) i inkubowano 20 minut w temperaturze 37 °C. Po tym czasie komórki przepłukano PBS i obserwowano w świetle przechodzących oraz po wzbudzeniu filtrem przepuszczającym promieniowanie z zakresu 517 – 527 nm.

5.7. Badania nad wpływem chelatorów na zwiększenie efektu terapii PDT

5.7.1. Kinetyka powstawania PpIX

Komórki linii HCT116 +/- zostały wysiane na płytce 96-dołkowe (Corning) przeznaczone do pomiarów fluorescencji oraz hodowli komórkowej w ilości 17 000 komórek/dołek. Po 48 godzinnej inkubacji komórki przepłukano PBS, a następnie dodano 1000 μM roztwór ALA w medium DMEM bez surowicy i czerwieni fenolowej. Komórki kontrolne zawierały czyste medium hodowlane. Pomiarów prowadzono w zakresie czasowym od 3 do 74 godzin, odczytując fluorescencję PpIX co 3 godziny za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4. Długości fali wzbudzenia wynosiła 407 nm, maksimum fluorescencji PpIX występowało przy 638 nm. Roztwory zostały przygotowane bezpośrednio przed eksperymentem, a pomiary prowadzono w warunkach zredukowanego natężenia światła. Wyniki są średnią z 4 powtórzeń.

5.7.2. Morfologia komórek po inkubacji z ALA oraz lokalizacja powstałej PpIX

Komórki linii HCT116 +/- zostały wysiane na płytce 8-dołkowe (Lab-Tek) przeznaczone do hodowli preparatów mikroskopowych w ilości 11 000 komórek/dołek. Po 48 godzinnej inkubacji dodano 1000 μM roztwór ALA w medium DMEM bez surowicy i czerwieni fenolowej. Po 24 - godzinnej inkubacji wykonano barwienie jąder oraz mitochondrium. Jądra zostały wybarwione barwnikiem DAPI (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i inkubowane 30 min w temperaturze 37 °C. Mitochondria barwiono barwnikiem MitoTracker® Orange CMTMRos (0,1 μM), a inkubacja wynosiła 30 min w temperaturze 37 °C. Po odpowiednim czasie inkubacji komórki zostały przepłukane PBS, a następnie obserwowane w świetle przechodzących oraz po wzbudzeniu odpowiednimi filtrami (PpIX max. emisji 638nm, MitoTracker max. emisji 576 nm, DAPI max. emisji 461 nm)

5.7.3. Wpływ chelatorów na powstawanie PpIX

Komórki linii HCT116 +/- zostały wysiane na płytki 96-dołkowe (Corning) przeznaczone do pomiarów fluorescencji oraz hodowli komórkowej w ilości 17 000 komórek/dołek. Po 48 godzinnej inkubacji komórki przepłukano PBS, a następnie dodano 1000 μM roztwór ALA z odpowiednim stężeniem chelatora w medium DMEM bez surowicy i czerwieni fenolowej. Komórki kontrolne zawierały 1000 μM roztwór ALA. Płytki zawierały również komórki traktowane samym medium hodowlanym. Po odpowiednim czasie inkubacji dokonywano kolejnych pomiarów fluorescencji PpIX przy długości fali wzbudzenia 407 nm za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4. Roztwory zostały przygotowane bezpośrednio przed eksperymentem w medium DMEM bez surowicy, czerwieni fenolowej oraz w warunkach zredukowanego natężenia światła. Wyniki są średnią z 5 powtórzeń.

5.7.4. Synergiczne działanie tiosemikarbazonów i ALA

Komórki linii HCT116 +/- posiano na szalki o średnicy 3cm (Nunc) w ilości 150 000/szalkę. Po 24 - godzinnej inkubacji dodano roztwory chelatora o różnym stężeniu w medium bez czerwieni fenolowej oraz surowicy i inkubowano kolejne 24h. Po tym czasie medium zostało usunięte, komórki przepłukano PBS, a następnie dodano 1000 μM roztwór ALA z odpowiednim stężeniem chelatora w medium DMEM bez surowicy i czerwieni fenolowej. Komórki kontrolne zawierały 1000 μM roztwór ALA. Płytki zawierały również komórki traktowane samym medium hodowlanym. Po 24 h inkubacji medium zostało zastąpione PBS, a komórki naświetlono światłem czerwonym w dawce 1,14 (0,5 min, odległość 2 cm), 2,28 (1 min, odległość 2cm), 4,56 (2 min, odległość 2cm) oraz 9,12 (4 min, odległość 2cm) J/cm^2 . Następnie PBS zastąpiono standardowym medium hodowlanym z surowicą. Po 24h inkubacji frakcja przeżywiająca komórki została określona przy pomocy testu MTS opisanego powyżej. Roztwory zostały przygotowane bezpośrednio przed eksperymentem, a pomiary prowadzono w warunkach zredukowanego natężenia światła. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń. Rodzaj oddziaływania (synergia, antagonizm) zostały określone przy użyciu oprogramowania CompuSyn.

6. Bibliografia

- [1] M. MacCormack, "Photodynamic Therapy," *Adv. Dermatol.*, 22, 2006, 219–258, 2006.
- [2] R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X.H. Hu, C. J. Childs, C. H. Sibata, "Photosensitizers in clinical PDT," *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 1, 1, 27–42, 2004.
- [3] L. B. Josefsen, R. W. Boyle, "Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer?," *Br. J. Pharmacol.*, 154, 1, 1–3, 2008.
- [4] A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, A. T. Byrne, "Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy," *Photochem. Photobiol.*, 85, 5, 1053–74, 2009.
- [5] Z. Huang, "A review of progress in clinical photodynamic therapy," *Technol. Cancer Res. Treat.*, 4, 3, 283–293, 2005.
- [6] M. Detty, S. Gibson, S. Wagner, "Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy," *J. Med. Chem.*, 47, 16, 3897–915, 2004.
- [7] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, "Photodynamic therapy," *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 12, 889–905, 1998.
- [8] E. G. Friberg, B. Čunderliková, E. O. Pettersen, J. Moan, "pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer," *Cancer Lett.*, 195, 1, 73–80, 2003.
- [9] K. Woodburn, D. Kessel, "Effect of density-gradients on the binding of photosensitizing agents to plasma proteins," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27, 5, 499–506, 1995.
- [10] R. K. Chowdhary, I. Sharif, N. Chansarkar, D. Dolphin, L. Ratkay, S. Delaney, H. Meadows, "Correlation of photosensitizer delivery to lipoproteins and efficacy in tumor and arthritis mouse models; comparison of lipid-based and Pluronic P123 formulations," *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 6, 2, 198–204, 2003.
- [11] G. Jori, "Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 36, 2, 87–93, 1996.
- [12] S. Paszyc, *Podstawy fotochemii*. PWN, 1983.
- [13] M. Ochsner, "Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 39, 1, 1–18, 1997.

- [14] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, "Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects," *Lasers Med. Sci.*, 24, 2, 259–68, 2009.
- [15] D. Nowis, M. Makowski, T. Stokłosa, M. Legat, T. Issat, J. Gołab, "Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy," *Acta Biochim. Pol.*, 52, 2, 339–52, 2005.
- [16] A. P. Castano, T. N. Demidova, M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization," *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 1, 4, 279–293, 2004.
- [17] R. Musiol, M. Serda, J. Polanski, "Prodrugs in photodynamic anticancer therapy," *Curr. Pharm. Des.*, 17, 32, 3548–59, 2011.
- [18] S. Langer, C. Abels, A. Botzlar, S. Pahernik, K. Rick, R. M. Szeimies, A. E. Goetz, "Active and higher intracellular uptake of 5-aminolevulinic acid in tumors may be inhibited by glycine," *J. Invest. Dermatol.*, 112, 5, 723–728, 1999.
- [19] Z. Malik, H. Lugaci, "Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins," *Br. J. Cancer*, 56, 5, 589–95, 1987.
- [20] H. Fukuda, S. Paredes, A. M. Batlle, "Tumour-localizing properties of porphyrins. In vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid," *Comp. Biochem. Physiol. B*, 102, 2, 433–436, 1992.
- [21] W. Stummer, S. Stocker, S. Wagner, H. Stepp, C. Fritsch, C. Goetz, H. J. Reulen, "Intraoperative detection of malignant glioma by 5-ALA induced protoporphyrin IX fluorescence," *Neurosurgery*, 42, 3, 518–25, 1998.
- [22] A. Pye, A. Curnow, "Direct comparison of delta-aminolevulinic acid and methylaminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX accumulations potentiated by desferrioxamine or the novel hydroxypyridinone iron chelator CP94 in cultured human cells," *Photochem. Photobiol.*, 83, 3, 766–73, 2007.
- [23] A. Gorchein, "Determination of delta-aminolaevulinic acid in biological fluids by gas-liquid chromatography with electron-capture detection," *Biochem. J.*, 219, 883–9, 1984.
- [24] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, H.J. Reulen, "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial," *Lancet Oncol.*, 7, 5, 392–401, 2006.
- [25] J. T. Dalton, C. R. Yates, D. Yin, A. Straughn, S. L. Marcus, A. L. Golub, M. C. Meyer, "Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301, 2, 507–12, 2002.

- [26] J. Berlanda, T. Kiesslich, V. Engelhardt, B. Krammer, K. Plaetzer, "Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 100, 3, 173–80, 2010.
- [27] A. Juzeniene, M. Kaliszewski, A. Bugaj, J. Moan, "Clearance of protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid from WiDr human colon carcinoma cells," *Proc. SPIE*, 7380, 73802Q–73802Q–9, 2009.
- [28] A. Pye, S. Campbell, A. Curnow, "Enhancement of methyl-aminolevulinic photodynamic therapy by iron chelation with CP94: an in vitro investigation and clinical dose-escalating safety study for the treatment of nodular basal cell carcinoma," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 134, 8, 841–9, 2008.
- [29] M. Kaliszewski, M. Kwasny, A. Juzeniene, P. Juzenas, A. Graczyk, L.-W. Ma, V. Iani, P. Mikolajewska, J. Moan, "Biological activity of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester after storage under different conditions," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 87, 2, 67–72, 2007.
- [30] F. Wilkinson, J. Brummer, "Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 10, 4, 809–999, 1981.
- [31] S. Y. Egorov, V. F. Kamalov, N. I. Koroteev, A. A. Krasnovsky, B. N. Toleutaev, S. V. Zinukov, "Rise and decay kinetics of photosensitized singlet oxygen luminescence in water. Measurements with nanosecond time-correlated single photon counting technique," *Chem. Phys. Lett.*, 163, 4–5, 421–424, 1989.
- [32] T. Takemura, N. Ohta, S. Nakajima, I. Sakata, "Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor," *Photochem. Photobiol.*, 50, 3, 339–344, 1989.
- [33] N. Breusing, S. Grimm, D. Mvondo, A. Flaccus, H. K. Biesalski, T. Grune, "Light-induced cytotoxicity after aminolevulinic acid treatment is mediated by heme and not by iron," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 99, 1, 36–43, 2010.
- [34] A. Sieroń, S. Kwiatek, "Twenty years of experience with PDD and PDT in Poland-review," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 6, 2, 73–8, 2009.
- [35] S. H. Ibbotson, "An overview of topical photodynamic therapy in dermatology," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 7, 1, 16–23, 2010.
- [36] M. Ishizuka, F. Abe, Y. Sano, K. Takahashi, K. Inoue, M. Nakajima, T. Kohda, N. Komatsu, S. Ogura, T. Tanaka, "Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy," *Int. Immunopharmacol.*, 11, 3, 358–65, 2011.
- [37] B. Krammer, T. Verwanger, "Photodynamic therapy with aminolevulinic acid or its methyl ester: Which one is superior?," *Med. Laser Appl.*, 24, 4, 221–226, 2009.

- [38] R. R. Allison, C. H. Sibata, "Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 7, 2, 61–75, 2010.
- [39] J. Zawacka-Pankau, J. Krachulec, I. Grulkowski, K. P. Bielawski, G. Selivanova, "The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 232, 3, 487–97, 2008.
- [40] L. Stryer, "*Biochemia*", PWN, 2003.
- [41] I. U. Heinemann, M. Jahn, D. Jahn, "The biochemistry of heme biosynthesis," *Arch. Biochem. Biophys.*, 474, 2, 238–51, 2008.
- [42] P. Krishnamurthy, T. Xie, J. D. Schuetz, "The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis," *Pharmacol. Ther.*, 114, 3, 345–58, 2007.
- [43] S. W. Ryter, J. Alam, A. M. K. Choi, "Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications," *Physiol. Rev.*, 86, 2, 583–650, 2006.
- [44] Y. Andoh, H. Suzuki, M. Araki, A. Mizutani, T. Ohashi, T. Okumura, Y. Adachi, S. Ikehara, S. Taketani, "Low- and high-level expressions of heme oxygenase-1 in cultured cells under uninduced conditions," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 3, 722–9, 2004.
- [45] J. Alam, S. Shibahara, A. Smith, "Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells," *J. Biol. Chem.*, 264, 11, 6371–5, 1989.
- [46] Y. Lavrovsky, M. L. Schwartzman, R. D. Levere, A. Kappas, N. G. Abraham, "Identification of binding sites for transcription factors NF- κ B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 13, 5987–91, 1994.
- [47] S. M. Keyse R. M. Tyrrell, "Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1, 99–103, 1989.
- [48] D. Nowis, M. Bugajski, M. Winiarska, J. Bil, A. Szokalska, P. Salwa, T. Issat, H. Was, A. Jozkowicz, J. Dulak, T. Stoklosa, J. Golab, "Zinc protoporphyrin IX, a heme oxygenase-1 inhibitor, demonstrates potent antitumor effects but is unable to potentiate antitumor effects of chemotherapeutics in mice," *BMC Cancer*, 8, 197, 1–12, 2008.
- [49] D. Nowis, M. Legat, T. Grzela, J. Niderla, E. Wilczek, G. M. Wilczyński, E. Głodkowska, "Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity," *Oncogene*, 25, 24, 3365–3374, 2006.
- [50] H. Dailey, A. Smith, "Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase," *Biochem. J.*, 223, 2, 441–5, 1984.

- [51] Z. Hua, S. L. Gibson, T. H. Foster, R. Hilf, "Effectiveness of δ -Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin as a Photosensitizer for Photodynamic Therapy in Vivo," *Cancer Res.*, 55, 8, 1723–1731, 1995.
- [52] R. Van Hillegersberg, J. W. Van Den Berg, W. J. Kort, O. T. Terpstra, J. H. Wilson, "Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats," *Gastroenterology*, 103, 2, 647–651, 1992.
- [53] R. C. Krieg, S. Fickweiler, O. S. Wolfbeis, R. Knuechel, "Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro," *Photochem. Photobiol.*, 72, 2, 226–33, 2000.
- [54] Y. Ohgari, Y. Nakayasu, S. Kitajima, M. Sawamoto, H. Mori, O. Shimokawa, H. Matsui, S. Taketani, "Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin," *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1–2, 42–9, 2005.
- [55] M. M. el-Sharabasy, A. M. el-Waseef, M. M. Hafez, S. A. Salim, "Porphyrin metabolism in some malignant diseases," *Br. J. Cancer*, 65, 3, 409–12, 1992.
- [56] P. Hinnen, F. DeRoos, M. VanVelthuysen, A. Edixhoven, R. VanHillegersberg, H. Tilanus, J. Wilson, P. Siersema, "Biochemical basis of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation: a study in patients with (pre)malignant lesions of the oesophagus," *Br. J. Cancer*, 78, 5, 679–82, 1998.
- [57] Y. Ohgari, Y. Miyata, T. Miyagi, S. Gotoh, T. Ohta, T. Kataoka, K. Furuyama, S. Taketani, "Roles of porphyrin and iron metabolisms in the δ -aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photodamage of tumor cells," *Photochem. Photobiol.*, 87, 5, 1138–45, 2011.
- [58] F. Yamamoto, Y. Ohgari, N. Yamaki, S. Kitajima, O. Shimokawa, H. Matsui, S. Taketani, "The role of nitric oxide in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of cancerous cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353, 3, 541–6, 2007.
- [59] M. Niziolek, W. Korytowski, A. W. Girotti, "Nitric oxide-induced resistance to lethal photooxidative damage in a breast tumor cell line," *Free Radic. Biol. Med.*, 40, 8, 1323–31, 2006.
- [60] P. Uehlinger, M. Zellweger, G. Wagnieres, L. Juilerat-Jeanneret, H. Van den Bergh, N. Lange, "5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 54, 72–80, 2000.
- [61] K. Berg, J. Moan, "The pH dependency of protoporphyrin IX formation in cells incubated with 5-aminolevulinic acid," *Cancer Lett.*, 113, 26, 25–29, 1997.

- [62] Ø. Gadmar, J. Moan, E. Scheie, M. Li-Wei, Q. Peng, "The stability of 5-aminolevulinic acid in solution," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 67, 3, 187–93, 2002.
- [63] L. Wyld, M. W. R. Reed, N. J. Brown, "The influence of hypoxia and pH on aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells in vitro," *Br. J. Cancer*, 77, 1621–1627, 1998.
- [64] I. Georgakoudi, P. C. Keng, T. H. Foster, "Hypoxia significantly reduces aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX synthesis in EMT6 cells," *Br. J. Cancer*, 79, 1372–1377, 1999.
- [65] J. Moan, K. Berg, O. B. Gadmar, L. Ma, P. Juzenasp, "The Temperature Dependence of Protoporphyrin IX Production in Cells and Tissues," *Photochem. Photobiol.*, 70, 4, 669–673, 1999.
- [66] G. Island, "Protoporphyrin IX accumulation in cells treated with 5-aminolevulinic acid: dependence on cell density, cell size and cell cycle," *Int. J. Cancer*, 139, 1997, 134–139, 1998.
- [67] A. R. K. Prasad, H. A. Dailey, "Effect of Cellular Location on the Function of Ferrochelatase," *J. Biol. Chem.*, 270, 31, 18198–18200, 1995.
- [68] L. Wyld, M. Tomlinson, M. W. R. Reed, N. J. Brown, "Aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy : cellular responses to glucose starvation," *Br. J. Cancer*, 86, 8, 1343–1347, 2002.
- [69] J. Yang, Y. Xia, X. Liu, S. Jiang, L. Xiong, "Desferrioxamine shows different potentials for enhancing 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy in several cutaneous cell lines," *Lasers Med. Sci.*, 25, 2, 251–7, 2010.
- [70] K. T. Moesta, B. Ebert, T. Handke, D. Nolte, C. Nowak, W. E. Haensch, R. K. Pandey, T. J. Dougherty, H. Rinneberg, P. M. Schlag, "Protoporphyrin IX Occurs Naturally in Colorectal Cancers and Their Metastases," *Cancer Res.*, 61, 991–999, 2001.
- [71] W. Kemmner, K. Wan, S. Rüttinger, B. Ebert, R. Macdonald, U. Klamm, K. T. Moesta, "Silencing of human ferrochelatase causes abundant protoporphyrin-IX accumulation in colon cancer," *FASEB J.*, 22, 2, 500–9, 2008.
- [72] A. Curnow, Y. Dogra, P. Winyard, S. Campbell, "Using iron chelating agents to enhance dermatological PDT," *Proc. SPIE*, 7380, 738026–1–738026–8, 2009.
- [73] O. Bech, D. Phillips, J. Moan, J. MacRobert, "A hydroxypyridinone (CP94) enhances protoporphyrin IX formation in 5-aminolaevulinic acid treated cells," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 41, 1–2, 136–44, 1997.
- [74] K. Berg, H. Anholt, O. Bech, J. Moan, "The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells," *Br. J. Cancer*, 74, 5, 688–97, 1996.

- [75] P. Uehlinger, J.-P. Ballini, H. van den Bergh, G. Wagnières, "On the Role of Iron and one of its Chelating Agents in the Production of Protoporphyrin IX Generated by 5-Aminolevulinic Acid and its Hexyl Ester Derivative Tested on an Epidermal Equivalent of Human Skin," *Photochem. Photobiol.*, 82, 4, 1069–76, 2006.
- [76] M. Wainwright, H. Smalley, C. Flint, "The use of photosensitisers in acne treatment," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 105, 1, 1–5, 2011.
- [77] A. Juzeniene, Q. Peng, J. Moan, "Topical applications of iron chelators in photosensitization," *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 12, 1268–1274, 2007.
- [78] P. Juzenas, A. Juzeniene, J. Moan, "Deferoxamine photosensitizes cancer cells in vitro," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 332, 2, 388–91, 2005.
- [79] P. A. Valdés, K. Samkoe, J. A. O'Hara, D. W. Roberts, K. D. Paulsen, B. W. Pogue, "Deferoxamine iron chelation increases delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in xenograft glioma model," *Photochem. Photobiol.*, 86, 2, 471–5, 2010.
- [80] S. M. Campbell, C. a Morton, R. Alyahya, S. Horton, A. Pye, A. Curnow, "Clinical investigation of the novel iron-chelating agent, CP94, to enhance topical photodynamic therapy of nodular basal cell carcinoma," *Br. J. Dermatol.*, 159, 2, 387–93, 2008.
- [81] P. Lipiński, R. R. Starzyński, "The role of iron regulatory proteins (IRPs) in the regulation of systemic iron homeostasis: lessons from studies on IRP1 and IRP2 knock out mice," *Postepy Hig. Med. Dosw. Online*, 60, 322–330, 2006.
- [82] Y. Yu, D. S. Kalinowski, Z. Kovacevic, A. R. Sifakos, P. J. Jansson, C. Stefani, D. B. Lovejoy, P. C. Sharpe, P. V Bernhardt, D. R. Richardson, "Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors," *J. Med. Chem.*, 52, 17, 5271–94, 2009.
- [83] P. V Bernhardt, L. M. Caldwell, T. B. Chaston, P. Chin, D. R. Richardson, "Cytotoxic iron chelators: characterization of the structure, solution chemistry and redox activity of ligands and iron complexes of the di-2-pyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (HPKIH) analogues," *J. Biol. Inorg. Chem.*, 8, 8, 866–80, 2003.
- [84] K. Gkouvatsos, G. Papanikolaou, K. Pantopoulos, "Regulation of iron transport and the role of transferrin," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1820, 3, 188–202, 2012.
- [85] A. Shoden, B. Gabrio, C. Finch, "The relationship between ferritin and hemosiderin in rabbits and man," *J. Biol. Chem.*, 204, 823–30, 1953.
- [86] P. Sharp, S. K. Srail, "Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption," *World J. Gastroenterol.*, 13, 35, 4716–24, 2007.

- [87] D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, "The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of iron overload disease and cancer," *Pharmacol. Rev.*, 57, 4, 547–583, 2005.
- [88] J. L. Buss, F. M. Torti, S. V Torti, "The role of iron chelation in cancer therapy," *Curr. Med. Chem.*, 10, 12, 1021–1034, 2003.
- [89] T. Ganz, "Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation," *Blood*, 102, 3, 783–8, 2003.
- [90] D. S. Kalinowski, Y. Yu, P. C. Sharpe, M. Islam, Y. Liao, D. B. Lovejoy, N. Kumar, P. V Bernhardt, D. R. Richardson, "Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents," *J. Med. Chem.*, 50, 15, 3716–29, 2007.
- [91] T. R. Daniels, T. Delgado, J. a Rodriguez, G. Helguera, M. L. Penichet, "The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer.," *Clin. Immunol.*, 121, 2, 144–58, 2006.
- [92] S. Taketani, Y. Adachi, Y. Nakahashi, "Regulation of the expression of human ferrochelatase by intracellular iron levels," *Eur. J. Biochem.*, 267, 15, 4685–92, 2000.
- [93] M. Whitnall, J. Howard, P. Ponka, D. R. Richardson, "A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 40, 14901–6, 2006.
- [94] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, W. V. Rodwell, "*Biochemia Harpera*", Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1995.
- [95] D. R. Richardson, P. C. Sharpe, D. B. Lovejoy, D. Senaratne, D. S. Kalinowski, M. Islam, P. V Bernhardt, "Dipyridyl thiosemicarbazone chelators with potent and selective antitumor activity form iron complexes with redox activity," *J. Med. Chem.*, 49, 22, 6510–21, 2006.
- [96] P. V Bernhardt, J. Mattsson, D. R. Richardson, "Complexes of cytotoxic chelators from the dipyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (HPKIH) analogues," *Inorg. Chem.*, 45, 2, 752–60, 2006.
- [97] D. R. Richardson, D. S. Kalinowski, S. Lau, P. J. Jansson, D. B. Lovejoy, "Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1790, 7, 702–17, 2009.
- [98] D. T. Logan, X. D. Su, A. Aberg, K. Regnström, J. Hajdu, H. Eklund, P. Nordlund, "Crystal structure of reduced protein R2 of ribonucleotide reductase: the structural basis for oxygen activation at a dinuclear iron site," *Structure*, 4, 9, 1053–64, 1996.

- [99] D. S. Kalinowski, P. C. Sharpe, P. V Bernhardt, D. R. Richardson, "Structure-activity relationships of novel iron chelators for the treatment of iron overload disease: the methyl pyrazinylketone isonicotinoyl hydrazone series," *J. Med. Chem.*, 51, 2, 331–44, 2008.
- [100] T. B. Chaston, D. R. Richardson, "Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity, and toxicity," *Am. J. Hematol.*, 73, 3, 200–10, 2003.
- [101] G. Crisponi, M. Remelli, "Iron chelating agents for the treatment of iron overload," *Coord. Chem. Rev.*, 252, 10–11, 1225–1240, 2008.
- [102] T. Manning, G. Kean, J. Thomas, K. Thomas, M. Corbitt, D. Gosnell, R. Ware, S. Fulp, J. Jarrard, D. Phillips, "Iron chelators in medicinal applications - chemical equilibrium considerations in pharmaceutical activity," *Curr. Med. Chem.*, 16, 19, 2416–29, 2009.
- [103] P. J. Jansson, P. C. Sharpe, P. V Bernhardt, D. R. Richardson, "Novel thiosemicarbazones of the ApT and DpT series and their copper complexes: identification of pronounced redox activity and characterization of their antitumor activity," *J. Med. Chem.*, 53, 15, 5759–69, 2010.
- [104] Z. D. Liu, R. C. Hider, "Design of iron chelators with therapeutic application," *Coord. Chem. Rev.*, 232, 1–2, 151–171, 2002.
- [105] A. El-Asmy, G. Al-Hazmi, "Synthesis and spectral feature of benzophenone-substituted thiosemicarbazones and their Ni(II) and Cu(II) complexes," *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 71, 5, 1885–90, 2009.
- [106] R. W. Brockman, R. W. Sidwell, G. Arnett, S. Shaddix, "Heterocyclic thiosemicarbazones: correlation between structure, inhibition of ribonucleotide reductase, and inhibition of DNA viruses," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 133, 2, 609–14, 1970.
- [107] T. B. Chaston, D. B. Lovejoy, R. N. Watts, D. R. Richardson, "Examination of the Antiproliferative Activity of Iron Chelators : Multiple Cellular Targets and the Different Mechanism of Action of Triapine Compared with Desferrioxamine and the Potent Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone Analogue 311," *Clin. Cancer Res.*, 9, 1, 402–14, 2003.
- [108] I. H. Hall, C. B. Lackey, T. D. Kistler, R. W. Durham, E. M. Jouad, M. Khan, X. D. Thanh, S. Djebbar-Sid, O. Benali-Baitich, G. M. Bouet, "Cytotoxicity of copper and cobalt complexes of furfural semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives in murine and human tumor cell lines," *Pharmazie*, 55, 12, 937–41, 2000.
- [109] J. A. Ludwig, G. Szakács, S. E. Martin, B. F. Chu, C. Cardarelli, Z. E. Sauna, N. J. Caplen, H. M. Fales, S. V Ambudkar, J. N. Weinstein, M. M. Gottesman, "Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer," *Cancer Res.*, 66, 9, 4808–15, 2006.

- [110] J. Shao, B. Zhou, A. J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, "A Ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase," *Mol. Cancer Ther.*, 5, 3, 586–92, 2006.
- [111] J. C. Yalowich, X. Wu, R. Zhang, R. Kanagasabai, M. Hornbaker, B. B. Hasinoff, "The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α ," *Biochem. Pharmacol.*, 84, 1, 52–8, 2012.
- [112] J. Knox, S. J. Hotte, C. Kollmannsberger, E. Winquist, B. Fisher, E. A. Eisenhauer, "Phase II study of triapine(R) in patients with metastatic renal cell carcinoma: a trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group," *Inv. New Drugs*, 2007.
- [113] B. Ma, B. C. Goh, E. H. Tan, K. C. Lam, R. Soo, S. S. Leong, L. Z. Wang, F. Mo, A. T. C. Chan, B. Zee, T. Mok, "A multicenter phase II trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine) and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer with pharmacokinetic evaluation using peripheral blood mononuclear cells," *Invest. New Drugs.*, 26, 2, 169–73, 2008.
- [114] M. J. Mackenzie, D. Saltman, H. Hirte, J. Low, C. Johnson, G. Pond, M. J. Moore, "A Phase II study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) and gemcitabine in advanced pancreatic carcinoma. A trial of the Princess Margaret hospital Phase II consortium," *Invest. New Drugs.*, 25, 6, 553–8, 2007.
- [115] R. A. Finch, M. Liu, S. P. Grill, W. C. Rose, R. Loomis, K. M. Vasquez, Y. Cheng, A. C. Sartorelli, "Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity," *Biochem. Pharmacol.*, 59, 8, 983–91, 2000.
- [116] D. R. Richardson, "Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 42, 3, 267–81, 2002.
- [117] J. Yuan, D. B. Lovejoy, D. R. Richardson, "Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment," *Blood*, 104, 5, 1450–8, 2004.
- [118] V. A. Rao, S. R. Klein, K. K. Agama, E. Toyoda, N. Adachi, Y. Pommier, E. B. Shacter, "The iron chelator Dp44mT causes DNA damage and selective inhibition of topoisomerase II α in breast cancer cells," *Cancer Res.*, 69, 3, 948–57, 2009.
- [119] E. Nulsri, D. R. Richardson, S. Lerdwana, S. Fucharoen, T. Yamagishi, D. S. Kalinowski, K. Pattanapanyasat, "Antitumor activity and mechanism of action of the iron chelator, Dp44mT, against leukemic cells," *Am. J. Hematol.*, 84, 3, 170–6, 2009.

- [120] D. R. Richardson, D. S. Kalinowski, V. Richardson, P. C. Sharpe, D. B. Lovejoy, M. Islam, P. V Bernhardt, "2-Acetylpyridine thiosemicarbazones are potent iron chelators and antiproliferative agents: redox activity, iron complexation and characterization of their antitumor activity," *J. Med. Chem.*, 52, 5, 1459–70, 2009.
- [121] A. Y. Lukmantara, D. S. Kalinowski, N. Kumar, D. R. Richardson, "Synthesis and biological evaluation of substituted 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones: Novel structure-activity relationships underpinning their anti-proliferative and chelation efficacy," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012.
- [122] D. B. Lovejoy, D. M. Sharp, N. Seebacher, P. Obeidy, T. Prichard, C. Stefani, M. T. Basha, P. C. Sharpe, P. J. Jansson, D. S. Kalinowski, P. V Bernhardt, D. R. Richardson, "Novel second-generation di-2-pyridylketone thiosemicarbazones show synergism with standard chemotherapeutics and demonstrate potent activity against lung cancer xenografts after oral and intravenous administration in vivo," *J. Med. Chem.*, 55, 16, 7230–44, 2012.
- [123] N. F. Olivieri G. M. Brittenham, "Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia," *Blood*, 89, 3, 739–61, 1997.
- [124] C. Helson, L. Helson, "Deferoxamine and human neuroblastoma and primitive neuroectodermal tumor cell lines," *Anticancer Res.*, 12, 2, 481–3.
- [125] Z. Estrov, A. Tawa, X. H. Wang, I. D. Dubé, H. Sulh, A. Cohen, E. W. Gelfand, M. H. Freedman, "In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia," *Blood*, 69, 3, 757–61, 1987.
- [126] J. Blatt, S. R. Taylor, S. Stitely, "Mechanism of antineuroblastoma activity of deferoxamine in vitro," *J. Lab. Clin. Med.*, 112, 4, 433–6, 1988.
- [127] D. L. Becton, P. Bryles, "Deferoxamine Inhibition of Human Neuroblastoma Viability and Proliferation," *Cancer Res.*, 48, 7, 7189–7192, 1988.
- [128] H. Oexle, E. Gnaiger, G. Weiss, "Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1413, 3, 99–107, 1999.
- [129] D. R. Richardson, K. Milnes, "The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents II: the mechanism of action of ligands derived from salicylaldehyde benzoyl hydrazone and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde benzoyl hydrazone," *Blood*, 89, 8, 3025–38, 1997.
- [130] E. M. Becker, D. B. Lovejoy, J. M. Greer, R. Watts, D. R. Richardson, "Identification of the di-pyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (PKIH) analogues as potent iron chelators and anti-tumour agents," *Br. J. Pharmacol.*, 138, 5, 819–30, 2003.

- [131] G. Darnell, D. R. Richardson, "The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents III: the effect of the ligands on molecular targets involved in proliferation," *Blood*, 94, 2, 781–92, 1999.
- [132] D. R. Richardson, P. V Bernhardt, "Crystal and molecular structure of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde isonicotinoyl hydrazone (NIH) and its iron(III) complex: an iron chelator with anti-tumour activity," *J. Biol. Inorg. Chem.*, 4, 3, 266–73, 1999.
- [133] S. V Torti, F. M. Torti, S. P. Whitman, M. W. Brechbiel, G. Park, R. P. Planalp, "Tumor cell cytotoxicity of a novel metal chelator," *Blood*, 92, 4, 1384–9, 1998.
- [134] A. M. Samuni, M. C. Krishna, W. DeGraff, A. Russo, R. P. Planalp, M. W. Brechbiel, J. B. Mitchell, "Mechanisms underlying the cytotoxic effects of Tachpyr-a novel metal chelator," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1571, 3, 211–8, 2002.
- [135] J. Turner, C. Koumenis, T. E. Kute, R. P. Planalp, M. W. Brechbiel, D. Beardsley, B. Cody, K. D. Brown, F. M. Torti, S. V Torti, "Tachpyridine, a metal chelator, induces G2 cell-cycle arrest, activates checkpoint kinases, and sensitizes cells to ionizing radiation," *Blood*, 106, 9, 3191–9, 2005.
- [136] R. Zhao, R. P. Planalp, R. Ma, B. T. Greene, B. T. Jones, M. W. Brechbiel, F. M. Torti, S. V Torti, "Role of zinc and iron chelation in apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator," *Biochem. Pharmacol.*, 67, 9, 1677–88, 2004.
- [137] R. D. Abeysinghe, B. T. Greene, R. Haynes, M. C. Willingham, J. Turner, R. P. Planalp, M. W. Brechbiel, F. M. Torti, S. V Torti, "P53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator," *Carcinogenesis*, 22, 10, 1607–14, 2001.
- [138] F. Zunino, G. Capranico, "DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines," *Anticancer Drug Des.*, 5, 4, 307–17, 1990.
- [139] J. C. Kwok, D. R. Richardson, "Unexpected anthracycline-mediated alterations in iron-regulatory protein-RNA-binding activity: the iron and copper complexes of anthracyclines decrease RNA-binding activity," *Mol. Pharm.*, 62, 4, 888–900, 2002.
- [140] E. L. Kostoryz, D. M. Yourtee, "Oxidative mutagenesis of doxorubicin-Fe(III) complex," *Mutat. Res.*, 490, 2, 131–9, 2001.
- [141] H. Eliot, L. Gianni, C. Myers, "Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex," *Biochemistry*, 23, 928–936, 1984.
- [142] H. Kaiserová, T. Šimůnek, W. J. F. van der Vijgh, A. Bast, E. Kvasnicková, "Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1772, 9, 1065–74, 2007.

- [143] X. Xu, H. L. Persson, D. R. Richardson, "Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron," *Mol. Pharm.*, 68, 2, 261–271, 2005.
- [144] R. J. Tallarida, "Drug Synergism : Its Detection and Applications," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298, 3, 865–872, 2001.
- [145] T. Chou, "Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies," *Pharmacol. Rev.*, 58, 3, 621–681, 2007.
- [146] T. Chou, P. Talalay, "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors," *Adv. Enzyme Regul.*, 22, 27–55, 1984.
- [147] T. Chou, "Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method," *Cancer Res.*, 70, 2, 440–446, 2010.
- [148] L. Zhao, J. Au, M. Wientjes, "Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction," *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, 2, 241–249, 2010.
- [149] A. J. Levine, C. A. Finlay, P. W. Hinds, "P53 is a Tumor Suppressor Gene," *Cell*, S116, 67–69, 2004.
- [150] K. H. Vousden, X. Lu, "Live or let die: the cell's response to p53," *Nat. Rev. Cancer.*, 2, 8, 594–604, 2002.
- [151] A. Sznarkowska, R. Olszewski, J. Zawacka-Pankau, "Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu , natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 64, 396–407, 2010.
- [152] L. Bai, W. Zhu, "p53 : Structure, Function and Therapeutic Applications," *J. Cancer Mol.*, 2, 4, 141–153, 2006.
- [153] M. Kitayner, H. Rozenberg, N. Kessler, D. Rabinovich, L. Shaulov, T. E. Haran, Z. Shaked, "Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers," *Mol. Cell*, 22, 6, 741–53, 2006.
- [154] A. C. Joerger, A. R. Fersht, "Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants," *Oncogene*, 26, 15, 2226–42, 2007.
- [155] A. L. Okorokov, M. B. Sherman, C. Plisson, V. Grinkevich, K. Sigmundsson, G. Selivanova, J. Milner, E. V Orlova, "The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity," *EMBO J.*, 25, 21, 5191–200, 2006.
- [156] M. Oren, A. Levine, "Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 56–59, 1983.

- [157] K. Sakaguchi, H. Sakamoto, M. S. Lewis, C. W. Anderson, J. W. Erickson, E. Appella, D. Xie, "Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53," *Biochemistry*, 36, 33, 10117–24, 1997.
- [158] A. Ventura, D. G. Kirsch, M. E. McLaughlin, D. A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E. E. Reczek, R. Weissleder, T. Jacks, "Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo," *Nature*, 445, 7128, 661–5, 2007.
- [159] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. a Liu, "In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2," *Science*, 303, 5659, 844–8, 2004.
- [160] K. Ding, Y. Lu, Z. Nikolovska-Coleska, S. Qiu, Y. Ding, W. Gao, J. Stuckey, K. Krajewski, P. P. Roller, Y. Tomita, D. A. Parrish, J. R. Deschamps, S. Wang, "Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors," *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 29, 10130–1, 2005.
- [161] N. Issaeva, P. Bozko, M. Enge, M. Protopopova, L. G. G. C. Verhoef, M. Masucci, A. Pramanik, G. Selivanova, "Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors," *Nat. Med.*, 10, 12, 1321–8, 2004.
- [162] S. Lain, J. J. Hollick, J. Campbell, O. D. Staples, M. Higgins, M. Aoubala, A. McCarthy, V. Appleyard, K. E. Murray, L. Baker, A. Thompson, J. Mathers, S. J. Holland, M. J. R. Stark, G. Pass, J. Woods, D. P. Lane, N. J. Westwood, "Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator," *Cancer Cell*, 13, 5, 454–63, 2008.
- [163] S. C. Mutka, W. Q. Yang, S. D. Dong, "Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity in vivo," *Cancer Res.*, 69, 2, 510–7, 2009.
- [164] M. L. Choong, H. Yang, M. A. Lee, D. P. Lane, "Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D," *Cell cycle*, 8, 17, 2810–8, 2009.
- [165] J. Zawacka-Pankau, N. Issaeva, S. Hossain, A. Pramanik, G. Selivanova, A. J. Podhajaska, "Protoporphyrin IX interacts with wild-type p53 protein in vitro and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and - independent manner," *J. Biol. Chem.*, 282, 4, 2466–72, 2007.
- [166] J. Zawacka-Pankau, A. Kostecka, A. Sznarkowska, A. Kawiak, "A close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach?," *Cell Cycle*, 9, 4, 720–728, 2010.
- [167] J. Zawacka-Pankau, K. Maleńczyk, A. Sznarkowska, "Struktura i regulacja białka p73 w komórce – implikacja w terapii przeciwnowotworowej," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 64, 78–86, 2010.
- [168] T. Ozaki, A. Nakagawara, "p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world," *Cancer Sci.*, 96, 11, 729–37, 2005.

- [169] L. M. S. Lau, J. K. Nugent, X. Zhao, M. S. Irwin, "HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function," *Oncogene*, 27, 7, 997–1003, 2008.
- [170] H. S. Bell, C. Dufes, J. O. Prey, D. Crighton, D. Bergamaschi, X. Lu, A. G. Schätzlein, K. H. Vousden, K. M. Ryan, "A p53-derived apoptotic peptide derepresses p73 to cause tumor regression in vivo," *J. Clin. Invest.*, 117, 4, 1008–18, 2007.
- [171] J. E. Kravchenko, G. V Ilyinskaya, P. G. Komarov, L. S. Agapova, D. V Kochetkov, E. Strom, E. I. Frolova, I. Kovriga, a V Gudkov, E. Feinstein, P. M. Chumakov, "Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 17, 6302–7, 2008.
- [172] A. Stępień, M. Izdebska, A. Grzanka, "Rodzaje śmierci komórki," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 61, 420–428, 2007.
- [173] J. Kerr, A. Wyllie, A. Currie, "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics," *Br. J. Cancer*, 26, 239–57, 1972.
- [174] S. N. Syed Abdul Rahman, N. Abdul Wahab, S. N. Abd Malek, "In Vitro Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of *Curcuma zedoaria*," *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2013, 1–14, 2013.
- [175] J.-Z. Wu, P. C. Ho, "Evaluation of the in vitro activity and in vivo bioavailability of realgar nanoparticles prepared by cryo-grinding," *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29, 1, 35–44, 2006.
- [176] R. C. Taylor, S. P. Cullen, S. J. Martin, "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 3, 231–41, 2008.
- [177] R. M. Locksley, N. Killeen, M. J. Lenardo, "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology," *Cell*, 104, 4, 487–501, 2001.
- [178] A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, V. M. Dixit, "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis," *Cell*, 81, 4, 505–12, 1995.
- [179] P. T. Daniel, "Dissecting the pathways to death," *Leukemia*, 14, 12, 2035–44, 2000.
- [180] R. Ockner, "Apoptosis and liver diseases: Recent concepts of mechanism and significance," *J Gastroenterol. Hepatol.*, 16, 248–260, 2001.
- [181] G. Kroemer, "Mitochondrial control of apoptosis: an introduction," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304, 3, 433–435, 2003.

- [182] T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. a Yankner, J. Yuan, "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta," *Nature*, 403, 6765, 98–103, 2000.
- [183] A. Hordyjewska, K. Pasternak, "Apoptotyczna śmierć komórki," *Adv Clin Exp Med*, 14, 3, 545–554, 2005.
- [184] D. J. McConkey, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, "Apoptosis-molecular mechanisms and biomedical implications," *Mol. Aspects Med.*, 17, 1, 1–110, 1996.
- [185] M. Alvarez, A. Villanueva, P. Acedo, M. Cañete, J. C. Stockert, "Cell death causes relocalization of photosensitizing fluorescent probes," *Acta Histochem.*, 113, 3, 363–8, 2011.
- [186] K. W. Barbour, F. G. Berger, "Cell death in response to antimetabolites directed at thymidylate synthase," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 61, 2, 189–201, 2008.
- [187] B. F. Trump, I. K. Berezsky, "Calcium-mediated cell injury and cell death," *FASEB J.*, 9, 2, 219–228, 1995.
- [188] D. Bano, K. W. Young, C. J. Guerin, R. Lefevre, N. J. Rothwell, L. Naldini, R. Rizzuto, E. Carafoli, P. Nicotera, "Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity," *Cell*, 120, 2, 275–85, 2005.
- [189] G. Majno, I. Joris, "Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An overview of cell death," *Am. J. Pathol.*, 146, 1, 3–15, 1995.
- [190] S. Orrenius, P. Nicotera, B. Zhivotovsky, "Cell death mechanisms and their implications in toxicology," *Toxicol. Sci.*, 119, 1, 3–19, 2011.
- [191] K. Chu, N. Teele, M. W. Dewey, N. Albright, W. C. Dewey, "Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3sigma and CDKN1A (p21) knockout cell lines," *Radiat. Res.*, 162, 3, 270–86, 2004.
- [192] M. S. Ricci, W.-X. Zong, "Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways," *Oncologist*, 11, 4, 342–57, 2006.
- [193] M. Castedo, J.-L. Perfettini, T. Roumier, K. Andreau, R. Medema, G. Kroemer, "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition," *Oncogene*, 23, 16, 2825–37, 2004.
- [194] I. Vitale, L. Galluzzi, M. Castedo, G. Kroemer, "Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12, 6, 385–92, 2011.
- [195] J. Erenpreisa, M. S. Cragg, "Mitotic death: a mechanism of survival? A review," *Cancer Cell Int.*, 1, 1, 1–7, 2001.

- [196] Y.-W. Eom, M. A. Kim, S. S. Park, M. J. Goo, H. J. Kwon, S. Sohn, W.-H. Kim, G. Yoon, K. S. Choi, "Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype," *Oncogene*, 24, 30, 4765–77, 2005.
- [197] Q. Y. He, Y. Y. Liang, D. S. Wang, D. D. Li, "Characteristics of mitotic cell death induced by enediyne antibiotic lidamycin in human epithelial tumor cells," *Int. J. Oncol.*, 20, 2, 261–6, 2002.
- [198] S. Shimizu, T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C. B. Thompson, Y. Tsujimoto, "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes," *Nat. Cell Biol.*, 6, 12, 1221–8, 2004.
- [199] H. Okada, T. W. Mak, "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells," *Nat. Rev. Cancer*, 4, 8, 592–603, 2004.
- [200] I. B. Roninson, E. V Broude, B. D. Chang, "If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells," *Drug Resist. Updat.*, 4, 5, 303–13, 2001.
- [201] P. D. Guberhan, "What has senescence got to do with cancer?," *Cancer Cell*, 7, 6, 505–512, 2005.
- [202] G. Koopman, C. Reutelingsperger, G. Kuijten, R. Keehnen, S. Pals, M. van Oers, "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on lymphoma cells undergoing apoptosis," *Blood*, 84, 5, 1415–20, 1994.
- [203] M. van Engeland, F. Ramaekers, "A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture," *Cytometry*, 24, 131–39, 1996.
- [204] B. Fadeel, D. Xue, "The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 44, 5, 264–77, 2009.
- [205] A. G. Buckland, D. C. Wilton, "Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1483, 2, 199–216, 2000.
- [206] H. Sawai, N. Domae, "Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 411, 3, 569–73, 2011.
- [207] S. Huang, J. Li, L. Han, S. Liu, H. Ma, R. Huang, C. Jiang, "Dual targeting effect of Angiopep-2-modified, DNA-loaded nanoparticles for glioma," *Biomaterials*, 32, 28, 6832–8, 2011.

- [208] A. M. Rieger, K. L. Nelson, J. D. Konowalchuk, D. R. Barreda, "Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death," *J. Vis. Exp.*, 24, 50, 1–4, 2011.
- [209] Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson, "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation," *J. Cell Biol.*, 119, 3, 493–501, 1992.
- [210] Z. Darzynkiewicz, D. Galkowski, H. Zhao, "Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay," *Methods*, 44, 3, 250–254, 2008.
- [211] B. T. Kurien, R. H. Scofield, "Western blotting," *Methods*, 38, 4, 283–93, 2006.
- [212] I. V Ukrainets, L. Yangyang, A. A. Tkach, O. V Gorokhova, A. V Turov, "4-hydroxy-2-quinolones 165*. 1-R-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydro-quinoline-3-carbaldehydes and their thiosemicarbazones. Synthesis, structure, and biological properties," *Chem. Heterocycl. Compd.*, 45, 6, 705–714, 2009.
- [213] E. Nasuto, "Próba syntezy 5-hydroksy-2-metylo-6-chinolinokarbaldehydu jako prekursora nowych chelatorów żelaza," *Praca magisterska*, 2012.
- [214] M. Serda, "Synteza i aktywność biologiczna nowych analogów tosemikarbazonowych chelatorów żelaza," *Praca doktorska*, 2013.
- [215] W. H. Meek, C. H. Fuchsman, "Carboxylation of Substituted Phenols in N,N-Dimethylamide Solvents at Atmospheric Pressure," *J. Chem. Eng. Data*, 14, 388–391, 1969.
- [216] A. Taori, R. Nema, D. Kohli, R. Uppadhyay, "Nalidixic acid prodrugs: amides from amino acid ester and nalidixic acid," *Arch. Pharm. Res.*, 14, 1, 48–51, 1991.
- [217] A. Sener, R. Kasimogullari, M. Sener, H. Genc, "Studies on Reactions of Cyclic Oxalyl Compounds with Hydrazines or Hydrazones. 2. Synthesis and Reactions of 4-Benzoyl-1-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic Acid," *Chem. Heterocycl. Compd.*, 40, 8, 1039–1046, 2004.
- [218] R. Adams, L. H. Ulich, "The use of oxalyl chloride and bromide for producing acid chlorides, acid bromides or acid anhydrides," *J. Am. Chem. Soc.*, 42, 599–611, 1920.
- [219] J. S. Cha, H. C. Brown, "Exceptionally Facile Reduction of Acid Chlorides to Aldehydes by Sodium Tri- tert-butoxyaluminumhydride," *J. Org. Chem.*, 58, 4732–4734, 1993.
- [220] V. Opletalová, D. S. Kalinowski, M. Vejsová, J. Kunes, M. Pour, J. Jampflek, V. Buchta, D. R. Richardson, "Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: cellular iron chelation mediating cytotoxic activity," *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 9, 1878–89, 2008.

- [221] B. Valeur, "*Molecular Fluorescence - Principle and Applications*," WILEY-VCH, 2002.
- [222] J. García-Tojal, A. García-Orad, J. L. Serra, J. L. Pizarro, L. Lezama, M. I. Arriortua, T. Rojo, "Synthesis and spectroscopic properties of copper(II) complexes derived from thiophene-2-carbaldehyde thiosemicarbazone. Structure and biological activity of [Cu(C₆H₆N₃S₂)₂]," *J. Inorg. Biochem.*, 75, 1, 45–54, 1999.
- [223] S. Konstantinovic, B. Radovanovic, Z. Todorovic, S. Ilic, "Spectrophotometric study of Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Pd(II) and Hg(II) complexes with isatin- β -thiosemicarbazone," *J. Serb. Chem. Soc.*, 72, 10, 975–981, 2007.
- [224] H. Rein, K. Ruckpaul, O. Ristau, W. Haberditzl, "Studies on the magneto-optical rotation of porphyrins, hemins and methemoglobin compounds," *Acta Biol. Med. Ger.*, 34, 3, 325–44, 1975.
- [225] V. N. Nemykin, R. G. Hadt, "Interpretation of the UV-vis spectra of the meso(ferrocenyl)-containing porphyrins using a TDDFT approach: is Gouterman's classic four-orbital model still in play?," *J. Phys. Chem. A*, 114, 45, 12062–6, 2010.
- [226] Y. Yu, Y. S. Rahmanto, D. R. Richardson, "Bp44mT: an orally active iron chelator of the thiosemicarbazone class with potent anti-tumour efficacy," *Br. J. Pharmacol.*, 165, 1, 148–66, 2012.
- [227] P. V Bernhardt, P. C. Sharpe, M. Islam, D. B. Lovejoy, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, "Iron chelators of the dipyriddyketone thiosemicarbazone class: precomplexation and transmetalation effects on anticancer activity," *J. Med. Chem.*, 52, 2, 407–15, 2009.
- [228] V. Philip, V. Suni, M. R. P. Kurup, M. Nethaji, "Manganese(II) complexes of substituted di-2-pyridyl ketone thiosemicarbazones: structural and spectral studies," *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 64, 1, 171–7, 2006.
- [229] D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, "Future of toxicology-iron chelators and differing modes of action and toxicity: the changing face of iron chelation therapy," *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 5, 715–20, 2007.
- [230] T. B. Chaston, R. N. Watts, J. Yuan, D. R. Richardson, "Potent Antitumor Activity of Novel Iron Chelators Derived from Di-2-Pyridylketone Isonicotinoyl Hydrazone Involves Fenton-Derived Free Radical Generation," *Clin. Cancer Res.*, 10, 21, 7365–7374, 2004.
- [231] J. Małecki, A. Maroń, M. Serda, M. Dolezal, J. Polański, "Synthesis, characterization and molecular structure of Ru(II) complex with benzoylpyrazine carboxylic acid derivatives," *Polyhedron*, 41, 1, 104–114, 2012.
- [232] J. Małecki, A. Maroń, M. Serda, J. Polański, "Ruthenium(II) carbonyl complexes with thiosemicarbazone ligands," *Polyhedron*, 56, 44–54, 2013.

- [233] F. A. Beckford, G. Leblanc, J. Thessing, M. Shaloski, B. J. Frost, L. Li, N. P. Seeram, "Organometallic ruthenium complexes with thiosemicarbazone ligands: Synthesis, structure and cytotoxicity of [(η^6 -p-cymene)Ru(NS)Cl] (NS = 9-anthraldehyde thiosemicarbazones)," *Inorg. Chem. Commun.*, 12, 11, 1094–1098, 2009.
- [234] M. U. Raja, E. Sindhuja, R. Ramesh, "Arene ruthenium(II) p-chloroacetophenone phenylthiosemicarbazone complex mediated transfer hydrogenation of ketones," *Inorg. Chem. Commun.*, 13, 11, 1321–1324, 2010.
- [235] N. a P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, "Clonogenic assay of cells in vitro," *Nat. Protoc.*, 1, 5, 2315–9, 2006.
- [236] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V," *J. Immunol. Methods*, 184, 1, 39–51, 1995.
- [237] W. Jakubowski, G. Bartosz, "2,7-Dichlorofluorescein Oxidation and Reactive Oxygen Species: What Does It Measure?," *Cell Biol. Int.*, 24, 10, 757–60, 2000.
- [238] A. Gomes, E. Fernandes, J. L. F. C. Lima, "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species," *J. Biochem. Biophys. Methods*, 65, 45–80, 2005.
- [239] C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, S. C. Bondy, "Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress," *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 227–231, 1992.
- [240] D. J. Robinson, H. S. De Bruijn, N. Van Der Veen, M. R. Stringer, B. Stanley, W. M. Star, "Protoporphyrin IX Fluorescence Photobleaching during ALA-Mediated Photodynamic Therapy of UVB-Induced Tumors in Hairless Mouse Skin," *Photochem. Photobiol.*, 69, 1, 61–70, 1999.
- [241] D. J. Robinson, H. S. de Bruijn, N. van der Veen, M. R. Stringer, S. B. Brown, W. M. Star, "Fluorescence photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect," *Photochem. Photobiol.*, 67, 1, 140–9, 1998.
- [242] R. Sørensen, V. Iani, J. Moan, "Kinetics of photobleaching of protoporphyrin IX in the skin of nude mice exposed to different fluence rates of red light," *Photochem. Photobiol.*, 68, 6, 835–40, 1998.
- [243] J. Moan, G. Streckyte, S. Bagdonas, Ø. Bech, K. Berg, "Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid," *Int. J. Cancer*, 97, 1996, 90–97, 1997.
- [244] J. Kapuscinski, "DAPI: a DNA-specific fluorescent probe," *Biotech. Histochem.*, 70, 5, 220–33, 1995.

- [245] F. Petrat, P. S. K. M, de G. H., “‘Mitochondrial’ photochemical drugs do not release toxic amounts of $1O_2$ within the mitochondrial matrix space,” *Arch. Biochem. Biophys.*, 412, 2, 207–215, 2003.
- [246] R. Bhowmick, A. W. Girotti, “Cytoprotective induction of nitric oxide synthase in a cellular model of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy,” *Free Radic. Biol. Med.*, 48, 10, 1296–301, 2010.
- [247] S. L. Gibbs, “Analysis of cell line variation in biochemical production of protoporphyrin IX,” *Proc. SPIE*, 6139, p. 61390A–61390A–10, 2006.
- [248] K. Choudry, R. Brooke, W. Farrar, L. Rhodes, “The effect of an iron chelating agent on protoporphyrin IX levels and phototoxicity in topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy,” *Br. J. Dermatol.*, 149, 1, 124–30, 2003.
- [249] B. König, A. De Meijere, “Synthesis and Diels-Alder Reactions of 1,2-Dimethylene- and 1,2,9,10-Tetramethylene[2.2]paracyclophane: New Routes to Bridge-Anellated [2.2]Paracyclophanedienes,” *Chemische Berichte*, 125, 8, 1895–1898, 1992.

Autorka otrzymała stypendium w ramach projektu
DoktoRIS – Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska
współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

