



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: **mgr inż. Joanna Pilch**

Dyscyplina naukowa: **nauki chemiczne**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

Odpowiedź komórkowa indukowana przez niesymetryczne bisakrydyny skoniugowane z nanocząstkami w komórkach ludzkich raków okrężnicy i płuc

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

The cellular response induced by unsymmetrical bisacridines conjugated with nanoparticles in human lung and colon cancer cells

Promotor	Drugi promotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
Dr hab. Ewa Augustin, prof. uczelni	
Promotor pomocniczy	Kopromotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>





OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: mgr inż. Joanna Pilch

Ja, niżej podpisana, nie wyrażam zgody na bezpłatne korzystanie z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

Odpowiedź komórkowa indukowana przez niesymetryczne bisakrydyny skoniugowane z nanocząstkami w komórkach ludzkich raków okrężnicy i płuc do celów naukowych lub dydaktycznych.¹

Gdańsk, dnia.....

.....

podpis doktoranta

Świadoma odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. z 2006 r., nr 90, poz. 631) i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2012 r., poz. 572 z późn. zm.),² a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem dr hab. Ewą Augustin, prof. uczelni.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami zgodnie z art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia.....

.....

podpis doktoranta

Ja, niżej podpisana, wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej, Pomorskiej Bibliotece Cyfrowej oraz poddawania jej procesom weryfikacji i ochrony przed przywłaszczeniem jej autorstwa.

Gdańsk, dnia.....

.....

podpis doktoranta

¹ Zarządzenie Rektora Politechniki Gdańskiej nr 34/2009 z 9 listopada 2009 r., załącznik nr 8 do instrukcji archiwalnej PG.

² Ustawa z dnia 27 lipca 2005 r. Prawo o szkolnictwie wyższym: Rozdział 7 Odpowiedzialność dyscyplinarna doktorantów, Art. 226.







OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: mgr inż. Joanna Pilch

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: *Odpowiedź komórkowa indukowana przez niesymetryczne bisakrydyny skoniugowane z nanocząstkami w komórkach ludzkich raków okrężnicy i płuc*

Tytuł rozprawy w języku angielskim: *The cellular response induced by unsymmetrical bisacridines conjugated with nanoparticles in human lung and colon cancer cells*

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: dr hab. Ewa Augustin, prof. uczelni

Data obrony:

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: niesymetryczne bisakrydyny, nanocząstki, kropki kwantowe, nowotwór płuc i okrężnicy, wnikanie, aktywność cytotoksyczna, odpowiedź komórkowa

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: unsymmetrical bisacridines, nanoparticles, quantum dots, lung and colon cancer cells, cellular uptake, cytotoxic activity, cellular response

Streszczenie rozprawy w języku polskim: Pomimo znaczącego postępu w terapii nowotworów, wciąż pozostają one drugą przyczyną umieralności na świecie. Związane jest to przede wszystkim z brakiem istotnych różnic pomiędzy komórkami nowotworowymi a prawidłowymi, co przekłada się na problemy z terapią. Ponadto, chemioterapia często związana jest z dystrybucją silnie toksycznych związków, w dawkach które mogą powodować niespecyficzne działanie leku. W celu podniesienia specyficzności oraz selektywności chemioterapeutyków względem komórek nowotworowych poszukiwane są nowe metody ich dostarczania do komórek guza.

W niniejszej pracy doktorskiej zbadalam wpływ skoniugowania pochodnych niesymetrycznych bisakrydyn (UAs) z nanocząstkami (m. in. kropkami kwantowymi, QDs) na ich cytotoksyczność oraz odpowiedź biologiczną, jaką indukują w komórkach nowotworu płuc oraz jelita grubego. Wykazałam, że skoniugowanie UAs z QDs (QDs-UAs) zwiększa aktywność cytotoksyczną tych związków wobec komórek nowotworu płuc, jednocześnie chroniąc komórki prawidłowe przed toksycznym działaniem związku. Zastosowanie QDs jako platform transportujących leki pozwoliło na dostarczenie większej ilości związku do komórek. Ponadto, skoniugowanie UAs z QDs nie zmieniło znacząco rodzaju indukowanej odpowiedzi biologicznej, jednakże wpłynęło na jej poziom. Nieskoniugowane QDs nie były cytotoksyczne oraz nie indukowały istotnych zmian w komórkach badanych linii.

Streszczenie rozprawy w języku angielskim: Although significant advances have been made in cancer treatment, it remains the second leading cause of death globally. This is mainly due to the lack of significant differences between cancer and normal cells. Moreover, classical chemotherapy is often associated with the distribution of highly toxic effects, at dosages that may cause non-specific drug effects. To reduce the side effects





and increase the specificity and the selectivity of chemotherapeutics to cancer cells, new methods of their delivery to tumors are being sought.

In the present thesis, I have investigated the influence of unsymmetrical bisacridines (UAs) conjugation with nanoparticles (e.g. quantum dots, QDs) on their cytotoxicity and cellular response against lung and colon cancer cells. I have demonstrated that the conjugation of UAs with QDs (QDs-UAs conjugates) has improved the cytotoxic activity of these drugs, especially in lung cancer cells, having a protective effect on normal cells at the same time. The application of QDs as drug delivery platforms has increased the drug amount in the cells. Furthermore, the conjugation of UAs with QDs has not changed the mechanism of action of UAs significantly, however, it can affect the level of this response. Non-conjugated QDs were non-toxic and did not induce a significant cellular response in the investigated cells.

Ta praca nie mogłaby powstać bez wsparcia i pomocy wielu osób, którym w tym miejscu pragnę złożyć wyrazy mojej wdzięczności.

Mojemu Promotorowi, Pani Profesor Ewie Augustin, za możliwość rozwoju naukowego, merytoryczne ukierunkowanie niniejszej pracy oraz za zaufanie, cierpliwość, a także przekazaną wiedzę i doświadczenie.

Pani Profesor Zofii Mazerskiej, za wszelkie cenne rady oraz życzliwość i wsparcie naukowe.

Profesor Annie Nowickiej, za możliwość pracy z koniugatami nanocząstek, a także za cenne rady.

Agnieszce Potędze oraz Asi Frąckowiak, za liczne dyskusje naukowe, rzeczowe uwagi oraz przekazany zapał do pracy. Za nieocenione wsparcie naukowe i duchowe.

Magdzie Pajor oraz Kasi Greckiej, za liczne cenne dyskusje naukowe, za to, że zawsze mogłam na nie liczyć, a także za przyjaźń.

Koleżankom i Koledze z Zespołu: Ewie Paluszkiewicz, Michałowi Kosno, Joli Kuleszy oraz Monice Pawłowskiej, za miłą atmosferę pracy, pomoc laboratoryjną oraz liczne cenne dyskusje naukowe.

Rodzicom, za niegasnącą wiarę we mnie i wpojone wartości oraz siostrze, za pomoc w wyborze drogi zawodowej.





NARODOWE CENTRUM NAUKI

Niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach projektu OPUS 12 nr DEC-2016/23/B/NZ7/03324: *Odpowiedź biologiczna indukowana przez niesymetryczne bisakrydyny o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej w komórkach ludzkiego raka okrężnicy i płuc, wzmocniona przez dostarczanie tych związków w postaci koniugatów z nanocząstkami*, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki





STRESZCZENIE

Choroby nowotworowe są drugą, po chorobach układu krążenia, przyczyną umieralności na świecie. Pomimo znaczącego postępu zarówno naukowego, jak i technologicznego, skuteczne metody leczenia nowotworów są wciąż ograniczone. Związane jest to głównie z brakiem istotnych różnic pomiędzy komórkami nowotworowymi a prawidłowymi. Chemioterapia często wywołuje wiele efektów ubocznych, które mogą powodować niespecyficzne działanie leku. W celu obniżenia działań niepożądanych oraz podniesienia specyficzności chemioterapeutyków względem komórek nowotworowych poszukiwane są nowe metody ich dostarczania do komórek guza. Jedną z nich jest zastosowanie nanocząstek (ang. Nanoparticles, NPs) m. in. kropek kwantowych (ang. Quantum Dots, QDs) jako platform transportujących.

Najnowszą grupą związków otrzymanych w Zespole Chemii i Biochemii Związków Przeciwnowotworowych na Politechnice Gdańskiej są pochodne niesymetrycznych bisakrydyn (ang. unsymmetrical bisacridines, UAs). Charakteryzują się one wysoką aktywnością cytotoksyczną *in vitro* i przeciwnowotworową *in vivo*, głównie wobec ludzkiego raka trzustki, okrężnicy i płuc. Badane pochodne UAs (C-2028 oraz C-2045) zostały skoniugowane z dwoma rodzajami QDs: QD_{zielonymi} i QD_{czerwonymi}.

Celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej, było określenie wpływu skoniugowania UAs z nanocząstkami na cytotoksyczność oraz odpowiedź biologiczną, jaką indukują w komórkach nowotworowych (linii H460 i HCT116) oraz prawidłowych (linii MRC-5 i CCD 841 CoN) płuc i jelita grubego.

Wykazałam, że skoniugowanie UAs z QDs (QDs-UAs) zwiększyło aktywność cytotoksyczną badanych związków, głównie wobec komórek nowotworu płuc (linii H460), jednocześnie wykazując działanie ochronne wobec komórek prawidłowych (linii MRC-5 oraz CCD 841 CoN). W kolejnym etapie zbadalam kinetykę oraz mechanizm wnikania koniugatów QDs-UAs do badanych komórek. QDs-UAs (w szczególności QDs-C-2028) wnikały do komórek znacznie efektywniej niż UAs w ich wolnej postaci, głównie w przypadku linii H460, gdzie wraz z wydłużającym się czasem inkubacji wzrastała ich akumulacja w komórkach. QD_{zielone}-C-2028 wnikały do komórek badanych linii poprzez różne szlaki endocytozy. Proces ten, był najefektywniejszy w przypadku komórek linii H460 i obejmował trzy różne szlaki: makropinocytozę (1), endocytozę zależną od klatryn (2) oraz kaweolin (3). Badane koniugaty, jak i nieskoniugowane UAs, po ich wnikięciu do komórki, lokalizowały się wewnątrz lizosomów, we wszystkich badanych liniach komórkowych. W lizosomach zaś, panuje odpowiednio niskie pH do uwalniania UAs z koniugatów QDs-UAs. QDs-UAs, szczególnie w komórkach nowotworowej linii H460, indukowały wyraźny przyrost wielkości i ilości kwaśnych organelli, który był niezależny od procesu autofagii. Stwarzało to optymalne warunki do uwalniania się UAs z koniugatów QDs-UAs. W przypadku prawidłowych komórek linii MRC-5 oraz CCD 841 CoN, w których pH jest wyższe, UAs uwalniały się w mniejszym stopniu z QDs-UAs, co związane było z obniżeniem toksyczności związku, względem UAs w ich wolnej postaci.

Ostatnim obszarem moich badań było określenie wpływu skoniugowania UAs z QDs na dystrybucję komórek w cyklu życiowym oraz odpowiedź biologiczną indukowaną w komórkach



raków płuc i jelita grubego. UAs oraz ich koniugaty z QDs indukowały wyraźne zmiany w progresji komórek nowotworowych (linii H460 oraz HCT116) w cyklu życiowym (przejściowa akumulacja w fazie G1 i G2/M, obecność frakcji sub-G1). W komórkach prawidłowych (linii MRC-5 oraz CCD 841 CoN) zmiany te przebiegały z mniejszą intensywnością, przybliżając je w „stronę” rozkładu poszczególnych faz komórek kontrolnych (nieotraktowanych badanym związkiem). Przeprowadzone badania cytometryczne (test Aneksyna V/PI oraz oznaczanie zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$) wykazały, że nieskoniugowane UAs (szczególnie C-2028) indukują apoptozę w wyższym stopniu niż ich koniugaty z QDs. Obniżenie ilości komórek linii H460, ulegających śmierci komórkowej na drodze apoptozy, mogło być związane z indukcją przyspieszonego starzenia komórkowego. Ponadto, wykazałam, że zarówno UAs, jak ich koniugaty z QDs nie indukowały wyraźnego wzrostu reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) w komórkach linii H460 oraz HCT116.

Podsumowując, wyniki przedstawionych przeze mnie badań wskazują na wysoki potencjał zastosowania kropek kwantowych (QDs) jako platform transportujących leki. Są one nietoksyczne, co potwierdziły badania *in vitro* jak i *in vivo*. Skoniugowanie niesymetrycznych bisakrydyn z QDs z kolei, zwiększa ich aktywność cytotoksyczną w komórkach nowotworowych, natomiast osłabia w komórkach prawidłowych. Ponadto, wykorzystanie QDs jako platform transportujących UAs, pozwala na dostarczenie większej ilości związków do komórek. QDs są również podatne na modyfikacje fizykochemiczne, dzięki którym można regulować proces ich wnikania do komórek czy transport wewnątrzkomórkowy.

ABSTRACT

Cancer is the second cause of mortality in the world, after cardiovascular diseases. Despite the notable scientific and technological progress, effective methods of cancer therapy are still limited. This is mainly due to the lack of significant differences between cancer and normal cells. Chemotherapy often causes many side effects that may cause non-specific drug action. New methods of drug-delivering to tumor cells are sought to reduce side effects and increase the specificity of chemotherapeutic agents for cancer cells. One of these methods is the application of nanoparticles (NPs), e.g. Quantum Dots (QDs) as transport platforms.

Unsymmetrical bisacridines (UAs), synthesized in the Group of Chemistry and Biochemistry of Anticancer Compounds at Gdańsk University of Technology, are a new class of compounds that exhibited high cytotoxic and antitumor activity, preferentially against human pancreatic, colon, and lung cancer. The studied derivatives of UAs (C-2028 and C-2045) were conjugated with two types of QDs: QD_{green} and QD_{red}. The research presented in this dissertation aimed to investigate whether the application of nanoparticles as delivering UAs to cancer cells influences cytotoxicity and the biological response of lung H460 and colon HCT116 cancer cells, as well as normal MRC-5 and CCD 841 CoN cells.

The presented results showed that the conjugation of UAs with QDs (QDs-UAs conjugates) improved the cytotoxic activity of these drugs, especially in cancer H460 cells, and led to a protective effect on normal MRC-5 and CCD 841 CoN cells. Furthermore, I have examined the cellular uptake kinetics and the mechanism of internalization of QDs-UAs conjugates into cells. The results of the presented research indicate that QDs-UAs, enhancing the amount of drug in the cells (compared to UAs alone), especially in the case of QDs-C-2028 in human lung H460 cells. In these cells, more QDs-UAs conjugates were accumulated following prolonged incubation time. The study of cellular internalization mechanism indicated that QD_{green}-C-2028 conjugate was the most effective for H460 cells and included three endocytosis pathways: macropinocytosis (1), clathrin- (2), and caveolin-mediated endocytosis (3). After the cellular internalization, QDs-UAs conjugates and UAs alone, were localized in lysosomes in all of the tested cell lines. The pH value in the lysosomes promotes the greater release of UAs from the QDs-UAs conjugates. QDs-UAs conjugates, especially in H460 cells, increased the number and size of acid organelles (that was independent of the autophagy process), which can affect the release of the UAs from the conjugates. In the case of normal cells (MRC-5 and CCD 841 CoN cell lines), where the pH value is higher, the release of UAs from QDs-UAs was weaker, which was associated with lower toxicity of the compound, compared to UAs alone. Finally, the last goal of my research was to determine the effect of conjugate UAs with QDs on the cell cycle distribution and biological response induced in lung and colon cancer cells. UAs and their conjugates with QDs induced significant changes in the cell cycle progression of cancer cells (H460 and HCT116 lines; accumulation of the cells in G1 and G2/M phases, presence of the sub-G1 fraction). These changes were less intense in normal cells (MRC-5 and CCD 841 CoN lines), compared to UAs alone, bring them closer to the cell cycle distribution of control cells (untreated cells). The flow cytometric studies (Annexin V/PI staining and changes in mitochondrial membrane potential



($\Delta\Psi_m$) showed that UAs alone (especially C-2028) induced apoptosis to a greater extent than their conjugates with QDs. The reduction in the number of H460 cells undergoing cell death by apoptosis could be related to the induction of cellular senescence. Moreover, the results of the remaining studies indicated that both UAs and their conjugates did not induce a significant increase in the generated reactive oxygen species (ROS) in H460 and HCT116 cells.

Overall, the results of my research present high potential for the use of Quantum Dots (QDs) as drug delivery carriers. They are non-toxic, which was confirmed by *in vitro* and *in vivo* tests. In turn, the conjugation of unsymmetrical bisacridines with QDs increases their cytotoxic activity in cancer cells and decreases them in normal cells. In addition, the use of QDs as UAs delivery carriers allows more compounds to be delivered to cells. Modifications of physiochemical properties of QDs allow regulating the process of their penetration into cells or intracellular transport.

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów i oznaczeń	18
1. Wstęp i cel badań.....	19
1.1. Badane związki przeciwnowotworowe	19
1.2. Nowotwór płuc i jelita grubego – ogólna charakterystyka	20
1.2.1. Nowotwór płuc	20
1.2.2. Nowotwór jelita grubego	21
1.3. Cel i zakres badań.....	21
2. Część teoretyczna.....	23
2.1. Nanocząstki	23
2.1.1. Wybrane typy nanocząstek posiadających zastosowanie w biomedycynie	24
2.1.1.1. Kropki kwantowe	24
2.1.1.2. Złote nanocząstki.....	25
2.1.1.3. Nanocząstki magnetyczne.....	26
2.1.1.4. Dendrymery	27
2.1.1.5. Micele	28
2.1.1.6. Liposomy	28
2.1.2. Strategie projektowania i optymalizacji syntezy nietoksycznych nanocząstek	29
2.1.3. Wnikanie nanocząstek do komórek	31
2.1.3.1. Fagocytoza	32
2.1.3.2. Makropinocytoza	32
2.1.3.3. Endocytoza zależna od kaweolin	32
2.1.3.4. Endocytoza zależna od klatryn.....	33
2.1.3.5. Endocytoza niezależna od klatryn/kaweolin	34
2.1.4. Wpływ właściwości fizykochemicznych nanocząstek na proces wnikania do komórek	34
2.1.4.1. Rozmiar	34
2.1.4.2. Kształt	35
2.1.4.3. Ładunek powierzchniowy	36
2.1.4.4. Modyfikacja powierzchni.....	36
2.1.5. Wewnątrzkomórkowa degradacja NPs i ich wpływ na toksyczność w komórkach	37
2.1.6. Zdolność NPs do generowania reaktywnych form tlenu	38
2.1.6.1. Wpływ właściwości NPs na generowanie ROS.....	38
2.1.6.2. Wpływ interakcji NPs z komponentami komórki na generowanie ROS	39
3. Omówienie przeprowadzonych badań.....	40
3.1. Określenie aktywności cytotoksycznej wolnych i skoniugowanych z nanocząstkami niesymetrycznych bisakrydyn metodą z wykorzystaniem barwnika MTT	40
3.1.1. Cytotoksyczność badanych niesymetrycznych bisakrydyn (UAs) w ich wolnej postaci	40

3.1.2.	Wpływ luminescencyjnych kropek kwantowych: QD _{zielonych} i QD _{czerwonych} na proliferację komórek.....	41
3.1.3.	Cytotoksyczność niesymetrycznych bisakrydyn zaadsorbowanych na powierzchni kropek kwantowych.....	42
3.1.4.	Cytotoksyczność niesymetrycznych bisakrydyn zaadsorbowanych na powierzchni magnetycznych nanocząstek.....	46
3.2.	Badanie procesu wnikania UAs, QDs i ich koniugatów do komórek nowotworowych i prawidłowych	49
3.2.1.	Badanie procesu wnikania kropek kwantowych, niesymetrycznych bisakrydyn w ich wolnej i skoniugowanej z nanocząstkami postaci do komórek nowotworowych i prawidłowych.....	49
3.2.2.	Określenie mechanizmu wnikania QDs-UAs do komórek nowotworowych i prawidłowych.....	60
3.3.	Wewnątrzkomórkowa lokalizacja QDs-UAs i ich uwalnianie w zależności od pH.....	63
3.4.	Zmiany w dystrybucji komórek nowotworowych oraz prawidłowych w cyklu życiowym pod wpływem niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z nanocząstkami	76
3.5.	Badanie zmian w budowie błony cytoplazmatycznej komórek ludzkich raków płuc i okrężnicy poddanych działaniu UAs, QDs oraz QDs-UAs	88
3.6.	Oznaczanie zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ w komórkach ludzkich raków płuc i okrężnicy traktowanych QDs, UAs oraz QDs-UAs.....	92
3.7.	Określenie zdolności niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z kropkami kwantowymi do indukowania procesu przyspieszonego starzenia w komórkach ludzkich raków okrężnicy i płuc.....	96
3.8.	Badanie zdolności niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z kropkami kwantowymi do nieodwracalnego zahamowania proliferacji w komórkach ludzkich raków i płuc.....	101
3.9.	Określenie zdolności niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z kropkami kwantowymi do generowania reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach ludzkich raków płuc i okrężnicy	105
3.10.	Określenie aktywności przeciwnowotworowej UAs, QD _{czerwonych} oraz QD _{czerwonych} -UAs <i>in vivo</i>	107
4.	Dyskusja	109
5.	Materiały i metody	117
5.1.	Materiały doświadczalne.....	117
5.1.1.	Badane związki przeciwnowotworowe.....	117
5.1.2.	Nanocząstki.....	117
5.1.2.1.	Luminescencyjne kropki kwantowe	117
5.1.2.2.	Nanocząstki magnetyczne	117
5.1.3.	Odczynniki chemiczne	118
5.1.4.	Bufory	118
5.1.5.	Barwniki.....	118
5.1.6.	Enzymy	118
5.1.7.	Zestawy analityczne.....	119
5.1.8.	Roztwory i bufory do elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących	119
5.1.9.	Przeciwciała, bufory i inne materiały stosowane do techniki Western blotting	119

5.1.10.	Linie komórkowe	120
5.1.11.	Materiały stosowane w hodowli komórkowej.....	120
5.1.12.	Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....	121
5.2.	Metodyka	121
5.2.1.	Hodowla nowotworowych i prawidłowych komórek.....	121
5.2.2.	Badanie aktywności cytotoksyczności z wykorzystaniem metody MTT	122
5.2.3.	Badanie procesu wnikania QDs, UAs oraz QDs-UAs w nowotworowych i prawidłowych liniach komórkowych.....	122
5.2.4.	Określenie mechanizmu wnikania QDs-UAs do komórek nowotworowych i prawidłowych	123
5.2.5.	Wewnątrzkomórkowa lokalizacja QDs-UAs	124
5.2.6.	Analiza dystrybucji komórek nowotworowych oraz prawidłowych w cyklu życiowym	124
5.2.7.	Badanie zmian w budowie błony cytoplazmatycznej komórek ludzkich raków płuc i okrężnicy poddanych działaniu: UAs, QDs oraz QDs-UAs	125
5.2.8.	Oznaczanie zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ w komórkach ludzkich raków płuc i okrężnicy poddanych działaniu: UAs, QDs oraz QDs-UAs	126
5.2.9.	Badanie procesu starzenia komórkowego w nowotworowych liniach komórkowych	126
5.2.10.	Analiza poziomu białek metodą Western blotting.....	127
5.2.10.1.	Przygotowanie lizatów komórkowych.....	127
5.2.10.2.	Elektroforeza SDS-PAGE	128
5.2.10.3.	Immunoblotting (immunobarwienie)	128
5.2.11.	Badanie zdolności niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z kropkami kwantowymi do nieodwracalnego zahamowania proliferacji w nowotworowych liniach komórkowych.....	128
5.2.12.	Określenie zdolności UAs, QDs oraz koniugatów QDs-UAs do generowania reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach ludzkich raków okrężnicy i płuc.....	129
5.2.13.	Określenie aktywności przeciwnowotworowej UAs, QD _{czerwonych} oraz QD _{czerwonych} -UAs <i>in vivo</i>	129
5.2.14.	Analiza statystyczna wyników	130
	Wykaz literatury	131
	Dorobek naukowy.....	138
	Suplement	140

WYKAZ SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

5-FU	- 5-fluorouracyl
ATCC	- ang. The American Type Culture Collection, Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych
AuNPs	- ang. gold nanoparticles, złote nanocząstki
AuNRs	- złote nanopręty
CavME	- ang. caveolin-mediated endocytosis, endocytoza zależna od kaweolin
CME	- ang. clathrin-mediated endocytosis, endocytoza zależnej od klatryn
CM-H ₂ DCFDA	- ester acetylowy dioctanu 5-(i-6)-chlorometylo-2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
DIC	- ang. differential interference contrast, różniczkowy kontrast interferencyjny
DOX	- dokсорubicyna
DTX	- docetaksel
ECM	- ang. extracellular matrix, macierz zewnątrzkomórkowa
EPR	- ang. enhanced permeability and retention, zwiększenie efektu przepuszczalności i retencji
FA	- ang. folic acid, kwas foliowy
FDA	- ang. US Food and Drug Administration, Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków
Fe ₃ O ₄ -RCOOH Np	- magnetyczne nanocząstki
GQDs	- grafenowe kropki kwantowe
IC ₅₀	- ang. half maximal inhibitory concentration, stężenie związku, przy którym proliferacja komórek w hodowli <i>in vitro</i> zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych
IC _{80/90}	- ang. 80/90% maximal inhibitory concentration, stężenie związku, przy którym proliferacja komórek w hodowli <i>in vitro</i> zostaje zahamowana w 80/90% w stosunku do komórek kontrolnych
IONPs	- ang. iron oxide NPs, nanocząstki tlenku żelaza
MP	- ang. macropinocytosis, makropinocytoza
MRI	- ang. magnetic resonance imaging, obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego
MTX	- metotreksat
NPs	- ang. nanoparticles, nanocząstki
NSCLC	- ang. non-small-cell lung cancer, niedrobnokomórkowy rak płuca
PEG	- ang. polyethylene glycol, glikol polietylenowy
PMs	- ang. polymeric micelles, micle polimerowe
PTX	- paklitaksel
QDs	- ang. quantum dots, kropki kwantowe
ROS	- ang. reactive oxygen species, reaktywne formy tlenu
Tf	- transferyna
UAs	- ang. unsymmetrical bisacridines, niesymetryczne bisakrydyny
WHO	- ang. World Health Organization, Światowa Organizacja Zdrowia
X-Gal	- 5-bromo-4-chloro-3-indolylo-β-D-galaktopiranozyd
ΔΨ _m	- spadek potencjału błonowego

1. WSTĘP I CEL BADAŃ

Pomimo postępu w terapii konwencjonalnej oraz wprowadzaniu nowych metod leczenia, choroby nowotworowe pozostają drugą, zaraz po chorobach układu krążenia, przyczyną umieralności na świecie. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) co roku na świecie z tego powodu umiera około 10 mln ludzi. Szacuje się, że jeden na sześć zgonów spowodowany jest przez nowotwór. Ta sama Organizacja szacuje, że do 2030 r. na raka będzie chorować około 22,2 mln ludzi na świecie, a największy wzrost zachorowalności będzie dotyczyć krajów rozwijających się. Nowotwory płuc, prostaty, jelita grubego oraz żołądka są najczęstszymi rodzajami nowotworów złośliwych u mężczyzn. Wśród kobiet natomiast, najwyższy wskaźnik zachorowalności dotyczy nowotworów piersi, jelita grubego, płuc oraz szyjki macicy.

Pomimo znaczącego postępu zarówno naukowego jak i technologicznego skuteczne metody leczenia nowotworów są wciąż ograniczone. Związane jest to przede wszystkim z brakiem istotnych różnic pomiędzy nowotworowymi a prawidłowymi komórkami, jak również zjawiskiem lekooporności (Senapati S., 2018). Chemioterapia często związana jest z dystrybucją silnie toksycznych związków, w dawkach które mogą powodować niespecyficzne działanie leku (Rafiei P., 2017). Ponadto, związki takie często charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w wodzie, niską dostępnością biologiczną czy też wysoką objętością biodystrybucji. W celu obniżenia działań niepożądanych oraz podniesienia specyficzności chemioterapeutyków względem komórek nowotworowych poszukiwane są nowe metody ich dostarczenia do komórek guza (Muhamad N., 2018).

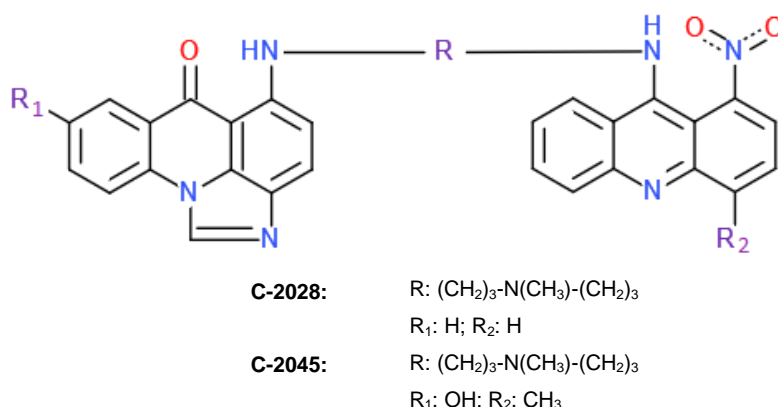
Nanotechnologia jest prężnie rozwijającą się dziedziną nauki. Nanomateriały definiowane są zazwyczaj jako materiały, których wielkość ziarna, w jednym lub kilku wymiarach, mieści się w granicy 1–100 nm (Maynard A. D., 2011). Dzięki zastosowaniu coraz doskonalszych metod badawczych powstają nowe rodzaje nanocząstek oraz metody aplikacyjne, w których mogą zostać wykorzystane. Coraz częściej wykorzystuje się je w medycynie m. in. jako sondy do obrazowania fluorescencyjnego czy platformy transportujące leki (Chan J. M., 2010; Saadat M., 2019). Dostarczenie chemioterapeutyków z wykorzystaniem nanocząstek (np. kropek kwantowych (Matysiak-Brynda E., 2018)), jako platform transportujących pozwala na uzyskanie wysokiego stężenia leku w tkankach objętych nowotworem, zwiększając jego działanie w miejscu docelowym, jednocześnie ograniczając działania niepożądane na niezmienną, prawidłową tkankę (Vandana M., 2010).

1.1. *Badane związki przeciwnowotworowe*

W Zespole Chemii i Biochemii Związków Przeciwnowotworowych na Politechnice Gdańskiej od wielu lat prowadzone są badania mające na celu znalezienie potencjalnego leku przeciwnowotworowego wśród pochodnych akrydyny. Do tej pory, zsyntezowano wiele związków o wysokiej aktywności cytotoksycznej. Jednym z nich jest Ledakrin® – pierwszy polski lek

przeciwnowotworowy, wprowadzony w 1974 r. do lecznictwa pod nazwą Nitracrine[®]. Znalazł on zastosowanie w terapii nowotworu płuc, piersi, okrężnicy oraz jajnika (Gniazdowski M., 1979). Niestety, ze względu na działania niepożądane oraz właściwości mutagenne został wycofany z lecznictwa (Piotrowska-Sowińska J., 1976). Kolejnym przedstawicielem jest pochodna imidazoakrydonu – Symadex[®], o symbolu roboczym C-1311. Wykazywała ona wysoką aktywność cytotoksyczną *in vitro* oraz przeciwnowotworową *in vivo* wobec nowotworów piersi oraz jelita grubego (Chołody W. M., 1996). Symadex[®], dotarł do II fazy badań klinicznych wśród chorych z przerzutowym rakiem piersi, opornym na terapię taksanem (Isambert N., 2010). Z kolei, pochodna 1-nitroakrydyny, której przedstawicielem jest związek C-1748, była kandydatem do I fazy badań klinicznych w leczeniu raka okrężnicy (Ashok B. T., 2006; Paluszkiewicz E., 2020).

Najnowszą klasą związków otrzymanych w Zespole są zaś pochodne niesymetrycznych bisakrydyn (UAs) (Rysunek 1.), które charakteryzują się wysoką aktywnością cytotoksyczną *in vitro* i przeciwnowotworową *in vivo* wobec wielu ludzkich nowotworów, w tym okrężnicy, płuc, piersi i trzustki (Paluszkiewicz E., 2020).



Rysunek 1. Struktura chemiczna badanych niesymetrycznych bisakrydyn

Związki te zostały opatentowane w Europie i USA (Konopa J., 2017; Konopa J., 2019). Na podstawie szeroko zakrojonych badań dotyczących ich aktywności cytotoksycznej i przeciwnowotworowej, w ramach niniejszej pracy doktorskiej wyselekcjonowano dwa związki: C-2028 i C-2045 oraz dwie, wrażliwe na ich działanie, nowotworowe linie komórkowe: płuc (H460) oraz okrężnicy (HCT116), a także odpowiadające im prawidłowe linie komórkowe, odpowiednio: MRC-5 oraz CCD 841 CoN.

1.2. Nowotwór płuc i jelita grubego – ogólna charakterystyka

1.2.1. Nowotwór płuc

Rak płuc jest najczęstszym rodzajem nowotworu złośliwego w Polsce i na świecie. Pod względem umieralności zajmuje on pierwsze miejsce wśród mężczyzn i drugie, po nowotworze piersi, wśród kobiet (Oser M. G., 2015). Głównymi przyczynami nowotworu płuc są: palenie tytoniu (zarówno czynne jak i bierne), a także nadmierna ekspozycja na działanie czynników, takich jak: aromatyczne węglowodory, azbest czy zanieczyszczenia powietrza

(World Health Organization, 2014). Szacuje się, że palenie papierosów jest przyczyną około 90% zgonów na nowotwór płuc (Wang G. Z., 2015).

WHO klasyfikuje pod względem histologicznym dwa główne typy nowotworu płuc: drobnokomórkowy rak płuca (ang. small-cell lung cancer, SCLC), który stanowi około 15% wszystkich przypadków zachorowań oraz niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. non-small-cell lung cancer, NSCLC) – około 85%. Z kolei, spośród NSCLS wyróżnić dalej można: rak płaskonabłonkowy, gruczolakorak i rak wielkokomórkowy. U osób palących z nowotworem płuc obserwuje się około 10-krotnie więcej mutacji niż u osób niepalących. Najczęstszymi mutacjami, u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym, są mutacje w genach: *SOX2*, *TP63*, *DDR2* i *FGFR1* (Erdem J. S., 2016). Mutacje genów *EGFR* i *KRAS* zaś, są typowe u osób z gruczolakorakiem (Sholl L. M., 2015). Z kolei, większość drobnokomórkowych raków płuca związanych jest z mutacją w genach *TP53* i *RB1* (Meuwissen R., 2003).

1.2.2. Nowotwór jelita grubego

Nowotwór jelita grubego jest trzecim, pod względem zachorowalności (zaraz po raku płuc i piersi) i czwartym pod względem umieralności (po raku płuc, wątroby i żołądka) nowotworem na świecie (World Health Organization, 2014). Do głównych przyczyn zachorowalności na nowotwór jelita zaliczyć można: złą dietę, otyłość oraz brak aktywności fizycznej.

Pod względem histopatologicznym WHO klasyfikuje nowotwór jelita grubego na: gruczolakorak (ang. adenocarcinoma), rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (ang. adenosquamous carcinoma), rak wrzecionowatokomórkowy (ang. spindle cell carcinoma), rak płaskonabłonkowy (ang. squamous cell carcinoma) oraz rak niezróżnicowany (ang. undifferentiated carcinoma). Większość nowo zdiagnozowanych pacjentów (70–80%) z nowotworem jelita grubego poddanych jest resekcji jelita – wycięciu guza z marginesem zdrowych tkanek (pozostałe 20–30% przypadków stanowią guzy nieresekcyjne). Po resekcji, pacjenci w trzecim stadium raka jelita grubego, w ramach standardowej praktyki klinicznej, poddawani są następnie chemioterapii (Gustavsson B., 2015).

1.3. Cel i zakres badań

Biorąc pod uwagę powyższe aspekty, celem moich badań było określenie wpływu skoniugowania wybranych niesymetrycznych bisakrydyn (C-2028 oraz C-2045) z nanocząstkami na cytotoksyczność oraz odpowiedź biologiczną w komórkach raków płuc i jelita grubego (I) oraz weryfikacja hipotezy (II), że dostarczenie skoniugowanych związków z zastosowaniem nanocząstek jako platform transportujących, może zwiększyć stężenie chemioterapeutyków w komórkach nowotworowych, jednocześnie ograniczając działania niepożądane wobec komórek prawidłowych.

Dla realizacji powyższych celów, zakres moich badań obejmował:

- I. określenie aktywności cytotoksycznej niesymetrycznych bisakrydyn (C-2028 oraz C-2045) w ich wolnej jak i skoniugowanej z nanocząstkami postaci

w komórkach ludzkich raków płuc (H460) i okrężnicy (HCT116) oraz w odpowiadających im komórkach prawidłowych: MRC-5 i CCD 841 CoN.

- II. zbadanie procesu wnikania do komórek wszystkich badanych linii niesymetrycznych bisakrydyn (C-2028 oraz C-2045) w ich wolnej jak i skoniugowanej z nanocząstkami postaci.
- III. określenie typu odpowiedzi komórkowej (apoptoza, nekroza, starzenie komórkowe) indukowanej przez wymienione powyżej niesymetryczne bisakrydyny w postaci wolnej i skoniugowanej z nanocząstkami.

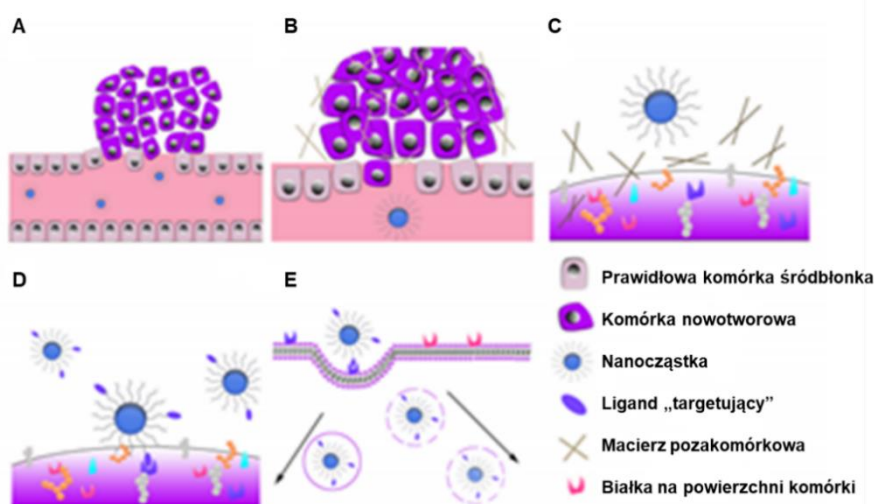
Podczas realizacji badań zastosowałam następujące metody badawcze:

1. Określenie aktywności cytotoksycznej, w oparciu o pomiar aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów z wykorzystaniem barwnika MTT.
2. Zbadanie mechanizmu i szybkości wnikania badanych związków do komórek nowotworowych i prawidłowych, dostarczanych z wykorzystaniem nanocząstek jako platform transportujących – mikroskopia konfokalna.
3. Zbadanie indukcji kwaśnych organelli z jednoczesną kolokalizacją badanych związków w komórce – mikroskopia konfokalna.
4. Zbadanie zmian w przebiegu cyklu życiowego w oparciu o określenie zawartości DNA w poszczególnych komórkach metodą cytometrii przepływowej.
5. Zbadanie końcowej odpowiedzi biologicznej indukowanej przez badane UAs i ich koniugaty z kropkami kwantowymi (QDs):
 - apoptozy (obecność frakcji sub-G1, test Aneksyna V/PI, spadek potencjału mitochondrialnego – cytometria przepływową),
 - procesu przyspieszonego starzenia komórkowego (badanie zmian w ekspresji SA- β -galaktozydazy będącej markerem procesu starzenia komórkowego – mikroskopia świetlna),
6. Zbadanie metodą Western blotting poziomu wybranych białek (beklina-1, LC3 oraz p21) w komórkach badanych linii.
7. Określenie zdolności UAs skoniugowanych z QDs do nieodwracalnego zahamowania proliferacji komórek nowotworowych – test colony forming.
8. Zbadanie zdolności do generowania reaktywnych form tlenu (ROS) przez UAs i ich koniugaty z QDs – cytometria przepływową.

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Nanocząstki

Nanocząstki (NPs) dzięki swoim unikalnym właściwościom takim jak: wielkość, rozmiar czy zdolność do modyfikacji ich powierzchni np. poprzez skoniugowanie z różnymi ligandami, stanowią swoiste rusztowanie do projektowania i zastosowania ich w wielu dziedzinach nauki. Właściwości te są coraz częściej wykorzystywane w poszukiwaniu efektywnej terapii celowanej, w której dąży się do uzyskania wysokiego stężenia leku w tkankach nowotworowych, przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych na niezmienną, prawidłową tkankę (Vandana M., 2010).

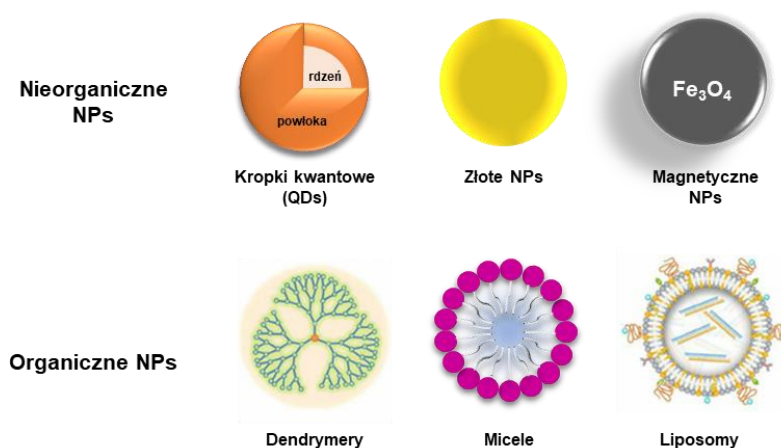


Rysunek 2. Różne bariery *in vivo*, jakie musi pokonać nanocząstka w drodze do swojego celu molekularnego, na podstawie (Pearson R. M., 2014)

Pożądanym jest, aby nanocząstki jako platformy transportujące po ich wniknięciu do komórek, dostarczały chemioterapeutyki do swoich celów molekularnych np. jądra komórkowego. Wnikanie NPs i ich koniugatów z chemioterapeutykami, może jednak wywoływać niepożądane efekty takie jak cytotoksyczność czy zmiana odpowiedzi biologicznej, względem nieskoniugowanego chemioterapeutyku (Mao Z., 2013; Verdera H. C., 2017). Przy projektowaniu efektywnego systemu wykorzystującego NPs, niezbędne jest zatem zrozumienie interakcji pomiędzy NPs a mikrośrodowiskiem na każdym z etapów dostarczania chemioterapeutyków. Nanocząstki, począwszy od ich iniekcji kończąc na dotarciu do celu molekularnego w ludzkim organizmie, muszą pokonać szereg barier *in vivo* (Rysunek 2.). W celu „osiągnięcia sukcesu” terapeutycznego NPs w pierwszym etapie muszą „przetrzeć” w krwioobieg (A), a następnie dotrzeć do zmienionej chorobotwórczo tkanki i przedyfundować przez macierz zewnątrzkomórkową (B) (ang. extracellular matrix, ECM). W kolejnym etapie nanocząstki muszą wejść w interakcję z błoną komórkową i wniknąć do komórki docelowej (C-D), po czym dotrzeć do swojego celu molekularnego (E) wewnątrz komórki (Pearson R. M., 2014).

2.1.1. Wybrane typy nanocząstek posiadających zastosowanie w biomedycynie

Ze względu na budowę nanocząstek można je ogólnie podzielić na dwie grupy: nieorganiczne i organiczne (Rysunek 3.). Do nieorganicznych NPs można zaliczyć kropki kwantowe, magnetyczne NPs, a także te zbudowane z metali i tlenków metali (Dayem A. A., 2017). Wśród organicznych NPs wyróżnić dalej można: dendrymery, liposomy oraz micelle. Poniżej scharakteryzowałam najpopularniejsze typy nanocząstek, posiadających duży potencjał aplikacyjny w biomedycynie: kropki kwantowe, złote i magnetyczne NPs, a także dendrymery, micelle i liposomy. Nanocząstki te mogą przenosić związki terapeutyczne m. in.: chemioterapeutyki, geny, przeciwciała czy białka, które mogą być połączone z NPs na różne sposoby np. poprzez ich zaadsorbowanie, rozpuszczenie, kapsułkowanie czy też kowalencyjne przyłączenie lub wiązanie elektrostatyczne (McCarthy D. J., 2014).



Rysunek 3. Typy najpopularniejszych organicznych i nieorganicznych nanocząstek (NPs) posiadających zastosowanie w biomedycynie

2.1.1.1. Kropki kwantowe

Kropki kwantowe (QDs), należą do grupy nanocząstek nieorganicznych, są półprzewodnikowymi kryształami o rozmiarach w skali nanometrowej (2–10 nm). Zbudowane są zazwyczaj z pierwiastków takich jak: srebro, kadm, rtęć, selen, tellur, ołów czy cynk. Charakteryzują się unikalnymi właściwościami optycznymi oraz elektronicznymi, odpornością na fotowybielanie, jak również szerokim widmem absorpcji do równoczesnego wzbudzenia wielu kolorów fluorescencyjnych (Matea C. T., 2017; Smith A. M., 2008; Dey N. S., 2011). Ze względu na skład i strukturę QDs można wyróżnić ich kilka typów: rdzeń, rdzeń – powłoka oraz „stopowy” (bimetaliczny) (Munasinghe E., 2019). Nanocząstki te, w zależności od wymagań aplikacyjnych, mogą być dalej modyfikowane np. poprzez pokrycie rdzenia organiczną powłoką, celem nadania jej np. hydrofobowej powierzchni. Podstawowym ograniczeniem zastosowań „tradycyjnych” QDs (zawierających jony metali ciężkich np.: CdSe QDs czy CdS QDs), w medycynie jest jednak ich potencjalna długoterminowa toksyczność. Mimo, iż stosowane metody pasywacji bądź też modyfikacji powierzchni takich QDs, obniżają ich toksyczność, projektowane są nowe rodzaje QDs (Ding C., 2016). QDs dzięki swoim unikalnym właściwościom znalazły szereg zastosowań,

w tym biomedycznych. Stanowią one bowiem swoiste rusztowanie do projektowania wielofunkcyjnych nanocząstek m. in. z funkcją obrazowania czy też transportowania chemioterapeutyków (Weissleder R., 2005).

Wcześniejsze badania naszego Zespołu koncentrowały się na porównaniu aktywności cytotoksycznej doksorubicyny (DOX) w jej wolnej jak i skoniugowanej z QDs (Ag–In–Zn–S) postaci (w różnych wariantach: QD, Tf–QD oraz apo–Tf–QD) wobec komórek nowotworu płuc (linii H460). Skoniugowanie DOX z QD–apo–Tf (QDs skoniugowanych z transferyną (Tf), której geny ulegają nadekspresji w wielu nowotworach, bez obecnych jonów żelaza (III)) pozwoliło na podwyższenie jej aktywności cytotoksycznej względem komórek badanej linii. Co więcej, sam nośnik nie wpływał na zahamowanie proliferacji komórek (Matysiak-Brynda E., 2018).

Badania prowadzone w zespole Bwatanglang'a miały na celu zwiększenie efektywności dostarczania 5-FU (5-Fluorouracylu) z wykorzystaniem nanocząstek (Mn:ZnS QDs) jako platform transportujących (Bwatanglang I. B., 2016). 5-FU został przyłączony do powierzchni kropek kwantowych (Mn:ZnS QDs), a następnie zakapsułkowany w polimerze chitozanu, który w kolejnym etapie skoniugowano z kwasem foliowym (FA). Wyniki badań *in vivo* wskazały, że zastosowanie badanego koniugatu (5-FU@FACS–Mn:ZnS) spowodowało zmniejszenie się guzów i liczby przerzutów w płucach mysz, w porównaniu do grupy tych zwierząt leczonych 5-FU w jego wolnej postaci. Co więcej, w badaniach *in vitro* wykazano, że koniugaty 5-FU@FACS–Mn:ZnS indukują apoptozę w komórkach nowotworu piersi MDA-MB231 w wyższym stopniu niż nieskoniugowany 5-FU.

Zespół X. Wang'a w swoich badaniach z kolei, zastosował grafenowe kropki kwantowe (GQDs) ze zmodyfikowanym ligandem (Wang X., 2014). W przeciwieństwie do półprzewodnikowych QDs, GQDs charakteryzują się niską toksycznością, dobrą biokompatybilnością oraz szerokim widmem wzbudzenia (Matea C. T., 2017). Nanocząstki opłaszczane kwasem foliowym (FA) skoniugowano z odpowiednim receptorem oraz DOX. GQDs, transportowały doksorubicynę do komórek nowotworowej linii HeLa. Ponadto, skoniugowanie DOX z GQD-FA miało wpływ na wydłużenie czasu jej uwalniania oraz akumulacji w komórkach. Badany koniugat DOX-GQD-FA charakteryzował się wyższą aktywnością cytotoksyczną, względem DOX w jej wolnej postaci, wobec komórek linii HeLa i jednocześnie słabszą – wobec komórek, nie będących jego celami molekularnymi.

2.1.1.2. Złote nanocząstki

Złote nanocząstki (ang. gold nanoparticles, AuNPs) należą do grupy nanocząstek nieorganicznych. Dzięki swoim unikalnym właściwościom optycznym, znalazły szereg zastosowań w biomedycynie takich jak: transportowanie leków i genów, w terapii nowotworów oraz w obrazowaniu biologicznym (Soenen S. J., 2011). Złote nanocząstki, w zależności od ich docelowego zastosowania, mogą różnić się wielkością, kształtem i strukturą. AuNPs w kształcie sfer o średnicy od kilku do 100 nm, znalazły zastosowanie w obrazowaniu oraz w zwiększeniu dawki promieniowania, jak również w transportowaniu chemioterapeutyków (Kong F.-Y., 2017). Złote nanopowłoki, z kolei są sferycznymi strukturami o średnicy 50–150 nm, które zbudowane

są z krzemionkowego rdzenia i otaczającej go metalicznej nanopowłoki ze złota. Ich właściwości optyczne mogą być modyfikowane poprzez zmianę średnicy rdzenia i grubości otaczającej go powłoki (Lee J., 2014). Złote nanopręty, kolejny rodzaj AuNPs, w swoim najdłuższym wymiarze posiadają średnicę wynoszącą 25–45 nm. Poprzez zmianę ładunku powierzchniowego oraz obecności różnych grup funkcyjnych na powierzchni tych nanocząstek, można manipulować efektywnością ich wnikania do komórki. Nanocząstki złota można modyfikować nie tylko poprzez modulowanie ich wielkości, kształtu i struktury, ale także poprzez powlekanie ich powierzchni np.: środkami powierzchniowo czynnymi lub polimerami (Soenen S. J., 2011). AuNPs są biokompatybilne i nietoksyczne (Kong F.-Y., 2017). Jednakże istnieją doniesienia, wskazujące, że bardzo małe nanocząstki złota, o średnicy poniżej 4–5 nm, mogą być potencjalnie toksyczne, ze względu na fakt, iż docierają do jądra komórkowego i wiążą się z DNA (Rivera G. P., 2010).

Zespół F. Wang'a w swoich badaniach przyłączył DOX do nanocząstek złota pokrytych glikolem polietylenowym poprzez linker wrażliwy na zmiany pH (Wang F., 2011). Ten typ połączenia dokсорubicyny do AuNPs pozwolił na wewnątrzkomórkowe uwolnienie DOX z koniugatu DOX-Hyd@AuNPs w kwaśnych organellach. Spowodowało to szybki wzrost jej wewnątrzkomórkowego stężenia, wzmacniając jednocześnie efekt terapeutyczny związku w lekoopornych komórkach nowotworowych MCF-7/ADR, w porównaniu do DOX w jej wolnej postaci.

AuNPs znalazły także zastosowanie w jako nośniki genów (Kong F.-Y., 2017). Koniugaty oligonukleotydów (i małym interferującym RNA) z AuNPs posiadają unikalne właściwości, które czynią je potencjalnymi wewnątrzkomórkowymi czynnikami regulującymi geny. AuNPs silnie funkcjonalizowane oligonukleotydami (połączone wiązaniami kowalencyjnymi), zdolne są do aktywacji genów i szlaków związanych z odpornością w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, ale nie w przypadku linii komórkowej z ograniczoną liczbą podziałów komórkowych (Kim E. Y., 2012). Odkrycia te stanowią istotną wartość dla zastosowania AuNPs modyfikowanych oligonukleotydami w rozwoju terapii i technologii dostarczania genów.

2.1.1.3. Nanocząstki magnetyczne

Nanocząstki magnetyczne (ang. magnetic nanoparticles) stanowią kolejną grupę nieorganicznych nanocząstek, które znalazły zastosowanie w biomedycynie, zwłaszcza w leczeniu i diagnozowaniu nowotworów, w obrazowaniu rezonansem magnetycznym (ang. magnetic resonance imaging, MRI) jak również jako platformy transportujące chemioterapeutyki (Hervault A., 2016). Najpopularniejszym przedstawicielem nanocząstek magnetycznych są nanocząstki tlenku żelaza (ang. iron oxide NPs, IONPs) w tym magnetyt (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) oraz nanocząstki ferrytów (Fe_2CoO_4) (Wu M., 2017). IONPs zazwyczaj są kulistymi cząstkami o średnicy 10–100 nm, charakteryzują się niską toksycznością oraz biokompatybilnością (Assa F., 2016). Jednakże wykazano, że zastosowanie bardzo małych nanocząstek tlenku żelaza może powodować lokalnie wysokie stężenie żelaza w komórkach (Soenen S. J., 2011), przez co jego usuwanie z organizmu może być utrudnione.

Ze względu na słabe uwalnianie leków z ich koniugatów z magnezytem (Fe_3O_4), jak również niską pojemność załadunku samego magnezytu lekiem, stosuje się wstępne powlekanie tych nanocząstek substancjami zapewniającymi ich stabilność, biodegradowalność i nietoksyczność m. in.: naturalnymi oraz syntetycznymi polimerami bądź lipidami. Polimerowe powłoki pozwalają na stworzenie większej ilości hydrofilowych nanostruktur, zapewniają różnorodność powierzchniowych grup funkcyjnych do wiązania się cząstek leku, hamują agregację nanocząstek jak również zwiększają ich stabilność (Assa F., 2016). Nanocząstki tlenku żelaza opłaszczone dekstranem, zostały zatwierdzone przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. US Food and Drug Administration, FDA) jako czynniki kontrastujące do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MRI) np. w detekcji nowotworów wątroby (Soenen S. J., 2011).

W badaniach przeprowadzonych w zespole Akiko Sato (Sato A., 2013) wykazano, że nieskoniugowane nanocząstki magnetyczne ($\text{MgNPs-Fe}_3\text{O}_4$) znacznie zwiększały produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach raka prostaty: Du-145, PC-3 oraz LNCaP, powodując oksydacyjne uszkodzenia DNA. Jednocześnie nie wpływały one znacząco na proliferację badanych komórek. Skoniugowanie badanego leku – docetakselu (DTX) z magnetycznymi nanocząstkami zaś, zwiększyło jego aktywność cytotoksyczną *in vitro* oraz powodowało tłumienie ekspresji genu *NFκB*, odpowiedzialnego m.in. za odpowiedź komórki na bodźce takie jak stres czy wolne rodniki.

2.1.1.4. Dendrymery

Dendrymery, należą do grupy nanocząstek organicznych, posiadają trójwymiarową, wysoce rozgałęzioną strukturę o charakterze kulistym. Zbudowane są z wielofunkcyjnego, centralnego rdzenia, od którego odchodzą powtarzalne, rozgałęziające jednostki, na końcu których znajdują się grupy funkcyjne (Zhu J., 2013). Unikalne właściwości dendrymerów m. in.: rozmiar w skali nanometrowej, „wąski” współczynnik polidispersyjności czy też wysoka dostępność grup funkcyjnych sprawiły, że znalazły one szereg zastosowań, w tym jako platformy transportujące chemioterapeutyki (Kesharwani P., 2014) i środki kontrastujące do MRI (Sharma A. K., 2017).

Cząsteczki leków mogą być (1) fizycznie uwięzione w dendrymerach, (2) skoniugowane poprzez wiązanie kowalencyjne bądź też (3) związane poprzez oddziaływania elektrostatyczne, wiązanie van der Waalsa lub wiązanie wodorowe na powierzchni tych NPs (Zhu J., 2013). Dendrymery jako nośniki leków, poprawiają ich rozpuszczalność i czas krążenia w krwioobiegu. Ułatwiają również bierne dostarczanie leków do komórek guza poprzez zwiększenie efektu przepuszczalności i retencji (ang. enhanced permeability and retention, EPR) (Sharma A. K., 2017). Wszystkie te cechy dendrymerów sprawiają, iż są idealnymi kandydatami do opracowywania systemów transportujących leki. Zespół J. F. Kukowskiej-Latallo (Kukowska-Latallo J. F., 2005) zsyntezował nośniki leków – dendrymery typu PAMAM (poliamidoaminowe) o średnicy <5 nm, skoniugowane z kwasem foliowym (FA) i metotreksatem (MTX) do celowanej terapii komórek nowotworowych. Na podstawie zdjęć z mikroskopu konfokalnego wykazali, że

nośniki leków <50 nm były w stanie przedostać się z układu naczyniowego poprzez efekt EPR i oddziaływać z komórkami nowotworowymi. Tym samym skoniugowanie MTX z badanymi nanocząstkami (nośnikami leków) pozwoliło na zwiększenie jego aktywności przeciwnowotworowej w docelowych komórkach, względem MTX w jego wolnej postaci.

2.1.1.5. *Micelle*

Kolejnym typem organicznych nanocząstek wykorzystywanych jako platformy transportujące chemioterapeutyki są micelle. Micelle są amfifilowymi, kulistymi cząstkami, zbudowanymi z hydrofobowego rdzenia i otaczającej go hydrofilowej otoczki (Husseini G. A., 2008). Najpopularniejszymi przedstawicielami miceli, wykorzystywanych jako nośniki leków są micelle polimerowe (ang. polymeric micelles, PMs), ze względu na ich unikalne właściwości fizykochemiczne, „zdolności” do wiązania i uwalniania leków, łatwą metodę syntezy, biokompatybilność oraz selektywność względem komórek nowotworowych (Zhou Q., 2018). Nanocząstki te, można łatwo modyfikować za pomocą grup funkcyjnych, wzmacniając tym samym ich biodostępność, czas cyrkulacji, specyficzność względem komórek nowotworowych oraz aktywność przeciwnowotworową. Hydrofobowe leki, transportowane przez PMs, są zazwyczaj „związane” w ich rdzeniu, jednak możliwe jest także ich przyłączenie do hydrofilowych polimerów korony PMs (Husseini G. A., 2008).

Obecnie trwają badania kliniczne, znajdujące się w różnych fazach, w których bada się wpływ skoniugowania najpopularniejszych leków przeciwnowotworowych (m. in.: dokсорubicyny, docetakselu, paklitakselu i cisplatyny) z micelami polimerowymi. Genexol®-PM (paklitaksel (PTX) załadowany w PM) znajduje się w IV fazie badań klinicznych (Zhou Q., 2018). Paklitaksel jest lekiem przeciwnowotworowym, stosowanym w terapii nowotworu piersi, jajników, płuc, głowy i szyi. Jest on jednak słabo rozpuszczalny w wodzie, a stosowanie go w wysokich dawkach powoduje neuropatię (chorobę nerwów obwodowych o podłożu neurologicznym) oraz neutropenię (obniżenie poniżej normy liczby neutrofilów we krwi obwodowej) (Tae-You K., 2004). W badaniach przedklinicznych wykazano, że Genexol®-PM pozwala na 3-krotne zwiększenie maksymalnej dawki tolerowanej oraz odpowiada za istotne podwyższenie aktywności przeciwnowotworowej, w stosunku do PTX w jego wolnej postaci (Zhou Q., 2018).

2.1.1.6. *Liposomy*

Liposomy stanowią kolejną grupę nanocząstek organicznych. Są małymi (od 30 nm do kilku μm), kulistymi pęcherzykami, zbudowanymi zazwyczaj z wodnego rdzenia oddzielonego dwuwarstwą lipidów naturalnych i/lub syntetycznych (Zabielska-Koczywās K., 2017). Dzięki swojej unikalnej budowie mogą transportować zarówno hydrofilowe (poprzez wodny rdzeń) jak i hydrofobowe (poprzez hydrofobową dwuwarstwą lipidową) związki. Ponadto, nanocząstki te są biokompatybilne i biodegradowalne. Zwiększają ilość dostarczanego leku do komórek guza, jednocześnie obniżając jego toksyczność względem komórek prawidłowych. Liposomy są jednymi z najczęściej badanych NPs jako nośników chemioterapeutyków w medycynie, głównie

ze względu na łatwość ich produkcji i modyfikacji struktury. Oprócz transportowania leków NPs te wykorzystywane są również do przenoszenia peptydów, genów oraz sond obrazujących (Mukherjee A., 2019).

Połowę leków, dostarczanych do terapii nowotworów dzięki szeroko pojętej nanotechnologii i zatwierdzonych do tej pory przez FDA, stanowią liposomalne preparaty związków cytotoksycznych. W postaci liposomalnej dostępne są m. in. daunorubicyna (Daunoxome) w terapii mięsaka Kaposiego (związanego z ludzkim wirusem niedoboru odporności HIV), doksorubicyna (Doxil oraz Myocet) w monoterapii mięsaka Kaposiego (związanego z HIV) oraz raka jajnika, jak również winkrystyna (Margibo) w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej oraz irynotekan (Onivyde) – w leczeniu raka trzustki z przerzutami (Szwed M., 2010; Zabielska-Koczywas K., 2017)

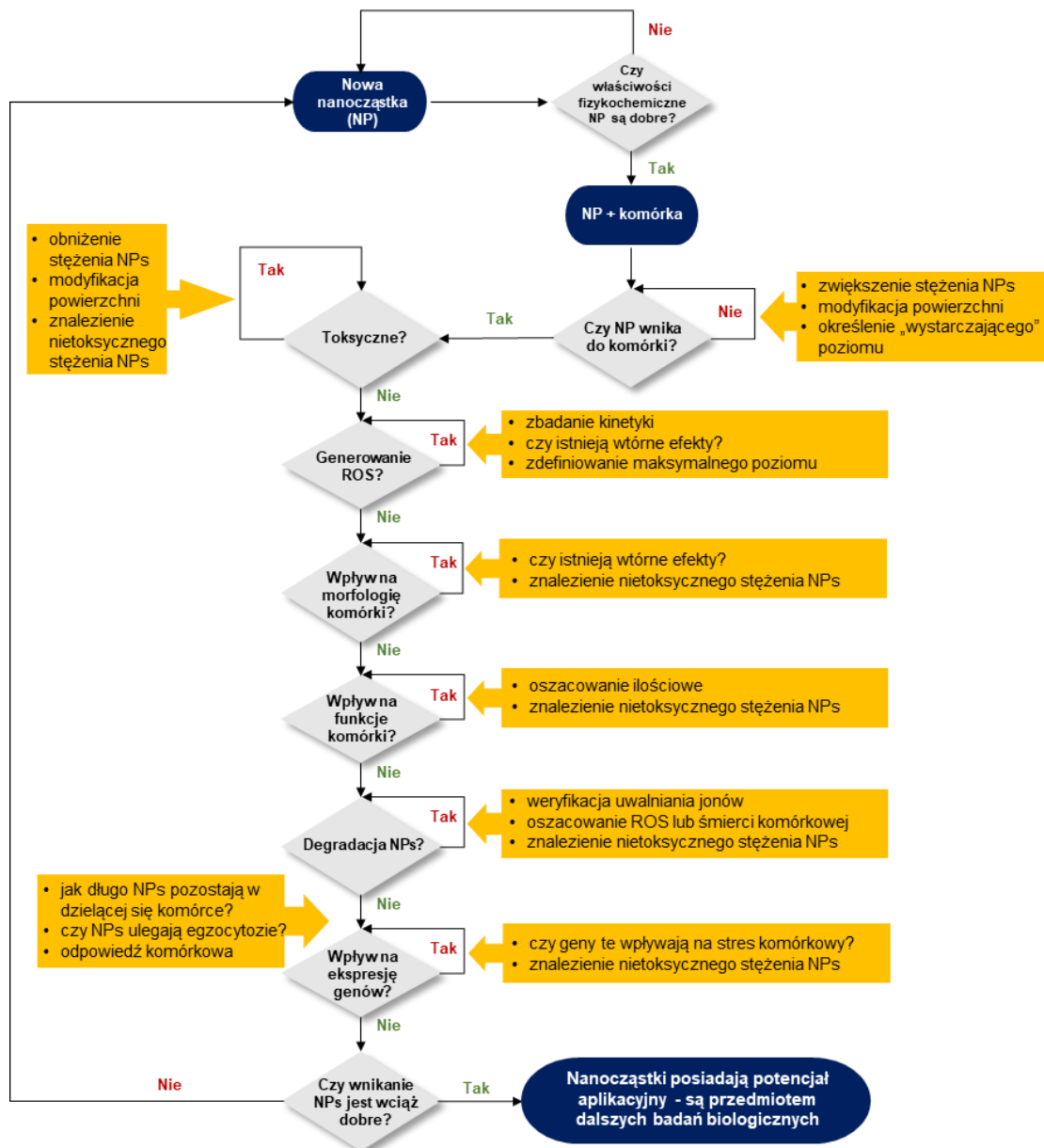
2.1.2. Strategie projektowania i optymalizacji syntezy nietoksycznych nanocząstek

Istnieje wiele konfiguracji badań dotyczących określenia cytotoksyczności nanocząstek w komórkach (Soenen S. J., 2011). Rysunek 4. przedstawia kluczowe aspekty, dotyczące obniżenia toksyczności NPs i efektów jakie wywołują w komórkach (np. zdolność do generowania reaktywnych form tlenu; ROS), rozpatrywane przy projektowaniu i optymalizacji ich syntezy. Przed przystąpieniem do badań biologicznych, w pierwszym etapie należy określić właściwości fizykochemiczne NPs w ich „suchej” formie oraz w roztworach fizjologicznych. Następnie należy wybrać komórki (najlepiej o różnej fizjologii, celem uzyskania reprezentatywnego wyniku), jakie zostaną wykorzystane do dalszych badań. W przypadku, gdy NPs wnikają efektywnie do komórek można określić ich aktywność cytotoksyczną. Jeśli nanocząstki okażą się toksyczne to można zmniejszać ich stężenie bądź też je modyfikować np. ich skład czy powierzchnię.

Toksyczność nanocząstek związana jest głównie z ich składem chemicznym, zwłaszcza w przypadku kropek kwantowych (QDs) zawierających jony metali ciężkich takich jak kadm czy rtęć (Matea C. T., 2017). Pożądane jest, aby NPs, które mają mieć potencjalne zastosowanie kliniczne, nie były cytotoksyczne. Nie jest to zawsze możliwe, dlatego też w celu obniżenia aktywności cytotoksycznej nanocząstek można modyfikować ich powierzchnię np. poprzez funkcjonalizację powierzchni QDs biokompatybilnymi molekułami takimi jak glikol polietylenowy (ang. polyethylene glycol, PEG). Ponadto, toksyczność samych NPs może być związana z właściwościami fizykochemicznymi ich powierzchni, które mogą wywoływać różną odpowiedź biologiczną w komórkach np. zdolność do generowania ROS (Raja G., 2020). Jak wykazano, nanocząstki SiO₂ NPs i ZnO NPs o tym samym rozmiarze i kształcie wykazywały różny stopień toksyczności (Dayem A. A., 2017). ZnO NPs charakteryzowały się wyższą aktywnością chemiczną niż SiO₂ NPs, czego konsekwencją było generowanie przez nie silniejszego stresu oksydacyjnego w komórce (poprzez produkcję anionorodnika ponadtlenu O₂⁻).

Po określeniu nietoksycznego stężenia NPs, w kolejnym etapie należy zbadać czy i jaką odpowiedź biologiczną indukują w komórkach. Do podstawowych badań należą: określenie zdolności NPs do generowania ROS oraz zmiany morfologii i funkcji pracy komórki. Ważne jest również określenie zdolności NPs do ich potencjalnej degradacji w komórkach. Niektóre małe

nanocząstki np. AuNPs (4–5 nm), mogą być potencjalnie toksyczne, ze względu na fakt, iż docierają do jądra komórkowego i wiążą się z DNA. Złoto jako elektroujemny metal, jest łatwo przyciągane do rowków DNA, w których panuje ujemnie naładowane środowisko. Ponadto, nanocząstki w rozmiarze około 1,4 nm mogą niemal dokładnie „wpasować się” do większych rowków DNA, co prowadzi do ich silnej, potencjalnej toksyczności w komórkach (Rivera G. P., 2010).



Rysunek 4. Schemat pracy przy projektowaniu i optymalizacji badań dotyczących toksyczności nanocząstek w komórkach, na podstawie (Soenen S. J., 2011)

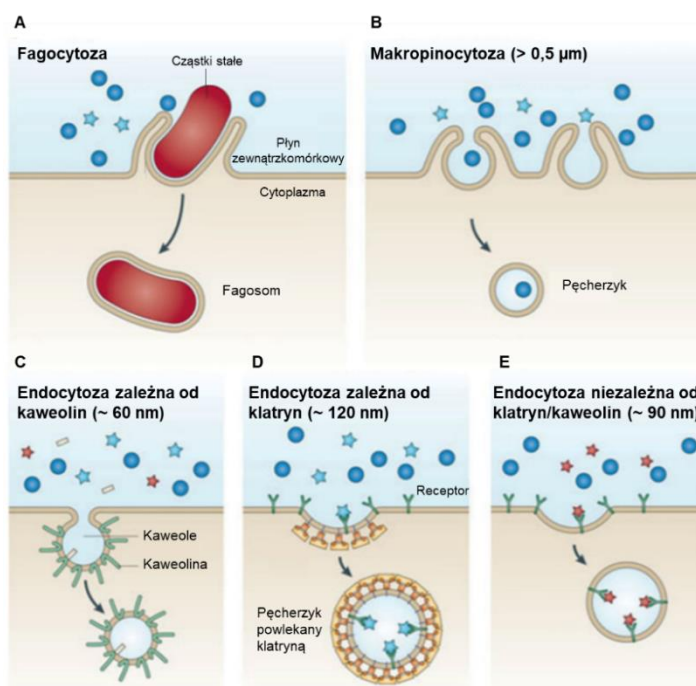
Nanocząstki, które będą wnikały efektywnie do komórek, a przy tym jednocześnie nie będą wobec nich toksyczne oraz nie będą wpływać na zmianę ich morfologii i odpowiedzi biologicznej, posiadają potencjał aplikacyjny do dalszych badań np. jako platform transportujących leki.

2.1.3. Wnikanie nanocząstek do komórek

Jedną z podstawowych funkcji błony komórkowej jest odizolowanie komórki od otaczającego ją środowiska. Całkowita izolacja komórki od otoczenia nie jest jednak możliwa, co pociąga za sobą konieczność ścisłej regulacji wymiany materii między komórką a jej otoczeniem. Proces wnikania jest jednym z najważniejszych procesów regulujących aktywność biologiczną molekuł, determinujących interakcje pomiędzy molekułami a błoną cytoplazmatyczną (Mosquera J., 2018).

Ogólnie, proces wymiany substancji w błonie komórkowej można podzielić na bierny i aktywny. Gazy (takie jak tlen czy dwutlenek węgla), hydrofobowe molekuły (np. benzen) czy molekuły nie posiadające ładunku (np. woda, etanol) dyfundują do komórki zgodnie z gradientem stężeń w sposób bierny (bez wykorzystania energii). Z kolei, aktywny transport zachodzi wbrew gradientowi stężeń (z wykorzystaniem energii) (Foroozandeh P., 2018).

Kiedy cząstki np. nanocząstki, które nie mogą wniknąć przez hydrofobową błonę komórkową na zasadzie transportu biernego, docierają do zewnętrznej strony błony komórkowej, mogą oddziaływać z komponentami błony bądź z macierzą zewnątrzkomórkową, po czym wnikają do komórki, głównie na drodze endocytozy (Behzadi S., 2017). Endocytoza prowadzi do pochłaniania NPs, prowadzących do powstawania pęcherzyków endocytarnych. Pęcherzyki te są następnie transportowane do wewnątrzkomórkowych przedziałów sortowania. W zależności od typu komórki, jak i białek, lipidów oraz innych molekuł zaangażowanych w ten proces, endocytoza może być podzielona na kilka rodzajów: fagocytozę, makropinocytozę, endocytozę zależną od kaweolin, endocytozę zależną od klatryn oraz endocytozę niezależną od klatryn/kaweolin (Oh N., 2014) (Rysunek 5.).



Rysunek 5. Mechanizmy wnikania NPs: (A) fagocytoza, (B) makropinocytoza, (C) endocytoza zależna od kaweolin, (D) endocytoza zależna od klatryn oraz (E) endocytoza niezależna od klatryn/kaweolin; na podstawie (Pearson R. M., 2014)

2.1.3.1. Fagocytoza

Proces wnikania cząstek na drodze fagocytozy (ang. phagocytosis) odbywa się głównie w komórkach do tego wyspecjalizowanych tj.: w makrofagach, monocytach czy neutrofilach, które odpowiedzialne są m. in. za obronę gospodarza oraz wchłanianie martwych komórek i ich szczątków. Cząstki większe niż 500–1000 nm wnikają do komórek głównie na drodze fagocytozy (Zhao J., 2018).

Fagocytoza NPs inicjowana jest zazwyczaj przez opsonizację – na powierzchni nanocząstek adsorbowane są opsoniny takie jak immunoglobuliny (np. przeciwciała) czy białka dopełniacza (Gustafson H. H., 2015). Opsonizacja NPs pozwala na ich rozpoznawanie przez fagocyty, poprzez specyficzne interakcje ligand–receptor. To z kolei, inicjuje kaskadę sygnalizacyjną, która może powodować tworzenie się na powierzchni komórki przedłużeń, po czym następuje pochłanianie i internalizacja cząstek, prowadząca do powstania fagosomu (Hillaireau H., 2009). W późniejszych fazach tego procesu dochodzi do fuzji fagosomu z lizosomem, a materiał w nich zawarty zostaje strawiony w kwaśnym pH (Foroozandeh P., 2018) przez enzymy hydrolityczne.

2.1.3.2. Makropinocytoza

Makropinocytoza (ang. macropinocytosis, MP) jest innym rodzajem szlaku endocytozy niezależnej od klatryn, która występuje w wielu komórkach, w tym w makrofagach (Hillaireau H., 2009). Ten niespecyficzny proces zachodzi spontanicznie bądź też może być indukowany przez czynniki wzrostu lub inne sygnały (Li Z., 2017), które po związaniu z receptorami, znajdującymi się w błonie komórkowej, inicjują kaskadę sygnalizacyjną, prowadzącą do polimeryzacji aktyny oraz silnego fałdowania błony (Zhao J., 2018). Komórka może pobierać do swojego wnętrza zewnątrzkomórkowy płyn wraz z jego zawartością, poprzez tworzące się podczas tego procesu wypustki błonowe, formując duże pęcherzyki tzw. makropinosomy (Lim J. P., 2011). Wielkość makropinosomów (0,5–10 μm) z kolei, czyni makropinocytozę dobrym portalem do wnikania wszystkich makromolekuł, znajdujących się w zewnątrzkomórkowym płynie, w tym cząstek takich jak: duże NPs (w μm , które nie mogą wniknąć do komórki poprzez inne szlaki), jak również niespecyficznych chorobotwórczych drobnoustrojów, ciałek apoptotycznych czy wirusów (Foroozandeh P., 2018).

2.1.3.3. Endocytoza zależna od kaweolin

W endocytozie zależnej od kaweolin (ang. caveolin-mediated endocytosis, CavME) proces wnikania molekuł zachodzi poprzez formowanie się kaweoli – 50–80 nm, wgłębień błony komórkowej w kształcie kolby po stronie cytozolowej (Kiss A. L., 2009). Ten rodzaj endocytozy jest powszechny w różnych typach komórek (np. w komórkach mięśniowych, śródbłonna, w fibroblastach czy też adipocytach), bierze udział w sygnalizacji komórkowej, a także regulacji białek błonowych, lipidów oraz kwasów tłuszczowych (Doherty G. J., 2009). Integralnym

elementem wchodzącym w skład kaweoli jest białko błonowe – kaweolina, która odpowiedzialna jest m. in. za ich charakterystyczny kształt (Zhao J., 2018). Wzbogacone są one także w cholesterol i sfingolipidy. Kaweole, po odpączkowaniu od błony komórkowej, mogą łączyć się następnie z kaweosomami o neutralnym pH (Sahay G., 2010), które pozwalają „na omińnięcie” lizosomów, przez co chronią swoją zawartość przed enzymami hydrolitycznymi i ich degradacją w lizosomach (Benmerah A., 2007). Istnieją również dane wskazujące, na alternatywny wewnątrzkomórkowy los kaweoli – po ich odpączkowaniu od błony komórkowej mogą się łączyć z endosomami, a w konsekwencji dostarczać swój ładunek do lizosomów (Li Z., 2017).

W porównaniu do endocytozy zależnej od klatryn, wnikanie molekuł na drodze endocytozy zależnej od kaweolin trwa dłużej, a powstające transportujące pęcherzyki mają mniejszy rozmiar (Pelkmans L., 2001). Dostarczanie m. in. NPs tym szlakiem jednak, pozwala uniknąć ich potencjalnej, niepożądanego (w danym przypadku) degradacji w kwaśnych organellach, zwiększając tym samym ilość molekuł dostarczanych do ich celów molekularnych np. retikulum endoplazmatycznego czy aparatu Golgiego, co może mieć kluczowe znaczenie dla zwiększenia efektu terapeutycznego (Kou L., 2013).

2.1.3.4. Endocytoza zależna od klatryn

Wnikanie molekuł do wnętrza komórek na drodze endocytozy zależnej od klatryn (ang. clathrin-mediated endocytosis, CME) jest procesem powszechnie występującym, a zarazem wysoce selektywnym, w którym wymagana jest obecność wyspecjalizowanych receptorów na powierzchni błony komórkowej. Komórki, za pośrednictwem tego szlaku wchłaniania dostarczają m. in. hormony białkowe oraz składniki odżywcze, w tym cholesterol (przez receptor lipoproteinowy o niskiej gęstości) czy też żelazo (przez receptor transferyny) (Hassinger J. E., 2017). Do tego typu endocytozy niezbędna jest obecność białka opłaszczającego, uczestniczącego w tworzeniu pęcherzyków – klatryny (Cocucci E., 2012).

W pierwszym etapie endocytozy zależnej od klatryn, poszczególne makromolekuły (ligandy) lub np. NPs opłaszczone ligandem, znajdujące się w zewnątrzkomórkowym płynie, wiążą się do odpowiednich receptorów, znajdujących się na powierzchni błony, formując kompleks ligand–receptor (Li Z., 2017). Wiązanie się ligandu z receptorem wywołuje „inwazję osocza”, tworząc wpuklenia w miejscach, gdzie stężenie receptora jest wyższe niż w innych miejscach błony komórkowej (Zhao J., 2018). Kompleks ten następnie przegrupowuje się do miejsca błony komórkowej, bogatego w klatrynę (znajdującej się od strony cytoplazmy), w wyniku czego dochodzi do pochłonięcia molekuł przez pęcherzyki powlekane klatryną (powstaje kosz klatrynowy). Gdy pęcherzyk (ok. 120 nm) znajdzie się w cytoplazmie, dochodzi do rozpadu kosza klatrynowego i uwolnienia klatryny, po czym dochodzi do fuzji pęcherzyka z wczesnymi endosomami. Makromolekuły znajdujące się wewnątrz wczesnych endosomów, mogą następnie dotrzeć do lizosomów (Foroozandeh P., 2018) poprzez szlak endo-lizosomalny.

Internalizowane materiały po wniknięciu do komórek na drodze endocytozy zależnej od klatryn, są zazwyczaj dostarczane do lizosomów, a następnie degradowane. Zjawisko to jest wykorzystywane jako jedna ze strategii dostarczania leków skoniugowanych z NPs, które wnikają

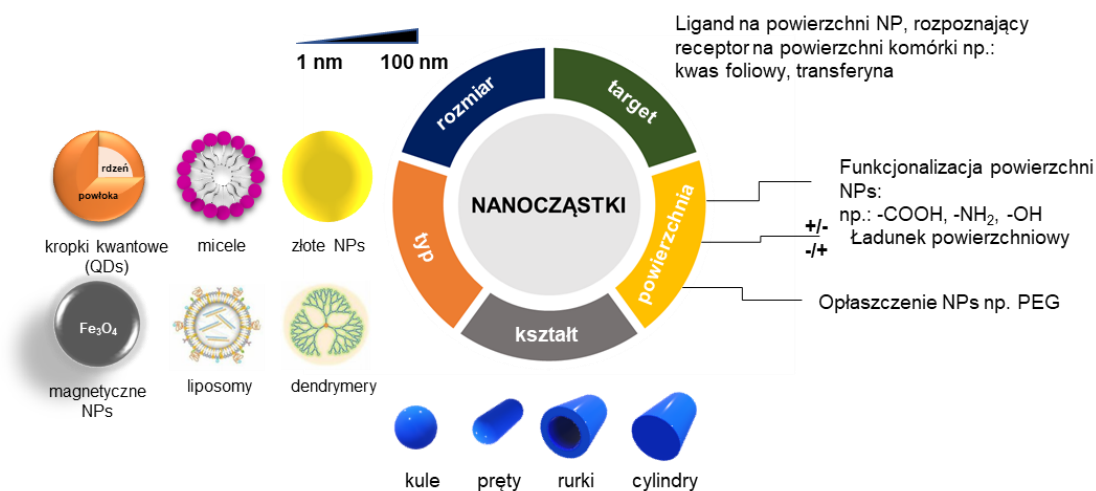
do komórek za pośrednictwem tego szlaku i mogą być degradowane w kwaśnych organellach (Karimi M., 2016), a następnie po uwolnieniu z lizosomów docierać do swoich celów molekularnych.

2.1.3.5. Endocytoza niezależna od klatryn/kaweolin

Endocytoza niezależna od klatryn oraz kaweolin (ang. clathrin- and caveolae-independent endocytosis) występuje w komórkach pozbawionych tych białek. Komórki za pośrednictwem tego szlaku wchłaniania dostarczają m. in. hormony wzrostu czy interleukinę-2 (Ferreira A. P. A., 2018). Jedną z metod pozwalających wykorzystać ten szlak, jest skoniugowanie NPs oraz polimerów z kwasem foliowym, który wnika do komórek na zasadzie endocytozy niezależnej od klatryn/kaweolin (Foroozandeh P., 2018). W ten sposób wykorzystuje się NPs m. in. jako sondy do obrazowania fluorescencyjnego czy platformy transportujące leki.

2.1.4. Wpływ właściwości fizykochemicznych nanocząstek na proces wnikania do komórek

Poprzez optymalizację właściwości fizykochemicznych nanocząstek takich jak: rozmiar, kształt, ładunek powierzchniowy czy modyfikacja powierzchni, można regulować proces ich wnikania do komórek, transport wewnątrzkomórkowy jak również cytotoksyczność (Nel A. E., 2009; Zhao J., 2018) (Rysunek 6.). Badanie i zrozumienie interakcji pomiędzy nanocząstkami a ich wnikaniem na drodze endocytozy może pozwolić zatem na zwiększenie efektywności terapii przeciwnowotworowej.



Rysunek 6. Przykłady modyfikacji właściwości fizykochemicznych NPs wykorzystywanych przy projektowaniu nanocząstek transportujących leki

2.1.4.1. Rozmiar

Rozmiar NPs jest kluczowym czynnikiem wpływającym na efektywność ich wnikania komórkowego, jak również na ich toksyczność w komórkach (Albanese A., 2012). Ponadto, wielkość nanocząstek jest jednym z najważniejszych czynników determinujących rodzaj szlaku,

jakim dostaną się do komórek. Małe NPs o średnicy od kilku do kilkuset nanometrów, mogą wnikać do komórek na drodze pino- lub makropinocytozy. Nanocząstki w rozmiarze 250 nm do 3 μm wnikają na drodze fagocytozy, natomiast 120–150 nm NPs – na drodze endocytozy zależnej od klatryn bądź kaweolin (Foroozandeh P., 2018). Rozmiar powstających kaweoli, w endocytozie zależnej od kaweolin, ogranicza wnikanie większych nanocząstek tym szlakiem (Nishikawa T., 2009). Niektóre typy NPs mogą wnikać zaś do komórek różnymi szlakami endocytozy, w zależności od ich rozmiaru.

Przeprowadzono szereg badań, na podstawie których określono optymalną wielkość NPs, mających potencjał w ich zastosowaniu w celach diagnostycznych oraz terapeutycznych, pozwalającą na jak najefektywniejsze wnikanie do komórki. W endocytozie zależnej od receptorów pełne „owinięcie” nanocząstki zależy od siły adhezji i gęstości ligandów potrzebnych do przekroczenia bariery energetycznej (Deserno M., 2004). Wyznaczono, w sposób teoretyczny oraz eksperymentalny, że optymalna wielkość nanocząstek pozwalająca na ich efektywne dostarczenie do komórek, wynosi około 50 nm. Wiele danych wskazuje, że kuliste NPs ze złota, krzemionki, jak również nanorurki węglowe czy kropki kwantowe w tym rozmiarze pozwalają na osiągnięcie ich maksymalnego wskaźnika wychwytu przez komórki (Zhao J., 2018). Efektywność procesu wnikania spada zaś dla mniejszych (około 15–30 nm) bądź większych (70–250 nm) nanocząstek (Wang S-H., 2010).

Należy jednak zwrócić uwagę, że w warunkach fizjologicznych nanocząstki wykazują silną tendencję do aglomeracji i tworzenia polidispersyjnych aglomeratów o nieregularnych kształtach. To z kolei wpływa na losowy szlak endocytozy, na której drodze NPs wnikają do komórki (Albanese A., 2011). Dlatego też, do ilościowego badania endocytozy nanocząstek, potrzebne są komplementarne techniki, które pozwalają na uniknięcie błędnej interpretacji danych eksperymentalnych.

2.1.4.2. Kształt

Obok rozmiaru nanocząstek, równie ważnym aspektem decydującym o efektywności wnikania komórkowego, jak również ich wewnątrzkomórkowej dystrybucji jest ich kształt (Zhao J., 2018). Do komórek mogą wnikać nanocząstki o różnych kształtach takich jak: kule, pręty, rurki czy cylindry (Mao Z., 2013). W badaniach przeprowadzonych w zespole Chithrani określano m. in. wpływ kształtu koloidalnych złotych nanocząstek (AuNPs) na efektywność wnikania do komórek nowotworowej linii HeLa. Wyniki ich badań wskazały, że kuliste AuNPs wnikają do komórek około 5–krotnie efektywniej niż te same nanocząstki w kształcie prętów (Chithrani B. D., 2006). Członkowie tego zespołu w swoich kolejnych badaniach sprawdzali poziom wnikania AuNPs: kulistych i w kształcie pręta, opłaszczonych dodatkowo transferyną, do komórek linii: STO, HeLa oraz SNB19. Zaobserwowali, że kuliste złote nanocząstki wnikają do komórek badanych linii efektywniej niż te w kształcie prętów (Chithrani B. D., 2007). Z kolei, Qiu i współpracownicy badali wpływ współczynnika kształtu (stosunek długości do średnicy) złotych nanoprętów (AuNRs) na wnikanie do komórek nowotworowej linii MCF-7. Wykazali, że AuNRs o wyższym współczynniku kształtu były internalizowane wolniej niż te o niższym współczynniku

(Qiu Y., 2010). Związane jest to z tym, że na „owinięcie” dłuższej nanocząstki potrzeba więcej czasu. Istnieją także doniesienia, że niektóre „niesferyczne” kształty NPs takie jak cylindry, wykazują duży potencjał w zastosowaniach biomedycznych. Niektóre cylindryczne nanocząstki wykonane z np. nanorurek węglowych, tlenków żelaza czy polimerów mogą zwiększać cyrkulację i czas retencji w porównaniu do ich sferycznego odpowiednika. Jednakże wciąż nie określono czy niesferyczne NPs mogą efektywniej wnikać do komórek nowotworowych na zasadzie endocytozy (Zhao J., 2018).

Ponadto różne typy komórek mogą wykazywać różną odpowiedź na dany kształt nanocząstek. Zespół Hutter badał proces wnikania komórkowego złotych nanocząstek w różnych kształtach: sferycznym, prętu oraz „jeżowca” (np. kolczastych NPs) do dwóch typów komórek: komórek fagocytarnych (mikrogleju) N9 oraz nefagocytarnych neuronów. Do fagocytarnych komórek mikrogleju wnikały głównie kolczaste NPs, natomiast do neuronów wnikały tylko te w kształcie prętów (Hutter E., 2010).

2.1.4.3. Ładunek powierzchniowy

Kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność wnikania NPs do komórek jest ich ładunek powierzchniowy (Deng J., 2016). Może on być anionowy, neutralny bądź kationowy. Ze względu na fakt, że powierzchnia błony komórkowej ma lekko ujemny ładunek, dodatnio naładowane nanocząstki są internalizowane w większym stopniu (poprzez oddziaływania elektrostatyczne) niż te o neutralnym bądź ujemnym ładunku (Panariti A., 2012; Zhao J., 2018). Wnikanie dodatnio naładowanych NPs może jednak zakłócać integralność błony komórkowej, a w konsekwencji prowadzić do wzrostu ich toksyczności (Goodman C. M., 2004) i indukcji śmierci komórkowej (Dawson K. A., 2009). Nanocząstki o neutralnym ładunku powierzchniowym zaś wnikają do komórek wolniej niż te o ujemnym ładunku.

Ładunek powierzchniowy nanocząstek, wpływa nie tylko na proces wnikania do komórek, ale również na jego mechanizm. Dodatnio naładowane NPs wnikają do komórek głównie na drodze makropinocytozy, podczas gdy ujemnie naładowane NPs – endocytozy niezależnej od klatryn/kaweolin (Dausend J., 2008). Ścieżki wnikania komórkowego mogą się zmienić, kiedy powierzchnia nanocząstek zostanie opłaszczona np. organicznymi molekułami. Złote nanocząstki, posiadające dodatni ładunek powierzchniowy, wnikają do komórek na drodze makropinocytozy lub endocytozy zależnej od kaweolin (Foroozandeh P., 2018). Po ich opłaszczeniu glikolem polietylenowym zaś, nadającym im ujemny ładunek, wnikają do komórek głównie na drodze endocytozy zależnej od klatryn i/lub endocytozy zależnej od kaweolin.

2.1.4.4. Modyfikacja powierzchni

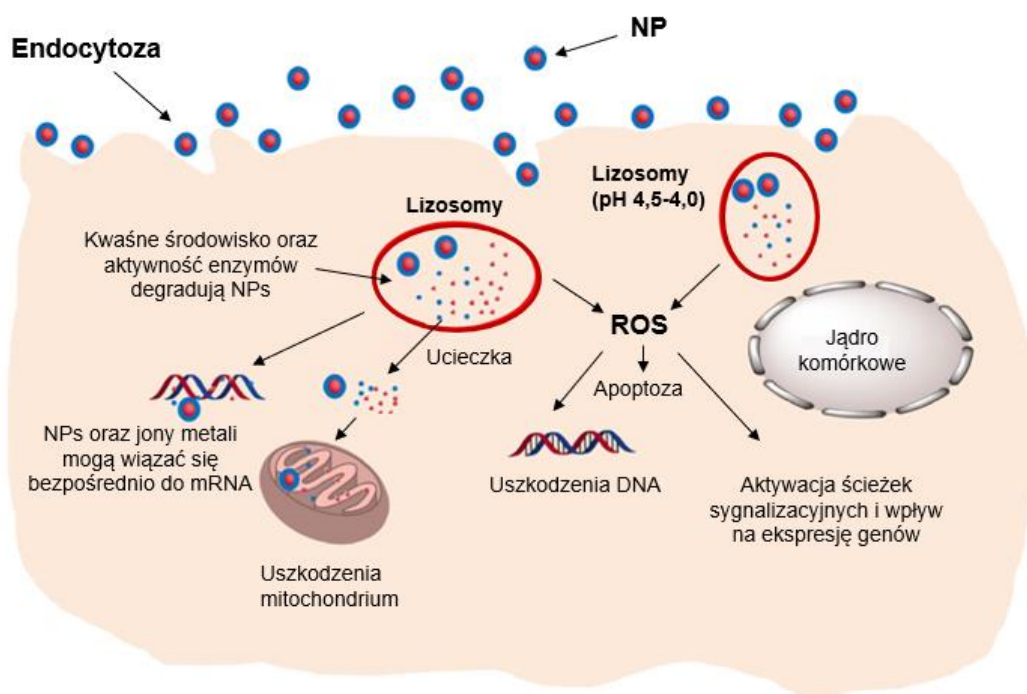
W zastosowaniach biomedycznych, dzięki modyfikacji powierzchni nanocząstek można obniżyć ich toksyczność, podnieść stabilność, jak również kontrolować i modulować ich proces wnikania oraz los wewnątrz komórki (Barrera G., 2016). Najczęściej powierzchnię NPs funkcjonalizuje się: PEG, ujemnie naładowaną grupą karboksylową (-COOH), obojętną grupą

hydroksylową (-OH), bądź dodatnio naładowaną grupą aminową (-NH₂). Wzrost ilości grup aminowych powoduje zwiększenie dodatniego ładunku powierzchniowego nanocząstek, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia ich wnikania komórkowego. Podobną zależność można zaobserwować w przypadku funkcjonalizacji NPs grupami karboksylowymi – zwiększa się ich ujemny ładunek powierzchniowy, prowadzący do zwiększonego wnikania komórkowego (Foroozandeh P., 2018).

Poprzez przyłączenie molekuł „rozpoznających” wybrane komórki do powierzchni NPs, można zwiększyć selektywność dostarczanych przez nie chemioterapeutyków (Panariti A., 2012). Specyficzny ligand związany na powierzchni NP, rozpoznawany jest przez receptor (unikalny dla pewnych komórek bądź chorób), zlokalizowany na powierzchni błony komórkowej. Dzięki specyficznej interakcji ligand–receptor, koniugat taki wnika do komórek na zasadzie endocytozy zależnej od receptorów. Jednymi z najczęściej wykorzystywanych receptorów jako narzędzi do zwiększania stężenia leków w komórkach są m. in. receptory kwasu foliowego oraz transferyny, ze względu na fakt, iż w większości komórek nowotworowych ich geny ulegają nadekspresji (Mao Z., 2013).

2.1.5. Wewnątrzkomórkowa degradacja NPs i ich wpływ na toksyczność w komórkach

W większości przypadków NPs wnikają do komórki na zasadzie endocytozy, wówczas zmienia się pH mikrośrodowiska z około 7,4, panującego w środowisku zewnątrzkomórkowym, do 6,0 – we wczesnych endosomach, a następnie do około 4,5–4,0 – w lizosomach.



Rysunek 7. Schemat przedstawiający interakcje NPs – komórka, na podstawie (Deng J., 2016)

Ponadto, NPs mogą być narażone także na działanie różnych enzymów takich jak katepsyna L, która zdolna jest do degradacji większości „bio-skoniugowanych” NPs. Po

degradacji powierzchni NPs, kwaśne środowisko panujące w endosomach (pH 6) lub lizosomach (pH 4,5–4,0), może prowadzić do ich dalszego rozkładu, powodując uwalnianie się wolnych jonów metali bądź makromolekuł z nanocząstek. To z kolei, może doprowadzić do stopniowego spadku średnicy ich rdzenia oraz zmiany morfologii. Uwalniające się makromolekuły oraz wolne jony metali z NPs mogą potencjalnie wpływać na homeostazę komórki np. poprzez zmianę ekspresji genów, czy zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), co może bezpośrednio przekładać się m. in. na uszkodzenia DNA, aktywację ścieżek sygnalizacyjnych czy też apoptozę (Rysunek 7.) (Deng J., 2016). Dlatego też, przy projektowaniu efektywnego systemu wykorzystującego NPs, niezbędne jest poznanie wewnątrzkomórkowej interakcji pomiędzy NPs a komórką na każdym z etapów dostarczania chemioterapeutyków (Pearson R. M., 2014).

2.1.6. Zdolność NPs do generowania reaktywnych form tlenu

Reaktywne formy tlenu (ROS) są indywidualnymi chemicznymi niestabilnych, częściowo zredukowanych pochodnych tlenu, powstających jako produkt uboczny, w wyniku aktywności metabolicznej komórki. Wśród nich wyróżnić można m. in.: nadtlenek wodoru (H_2O_2), anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) czy tlen singletowy (1O_2) (Yang H., 2018). ROS odgrywają ważną rolę w modulowaniu zarówno przeżycia jak i śmierci komórki, różnicowania, a także sygnalizacji wewnątrzkomórkowej oraz produkcji czynników związanych z zapaleniem (Mueller C. F., 2005). Zdolność do generowania ROS przez NPs wynika m. in. z chemicznych jak i fizycznych właściwości samych nanocząstek (takich jak rozmiar, kształt czy powierzchnia) jak również ich interakcji z poszczególnymi komponentami komórki np. podczas ich internalizacji do komórek (Dayem A. A., 2017).

2.1.6.1. Wpływ właściwości NPs na generowanie ROS

Stres oksydacyjny indukowany przez NPs może mieć kilka źródeł: (1) ROS mogą być generowane bezpośrednio na powierzchni nanocząstek, kiedy to zarówno utleniacz jak i wolne rodniki obecne są na powierzchni NPs. (2) NPs metali przejściowych (takich jak: żelazo, miedź, chrom czy wanad) mogą generować ROS, działając jako katalizatory w reakcjach Fentona¹. (3) Małe NPs, posiadające zdolność do wnikania do mitochondrium, powodują uszkodzenia fizyczne prowadzące do stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji do zmieniania ich funkcji. (4) Aktywacja komórek zapalnych (makrofagów i neutrofilów), która może być również indukowana poprzez fagocytozę NPs, może prowadzić do generowania reaktywnych form tlenu i azotu (Buzea C., 2007).

Duża powierzchnia właściwa NPs oraz reaktywne grupy na ich powierzchni odpowiedzialne są za ich wysoki potencjał oksydacyjny (Soenen S. J., 2011). Reakcje chemiczne, na powierzchni NPs z dużą powierzchnią właściwą są znacznie przyspieszone (Dayem A. A., 2017). Modyfikacje strukturalne i zmiany właściwości elektronowych na

¹ Reakcja Fentona – metoda wytwarzania rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$), w wyniku reakcji nadtlenu wodoru (H_2O_2) z jonem żelaza (II) (Fe^{2+}).

powierzchni mniejszych NPs zachodzą w wyższym stopniu niż na powierzchni większych NPs, czego konsekwencją jest formowanie się reaktywnych grup na powierzchni tych cząstek. Wysoką reaktywność chemiczną nanocząstek przypisuje się „zwisającym wiązaniom” (unieruchomionym wolnym rodnikom) atomów znajdujących się na powierzchni NPs, które promują katalizę indukowaną przez NPs (Fan J., 2011).

2.1.6.2. Wpływ interakcji NPs z komponentami komórki na generowanie ROS

Nanocząstki np. AgNPs po wniknięciu do komórki na drodze dyfuzji bądź endocytozy, mogą docierać m. in.: do mitochondrium, jądra komórkowego czy do lizosomów. Ich translokacja do tych organelli w mikrośrodowisku komórkowym uważana jest za przyczynę powstawania ROS (Raja G., 2020), na skutek katalizy reakcji chemicznych z udziałem wolnych rodników, interakcji z komponentami mitochondrium czy też aktywacji czynników wzrostu (Dayem A. A., 2017). ROS, zarówno w nowotworowych jak i prawidłowych komórkach, powodują uszkodzenia błony komórkowej i mitochondrium, jak również mRNA i DNA (w wyniku stresu oksydacyjnego). Mogą także odpowiadać za indukcję apoptozy (Piao M. J., 2011).

Największą rolę w generowaniu ROS w komórce, na skutek jej interakcji z NPs odgrywają mitochondria. NPs mają wpływ na depolaryzację błony mitochondrialnej, a także łańcuch transportu elektronów poprzez aktywację NADPH-zależnych enzymów. Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów w komórkach poddanych ekspozycji NPs, może zostać zablokowany, skutkiem czego jest zwiększenie komórkowego poziomu anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) poprzez transport elektronów do O_2 (Soenen S. J., 2011). Nanocząstki mogą być także odpowiedzialne za powstawanie wolnych rodników prowadzących do redukcji glutationu do jego utlenionej formy – disiarczku glutationu, co wiąże się ze stresem oksydacyjnym i jego dalszymi konsekwencjami (Dayem A. A., 2017).

Ilość generowanych ROS i wynikający z tego stres oksydacyjny, jest skorelowany ze stężeniem NPs, jakiemu zostały poddane komórki. System antyoksydacyjny komórek poddanych działaniu niskiego stężenia NPs jest zdolny do przezwyciężenia stresu komórkowego i pozwala na odzyskanie równowagi redoks. Natomiast wysokie stężenie NPs w komórkach, „przytłacza” ich system antyoksydacyjny, w wyniku czego nanocząstki te „stają się” cytotoksyczne i indukują stany zapalne (Dayem A. A., 2017).

3. OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

3.1. Określenie aktywności cytotoksycznej wolnych i skoniugowanych z nanocząstkami niesymetrycznych bisakrydyn metodą z wykorzystaniem barwnika MTT

Jednym z pierwszych etapów, pozwalającym na oznaczenie wrażliwości danej linii komórkowej na badany chemioterapeutyk, jest określenie jego aktywności cytotoksycznej. W pierwszym etapie zbadalam aktywność cytotoksyczną niesymetrycznych bisakrydyn (C-2028 oraz C-2045) w ich wolnej (nieskoniugowanej) postaci, celem wyznaczenia ich efektywnych stężeń, stosowanych w dalszych badaniach. Następnie, zbadalam wpływ nieobsadzonych nanocząstek oraz ich koniugatów z UAs na proliferację komórek badanych linii komórkowych.

Metoda z wykorzystaniem barwnika MTT opiera się na pomiarze aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów. Przy założeniu, że tylko żywe komórki są zdolne do redukcji barwnika MTT do barwnego, fioletowego produktu można wyznaczyć jego ilość spektrofotometrycznie przy długości fali emisji 540 nm. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia wyznaczyłam trzy podstawowe parametry tj.: IC₅₀ (ang. half maximal inhibitory concentration - stężenie związku, przy którym proliferacja komórek w hodowli *in vitro* zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych), IC₈₀ oraz IC₉₀ - stężenie związku, przy którym proliferacja komórek w hodowli *in vitro* zostaje zahamowana odpowiednio w 80% lub 90% w stosunku do komórek kontrolnych, nietraktowanych badanym chemioterapeutykiem, wobec badanych linii komórkowych.

3.1.1. Cytotoksyczność badanych niesymetrycznych bisakrydyn (UAs) w ich wolnej postaci

Dane określające aktywność biologiczną UAs wobec komórek badanych linii przedstawione w Tabeli 1., stanowią średnią z czterech niezależnych eksperymentów.

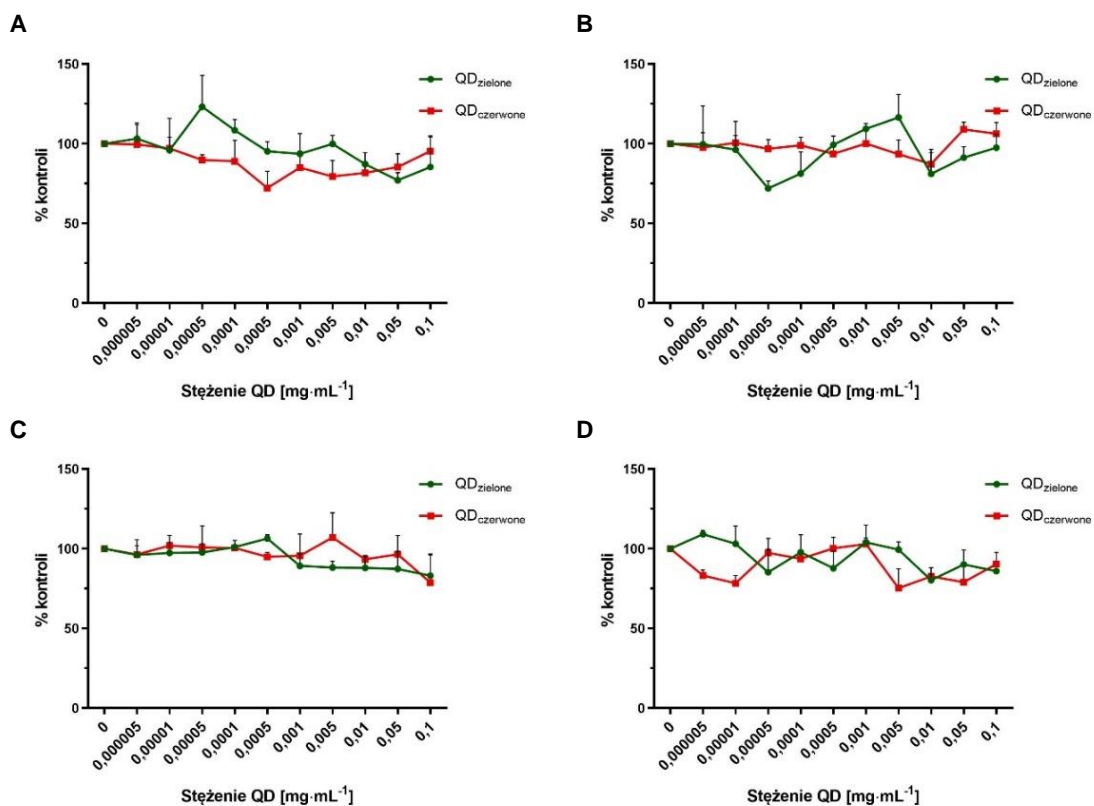
Tabela 1. Wpływ wodnych roztworów związków: C-2028 i C-2045 na pomiar zahamowania wzrostu komórek nowotworowych linii: H460 i HCT116 oraz prawidłowych komórek linii: MRC-5 i CCD 841 CoN w oparciu o pomiar aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów z wykorzystaniem barwnika MTT

Linia komórkowa	Związek	IC ₅₀ [μM]	IC ₈₀ [μM]	IC ₉₀ [μM]
H460	C-2028	0,01600±0,00070	0,0353±0,0025	0,0460±0,0036
	C-2045	0,095±0,038	0,273±0,064	0,399±0,052
HCT116	C-2028	0,01040±0,00066	0,0328±0,0047	0,0438±0,0024
	C-2045	0,0590±0,0083	0,254±0,070	0,455±0,026
MRC-5	C-2028	0,0180±0,0023	0,45±0,25	8,66
	C-2045	0,172±0,011	0,449±0,024	5,62
CCD 841 CoN	C-2028	0,0190±0,0014	0,076±0,042	3,6±1,9
	C-2045	0,338±0,027	1,50±0,52	9,5±3,1

Związki C-2028 oraz C-2045 charakteryzują się wysoką cytotoksycznością wobec badanych komórek. Związek C-2028, niezależnie od badanej linii komórkowej, wykazuje wyższą cytotoksyczność niż związek C-2045. Badane linie komórkowe są wrażliwe na działanie UAs w porównywalnym stopniu. Związek C-2045 jest około 6–8–krotnie mniej cytotoksyczny niż C-2028 wobec komórek linii nowotworowych: H460 i HCT116 dla wszystkich trzech parametrów tj.: IC_{50} , IC_{80} oraz IC_{90} , określających aktywność biologiczną chemioterapeutyków.

Związek C-2028 jest około 10–krotnie bardziej cytotoksyczny od związku C-2045 (w IC_{50}) wobec komórek linii MRC-5, natomiast wobec linii CCD 841 CoN – około 15–krotnie. Największe różnice aktywności pomiędzy związkami C-2028 oraz C-2045 zaobserwowałam dla stężeń odpowiadających wartościom IC_{80} . W przypadku komórek linii MRC-5, badane związki hamowały proliferację 80% komórek w bardzo podobnych zakresach stężeń. W celu zahamowania tej samej ilości komórek linii CCD 841 CoN różnica pomiędzy efektywnymi stężeniami badanych związków jest o wiele większa. Związek C-2028 jest około 20–krotnie bardziej cytotoksyczny od związku C-2045. Linie komórek nowotworowych (H460 i HCT116) są wrażliwsze na badane związki (C-2028 oraz C-2045) niż ich analogiczne prawidłowe linie komórkowe (MRC-5 i CCD 841 CoN). Różnica ta jest tym większa im większy jest procent zahamowania wzrostu komórek.

3.1.2. Wpływ luminescencyjnych kropek kwantowych: $QD_{\text{zielonych}}$ i $QD_{\text{czerwonych}}$ na proliferację komórek



Rysunek 8. Procentowe zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych: (A) H460, (B) HCT116 oraz prawidłowych: (C) MRC-5, (D) CCD 841 CoN w zależności od stężenia $QD_{\text{zielonych}}$ i $QD_{\text{czerwonych}}$ po 72 h inkubacji. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z czterech niezależnych eksperymentów

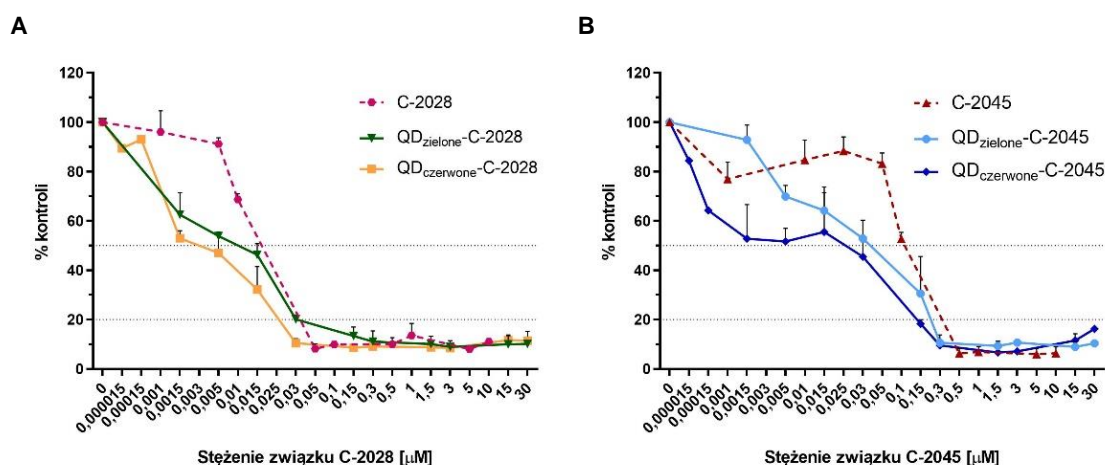
Przebieg krzywych zależności procentowego zahamowania wzrostu komórek od stężenia kropek kwantowych wobec wszystkich badanych linii komórkowych (Rysunek 8.) wskazuje, że zarówno zielone jak i czerwone kropki kwantowe (QDs) nie wpływają znacząco na proliferację tych komórek. Mogą one być zatem wykorzystane jako potencjalne platformy transportujące badane chemioterapeutyki do komórek nowotworowych.

W kolejnym etapie badań określiłam wpływ skoniugowania UAs z NPs (kropekami kwantowymi i magnetycznymi NPs), na ich cytotoksyczność wobec badanych linii komórkowych.

3.1.3. Cytotoksyczność niesymetrycznych bisakrydyn zaadsorbowanych na powierzchni kropek kwantowych

Poniżej przedstawiłam krzywe zależności procentowego zahamowania wzrostu komórek, jak również parametry określające aktywność biologiczną badanych związków (IC_{50} , IC_{80} i IC_{90}) w zależności od stężenia, w ich wolnej i skoniugowanej z QDs postaci, wobec wszystkich badanych linii komórkowych. Liniją przerywaną zaznaczyłam krzywe procentowego zahamowania komórek przez związki w ich wolnej postaci, liniją ciągłą – przez koniugaty UAs z QDs.

H460



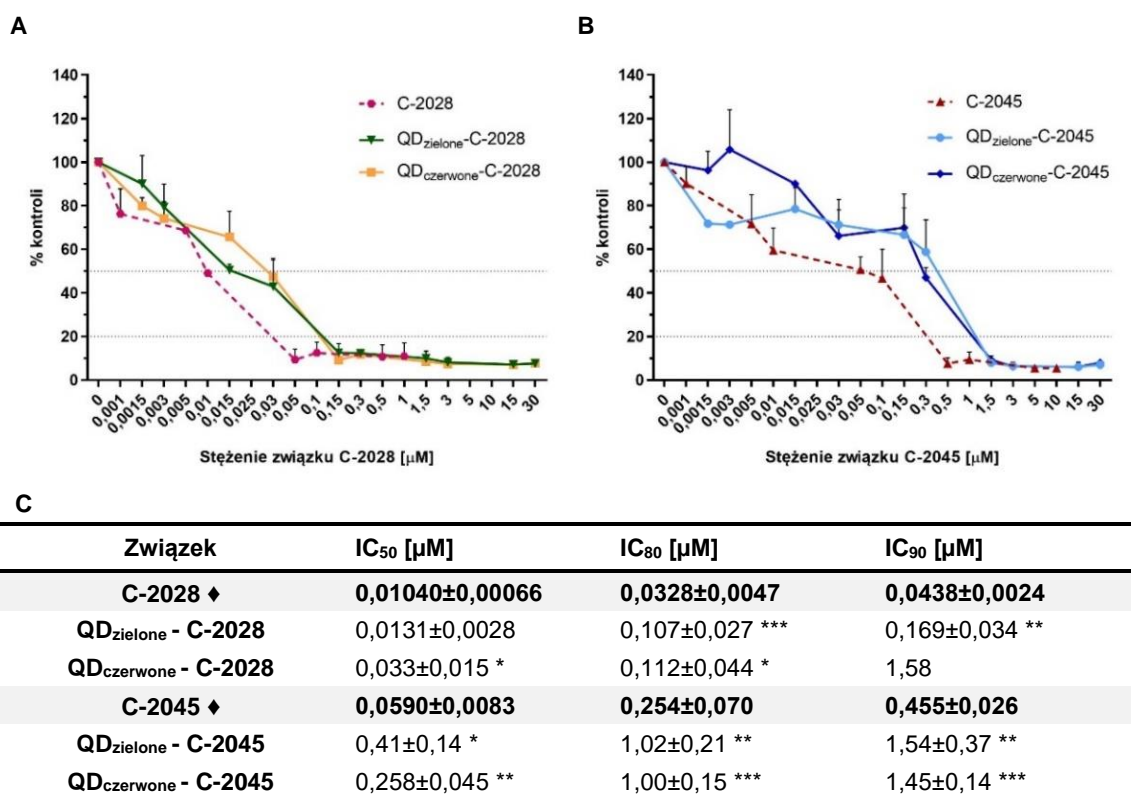
C

Związek	IC_{50} [μ M]	IC_{80} [μ M]	IC_{90} [μ M]
C-2028 ♦	0,01600±0,00070	0,0353±0,0025	0,0460±0,0036
QDzielone- C-2028	0,0062±0,0013 ***	0,0280±0,0023 *	0,042
QDczerwone - C-2028	0,00130±0,00020 ***	0,0238±0,0024 **	0,057±0,013
C-2045 ♦	0,095±0,038	0,273±0,064	0,399±0,052
QDzielone - C-2045	0,046±0,027	0,201±0,056	0,480
QDczerwone - C-2045	0,020±0,020 *	0,1453±0,0060 *	0,244

Rysunek 9. Krzywe zależności procentowego zahamowania wzrostu komórek nowotworowej linii H460 od stężenia (A) C-2028, (B) C-2045 oraz ich koniugatów, zaadsorbowanych na powierzchni QDzielonych i QDczerwonych po 72 h inkubacji. (C) Wartości aktywności cytotoksycznej badanych związków i ich koniugatów z QDs wobec komórek linii H460. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z czterech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – statystycznie istotne różnice między związkiem w jego wolnej i skoniugowanej postaci (test t-Studenta). ♦ Dane przedstawione w Tabeli 1.

Zahamowanie proliferacji komórek linii H460 zależne jest od stężenia badanego związku (Rysunek 9.). Porównując przebieg krzywych zależności zahamowania wzrostu komórek od stężenia związków w ich wolnej, jak i skoniugowanej postaci można zaobserwować, że skoniugowanie badanych UAs z QDs, głównie z czerwonymi, pozwoliło na znaczne obniżenie dawki hamującej wzrost komórek H460 w porównaniu do związków w ich wolnej postaci. Największe różnice w cytotoksyczności, istotne statystycznie, zaobserwowałam głównie dla dawek hamujących 50% komórek względem komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem). Tendencja ta dotyczy przede wszystkim koniugatów QDs z C-2028. Stężenia związków w koniugatach, odpowiadające wartości IC_{50} , spadły istotnie statystycznie, odpowiednio dla: $QD_{\text{zielonych-C-2028}}$ około 2,6-krotnie, $QD_{\text{czerwonych-C-2028}}$ – 12,3-krotnie, $QD_{\text{czerwonych-C-2045}}$ około 4,7-krotnie. Wartości IC_{80} , w stosunku do związków w ich wolnej postaci, spadły odpowiednio dla koniugatu: $QD_{\text{zielone-C-2028}}$ – 1,2-krotnie, $QD_{\text{czerwone-C-2028}}$ – 1,5-krotnie, $QD_{\text{czerwone-C-2045}}$ – 1,9-krotnie.

HCT116

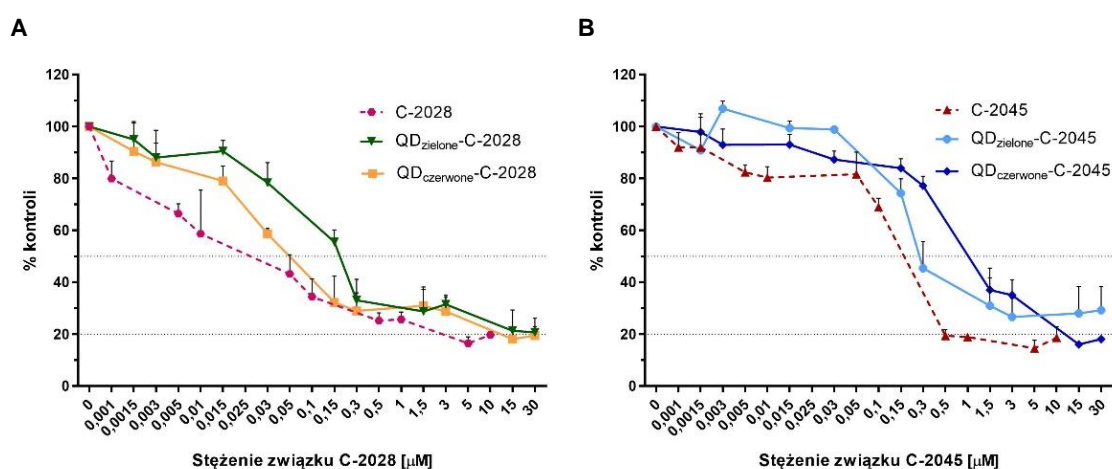


Rysunek 10. Krzywe zależności procentowego zahamowania wzrostu komórek nowotworowej linii HCT116 od stężenia (A) C-2028, (B) C-2045 oraz ich koniugatów, zaadsorbowanych na powierzchni $QD_{\text{zielonych}}$ i $QD_{\text{czerwonych}}$ po 72 h inkubacji. (C) Wartości aktywności cytotoksycznej badanych związków i ich koniugatów z QDs wobec komórek linii HCT116. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z czterech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – statystycznie istotne różnice między związkiem w jego wolnej i skoniugowanej postaci (test t-Studenta). ♦ Dane przedstawione w Tabeli 1.

Zahamowanie proliferacji komórek linii HCT116 zależne jest od stężenia związku C-2028/C-2045. Na podstawie przebiegu krzywych zależności zahamowania wzrostu komórek od stężenia związków w ich wolnej jak i skoniugowanej postaci można zaobserwować, że

skoniugowanie UAs z QDs nie spowodowało wzrostu ich cytotoksyczności (Rysunek 10.). UAs zaadsorbowane na powierzchni kropek kwantowych stają się mniej cytotoksyczne i potrzebne jest wyższe ich stężenie, w stosunku do ich wolnej postaci, aby uzyskać daną odpowiedź biologiczną. Stężenia związków w koniugatach, odpowiadające wartości IC_{50} wzrosły, istotnie statystycznie, odpowiednio dla: $QD_{\text{zielonych-C-2045}}$ – 6,9–krotnie, $QD_{\text{czerwonych-C-2028}}$ – 3,2–krotnie, $QD_{\text{czerwonych-C-2045}}$ około 4,4–krotnie. Wartości IC_{80} , w stosunku do związków w ich wolnej postaci, wzrosły odpowiednio dla koniugatu: $QD_{\text{zielone-C-2028}}$ – 3,3–krotnie, $QD_{\text{zielone-C-2045}}$ – 4,1–krotnie, $QD_{\text{czerwone-C-2028}}$ 3,4–krotnie, $QD_{\text{czerwone-C-2045}}$ – 3,9–krotnie. Dla stężeń odpowiadających wartościom IC_{90} wzrosły odpowiednio: $QD_{\text{zielone-C-2028}}$ – 4–krotnie, $QD_{\text{zielone-C-2045}}$ – 3,4–krotnie, $QD_{\text{czerwonych-C-2045}}$ – 3,2–krotnie.

MRC-5



C

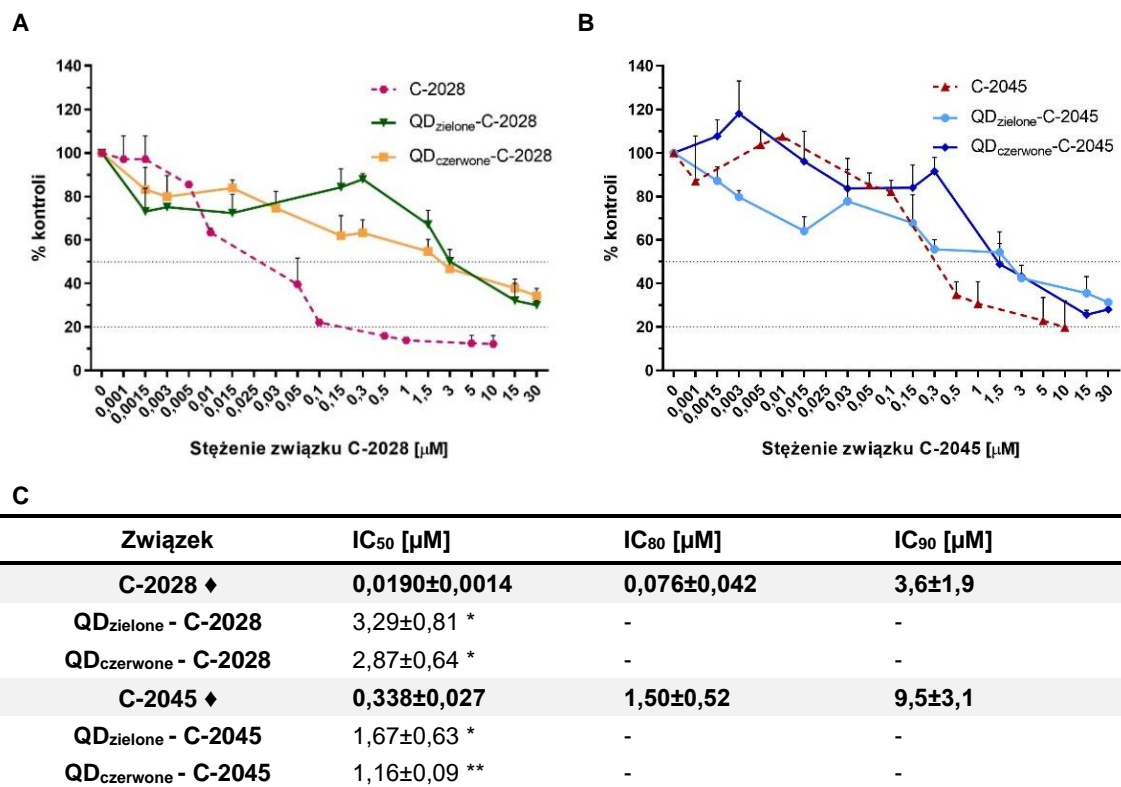
Związek	IC_{50} [μM]	IC_{80} [μM]	IC_{90} [μM]
C-2028 ♦	0,0180±0,0023	0,45±0,25	8,66
$QD_{\text{zielone}} - \text{C-2028}$	0,183±0,039 ***	1,09	-
$QD_{\text{czerwone}} - \text{C-2028}$	0,082±0,041 *	10,4±3,3	-
C-2045 ♦	0,172±0,011	0,449±0,024	5,62
$QD_{\text{zielone}} - \text{C-2045}$	0,314±0,099	4,96	-
$QD_{\text{czerwone}} - \text{C-2045}$	0,86±0,17 **	10,3±1,0 **	-

Rysunek 11. Krzywe zależności procentowego zahamowania wzrostu komórek prawidłowej linii MRC-5 od stężenia (A) C-2028, (B) C-2045 oraz ich koniugatów, zaadsorbowanych na powierzchni $QD_{\text{zielonych}}$ i $QD_{\text{czerwonych}}$ po 72 h inkubacji. (C) Wartości aktywności cytotoksycznej badanych związków i ich koniugatów z QDs wobec komórek linii MRC-5. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z czterech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – statystycznie istotne różnice między związkiem w jego wolnej i skoniugowanej postaci (test t-Studenta). ♦ Dane przedstawione w Tabeli 1.

Zahamowanie proliferacji komórek prawidłowych linii MRC-5 zależne jest od stężenia UAs w ich wolnej, jak i zaadsorbowanej na powierzchni QDs postaci (Rysunek 11.). Skoniugowanie badanych związków z QDs (czerwonymi i zielonymi) pozwoliło na obniżenie, w sposób istotny statystycznie, ich cytotoksyczności. Wartość IC_{50} wzrosła, względem związków w ich wolnej postaci, dla $QD_{\text{zielonych-C-2028}}$ około 10,2–krotnie, $QD_{\text{czerwonych-C-2028}}$ – 4,5–krotnie, $QD_{\text{zielonych-C-2045}}$ – 1,8–krotnie, $QD_{\text{czerwonych-C-2045}}$ około 5,0–krotnie. Stężenia związków

w koniugatach, potrzebnych do uzyskania odpowiedzi biologicznej, odpowiadającej wartości IC_{80} wzrosły dla QD_{czerwonych}-C-2045 - 22,9-krotnie. Skoniugowanie UAs z QDs pozwoliło zatem na ochronę prawidłowych komórek przed działaniem badanych związków, „czyniąc je” mniej wrażliwymi.

CCD 841 CoN



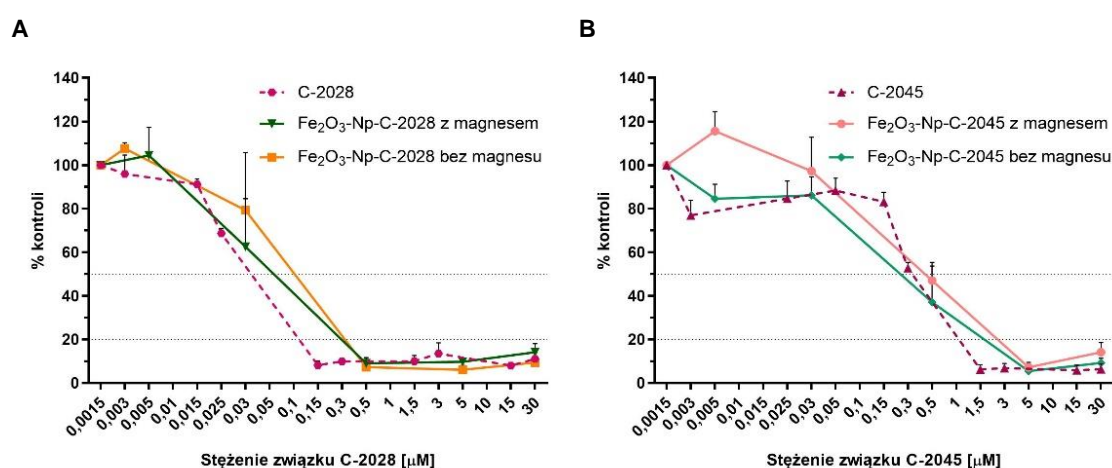
Rysunek 12. Krzywe zależności procentowego zahamowania wzrostu komórek prawidłowej linii CCD 841 CoN od stężenia (A) C-2028, (B) C-2045 oraz ich koniugatów, zaadsorbowanych na powierzchni QD_{zielonych} i QD_{czerwonych} po 72 h inkubacji. (C) Wartości aktywności cytotoksycznej badanych związków i ich koniugatów z QDs wobec komórek linii CCD 841 CoN. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z czterech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – statystycznie istotne różnice między związkiem w jego wolnej i skoniugowanej postaci (test t-Studenta). \blacklozenge Dane przedstawione w Tabeli 1.

Uzyskane wyniki badań pokazują, że zahamowanie proliferacji komórek prawidłowej linii CCD 841 CoN zależne jest od stężenia badanego związku (C-2028/C-2045), zaadsorbowanego na powierzchni QDs (Rysunek 12.). Skoniugowanie badanych związków z czerwonymi i zielonymi kropkami kwantowymi pozwoliło na obniżenie ich cytotoksyczności. Stężenia związków w koniugatach, względem UAs w ich wolnej postaci, odpowiadającej wartości IC_{50} wzrosły, istotnie statystycznie, odpowiednio dla: QD_{zielonych}-C-2028 około 173,2-krotnie, QD_{zielonych}-C-2045 – 4,9-krotnie, QD_{czerwonych}-C-2028 – 151,1-krotnie, QD_{czerwonych}-C-2045 – 3,3-krotnie.

3.1.4. Cytotoksyczność niesymetrycznych bisakrydyn zaadsorbowanych na powierzchni magnetycznych nanocząstek

Drugim rodzajem nanocząstek, z jakimi zostały skoniugowane UAs były magnetyczne nanocząstki ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-RCOOH Np}$). W celu sprawdzenia wpływu obecności pola magnetycznego na aktywność cytotoksyczną badanych koniugatów ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{Np-C-2028/C-2045}$) umieszczałam magnes neodymowy pod płytką titracyjną. Poniżej przedstawiłam krzywe zależności procentowego zahamowania wzrostu komórek, jak również parametry określające aktywność biologiczną badanych związków (IC_{50} , IC_{80} i IC_{90}) w zależności od stężenia, w ich wolnej jak i skoniugowanej z $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-RCOOH Np}$ postaci, wobec nowotworowych linii komórkowych.

H460



C

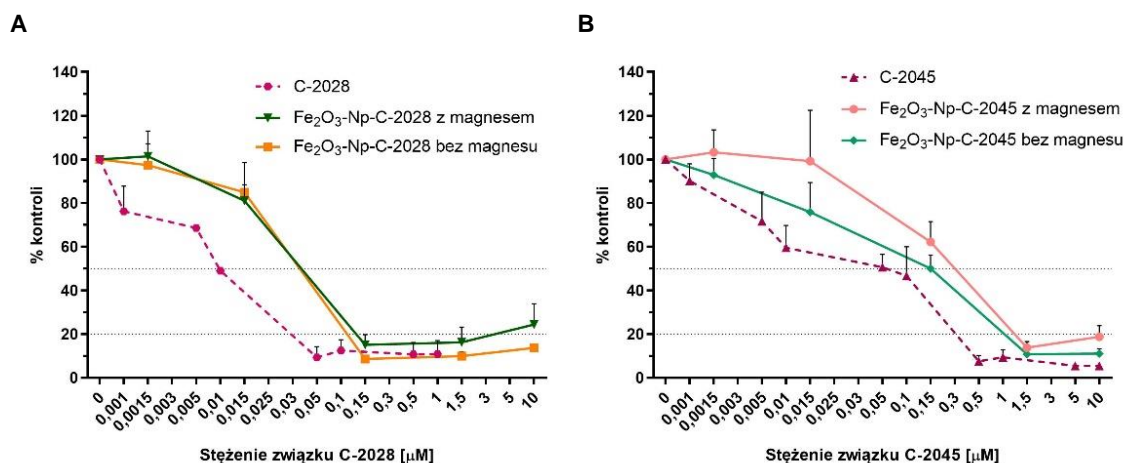
Związek		IC_{50} [μM]	IC_{80} [μM]	IC_{90} [μM]
C-2028 ♦		0,01600±0,00070	0,0353±0,0025	0,0460±0,0036
$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Np-C-2028}$	z magnezem	0,025±0,017	0,091±0,017 **	0,135±0,013 ***
	bez magnesu	0,043±0,023	0,101±0,023 **	0,137±0,016 ***
C-2045 ♦		0,095±0,038	0,273±0,064	0,399±0,052
$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Np-C-2045}$	z magnezem	0,143±0,045	0,75±0,11 **	1,372±0,027 ***
	bez magnesu	0,099±0,065	0,51±0,33	1,05±0,32

Rysunek 13. Krzywe zależności procentowego zahamowania wzrostu komórek nowotworowej linii H460 od stężenia (A) C-2028, (B) C-2045 oraz ich koniugatów z magnetycznymi nanocząstkami (z magnezem i bez). po 72 h inkubacji. (C) Wartości aktywności cytotoksycznej badanych związków i ich koniugatów z magnetycznymi nanocząstkami wobec komórek linii H460. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z czterech niezależnych eksperymentów. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – statystycznie istotne różnice między związkiem w jego wolnej i skoniugowanej postaci (test t-Studenta). ♦ Dane przedstawione w Tabeli 1.

Na podstawie przebiegu krzywych zależności zahamowania wzrostu komórek linii H460 od stężenia związków w ich wolnej, jak i skoniugowanej z magnetycznymi NPs postaci można zaobserwować, że skoniugowanie badanych UAs z $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-RCOOH Np}$, spowodowało znacząco statystycznie obniżenie ich aktywności cytotoksycznej w porównaniu do związków w ich wolnej

postaci (Rysunek 13.). Co więcej, umieszczenie komórek w polu magnetycznym wpłynęło w niewielkim stopniu na wzrost aktywności badanych koniugatów, ale tylko w przypadku koniugatu $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Np-C-2028}$. Niemniej jednak, wartości odpowiadające IC_{50} , IC_{80} i IC_{90} były za każdym razem wyższe (a tym samym ich aktywność cytotoksyczna była słabsza), w przypadku koniugatów badanych związków, w porównaniu do UAs w ich wolnej postaci.

HCT116



Związek	IC_{50} [μM]	IC_{80} [μM]	IC_{90} [μM]
C-2028 ♦	0,0104±0,0007	0,033±0,005	0,044±0,002
$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Np-C-2028}$	z magnesem	0,045±0,008 ***	0,128±0,021 ***
	bez magnezu	0,043±0,009 ***	0,106±0,006 ***
C-2045 ♦	0,059±0,008	0,254±0,070	0,455±0,026
$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Np-C-2045}$	z magnesem	0,278±0,098 *	1,096±0,195 *
	bez magnezu	0,133±0,073	0,880±0,154 **

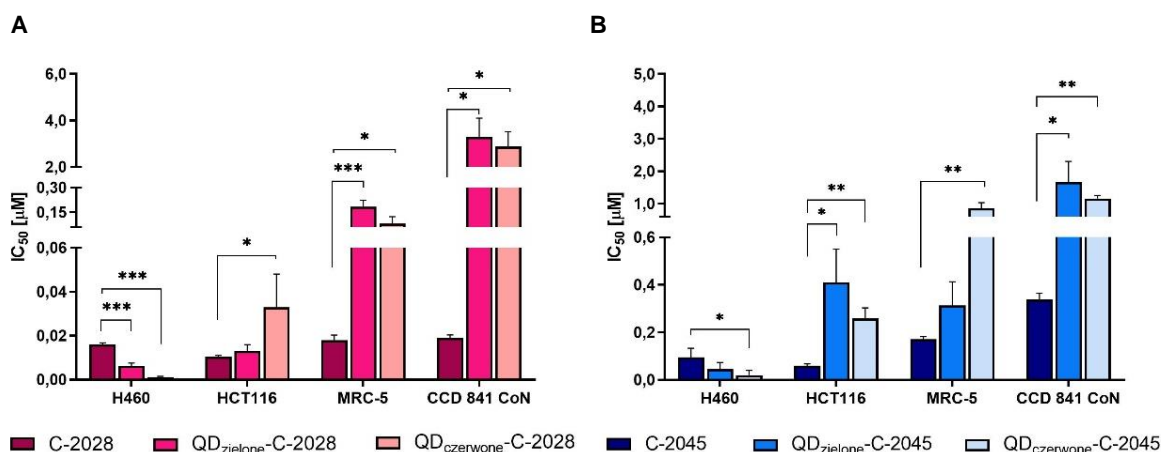
Rysunek 14. Krzywe zależności procentowego zahamowania wzrostu komórek nowotworowej linii HCT116 od stężenia (A) C-2028, (B) C-2045 oraz ich koniugatów z magnetycznymi nanocząstkami (z magnesem i bez) po 72 h inkubacji. (C) Wartości aktywności cytotoksycznej badanych związków i ich koniugatów z magnetycznymi nanocząstkami wobec komórek linii HCT116. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z czterech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – statystycznie istotne różnice między związkiem w jego wolnej i skoniugowanej postaci (test t-Studenta). ♦ Dane przedstawione w Tabeli 1.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że skoniugowanie UAs z magnetycznymi nanocząstkami znacząco obniżyło ich aktywność cytotoksyczną wobec komórek linii HCT116 (Rysunek 14.). Umieszczenie komórek w polu magnetycznym spowodowało natomiast dodatkowe osłabienie aktywności cytotoksycznej badanych koniugatów ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Np-C-2028/C-2045}$), w porównaniu do komórek inkubowanych z tymi samymi koniugatami (inkubowanymi bez obecności pola magnetycznego).

Podsumowanie

Podsumowując, badane pochodne niesymetrycznych bisakrydyn (UAs) charakteryzują się wysoką cytotoksycznością. Wrażliwsze na ich działanie są nowotworowe linie komórkowe (H460 i HCT116), w porównaniu z ich prawidłowymi odpowiednikami (MRC-5 oraz

CCD 841 CoN) (Rysunek 15.). Skoniugowanie badanych UAs z kropkami kwantowymi, głównie z czerwonymi, pozwoliło na znaczne obniżenie dawki hamującej wzrost komórek H460, w porównaniu do związków w ich wolnej postaci (IC_{50}). Ponadto, skoniugowanie UAs z QDs obniżyło aktywność cytotoksyczną tych związków wobec komórek prawidłowych linii (MRC-5 i CCD 841 CoN), ochraniając je tym samym przed niepożądanym działaniem. Nieobsadzone QD_{czerwone} i QD_{zielone}, niezależnie od badanej linii komórkowej, nie wpływały w sposób znaczący na zahamowanie proliferacji komórek. Są one zatem potencjalnie dobrymi platformami transportującymi badane chemioterapeutyki.



Rysunek 15. Zestawienie efektywnych stężeń biologicznych badanych związków (A) C-2028 i (B) C-2045 oraz ich koniugatów z zielonymi i czerwonymi QD, odpowiadających wartości IC_{50} wobec komórek linii H460, HCT116, MRC-5 oraz CCD 841 CoN po 72 h inkubacji. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z czterech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – statystycznie istotne różnice między związkiem w jego wolnej i skoniugowanej postaci (test t-Studenta)

Skoniugowanie UAs z magnetycznymi nanocząstkami (Fe_3O_4 -RCOOH Np) spowodowało obniżenie ich aktywności cytotoksycznej wobec nowotworowych linii komórkowych (H460 i HCT116). Co więcej, aktywność cytotoksyczna badanych koniugatów poddanych działaniu pola magnetycznego (magnes neodymowy) słabła, niezależnie od czasu jego działania (nie obserwowałam zmiany pomiędzy aktywnością cytotoksyczną koniugatów poddanych 3 h i 72 h inkubacji w polu magnetycznym). Z uwagi na fakt, że skoniugowanie UAs z magnetycznymi nanocząstkami obniżało ich aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych, nie wyznaczałam jej wobec komórek prawidłowych. Ponadto, nie wykonywałam również dalszych eksperymentów dla tych koniugatów. Wszystkie poniższe eksperymenty przeprowadziłam dla koniugatów niesymetrycznych bisakrydyn z kropkami kwantowymi (QDs-UAs), ze względu na wzrost potencjału terapeutycznego UAs po ich skoniugowaniu z tymi nanocząstkami.

Z terapeutycznego punktu widzenia najbardziej korzystne byłoby wyznaczenie dawki odpowiadającej wartości IC_{100} , co w warunkach eksperymentalnych jest praktycznie niemożliwe. Mając na uwadze fakt, że najwyższą dawką (wyznaczoną wraz z odchyleniami standardowymi), jaką udało mi się wyznaczyć dla wszystkich wariantów badanych związków jest dawka odpowiadająca wartości IC_{80} , wszystkie dalsze eksperymenty prowadziłam przy tym stężeniu. Aby móc porównywać wpływ skoniugowania badanych związków (C-2028 oraz C-2045) z nanocząstkami na odpowiedź biologiczną, stosowałam dawki odpowiadające wartości IC_{80} ,

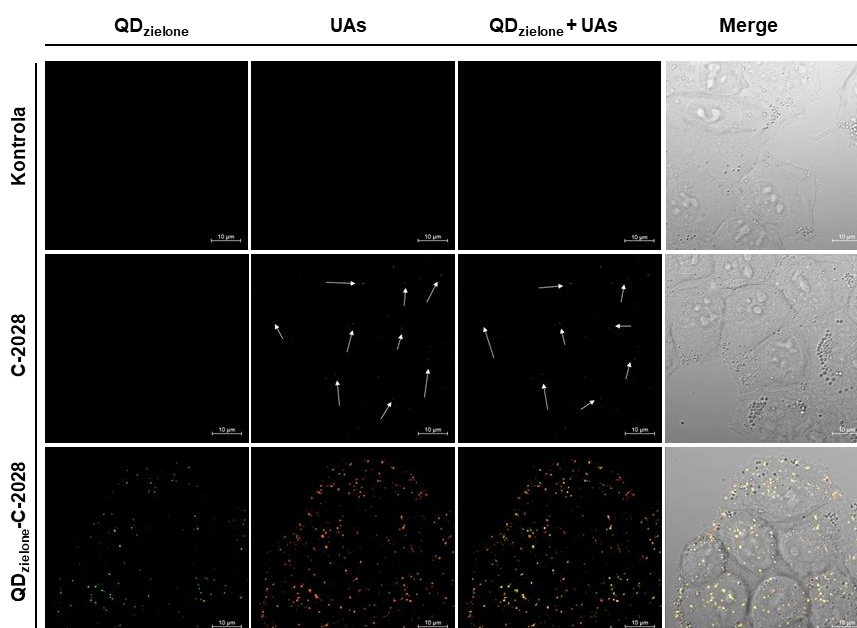
wyznaczone dla związków w ich wolnej, nieobsadzonej postaci, wyznaczonych względem linii nowotworowych.

3.2. **Badanie procesu wnikania UAs, QDs i ich koniugatów do komórek nowotworowych i prawidłowych**

3.2.1. *Badanie procesu wnikania kropek kwantowych, niesymetrycznych bisakrydyn w ich wolnej i skoniugowanej z nanocząstkami postaci do komórek nowotworowych i prawidłowych*

Liczne dane literaturowe wskazują, że dostarczenie skoniugowanych związków z zastosowaniem nanocząstek jako platform transportujących, może zwiększyć stężenie chemioterapeutyków w komórkach nowotworowych, jednocześnie ograniczając działania niepożądane w komórkach prawidłowych (Rafiei P., 2017). W związku z tym, celem kolejnego eksperymentu było sprawdzenie czy badane niesymetryczne bisakrydyny wnikają do komórek efektywniej w ich skoniugowanej (z QDs) czy też wolnej postaci.

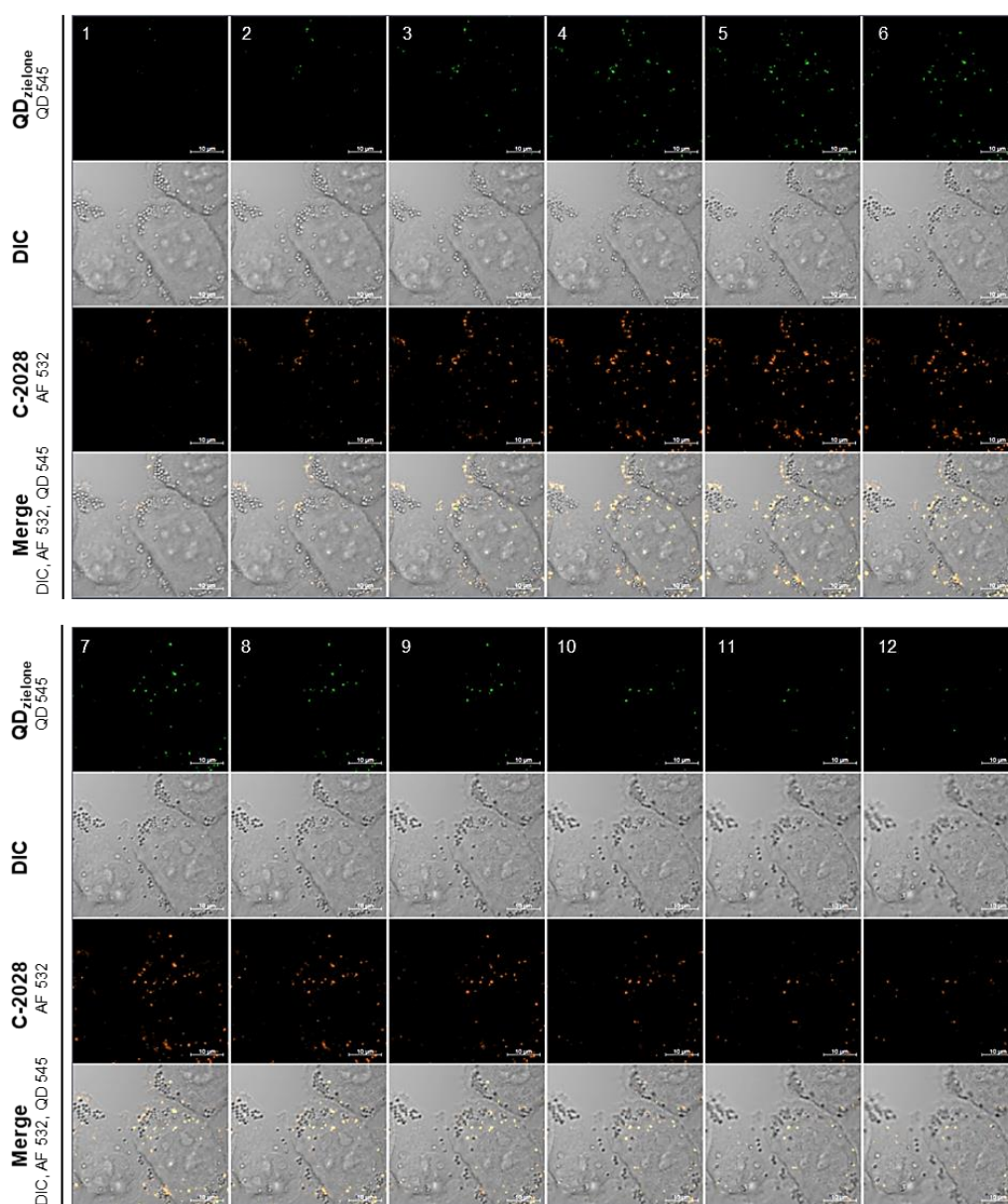
Doświadczenie wykonałam dla nowotworowej linii H460 dla: komórek poddanych ekspozycji C-2028 i jego koniugatem z QD_{zielonymi} (QD_{zielone}-C-2028) przez 24 h, w stężeniu IC₈₀ oraz komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem). Preparaty oglądałam z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (ZEISS LSM T-PMT) w świetle przechodzącym oraz w trybie fluorescencyjnym. W celu wykazania, że sygnał fluorescencyjny pochodzi wyłącznie od danego związku, przedstawiłam zdjęcia preparatów komórek dla poszczególnych filtrów: QD_{zielone} (filtr QD545), UAs (C-2028/C-2045 – Alexa Fluor 532), a także połączonych filtrów dla QD_{zielonych} i UAs oraz nałożonych wszystkich sygnałów z różniczkowym kontrastem interferencyjnym (ang. differential interference contrast, DIC) (Rysunek 16.).



Rysunek 16. Wnikanie C-2028 oraz jego koniugatu z QD_{zielonymi} (QD_{zielone}-C-2028) do komórek nowotworowej linii H460 po 24 h inkubacji, w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀. Kolor zielony jest reprezentatywny dla QD_{zielonych}, kolor pomarańczowy – C-2028, skala 10 µm

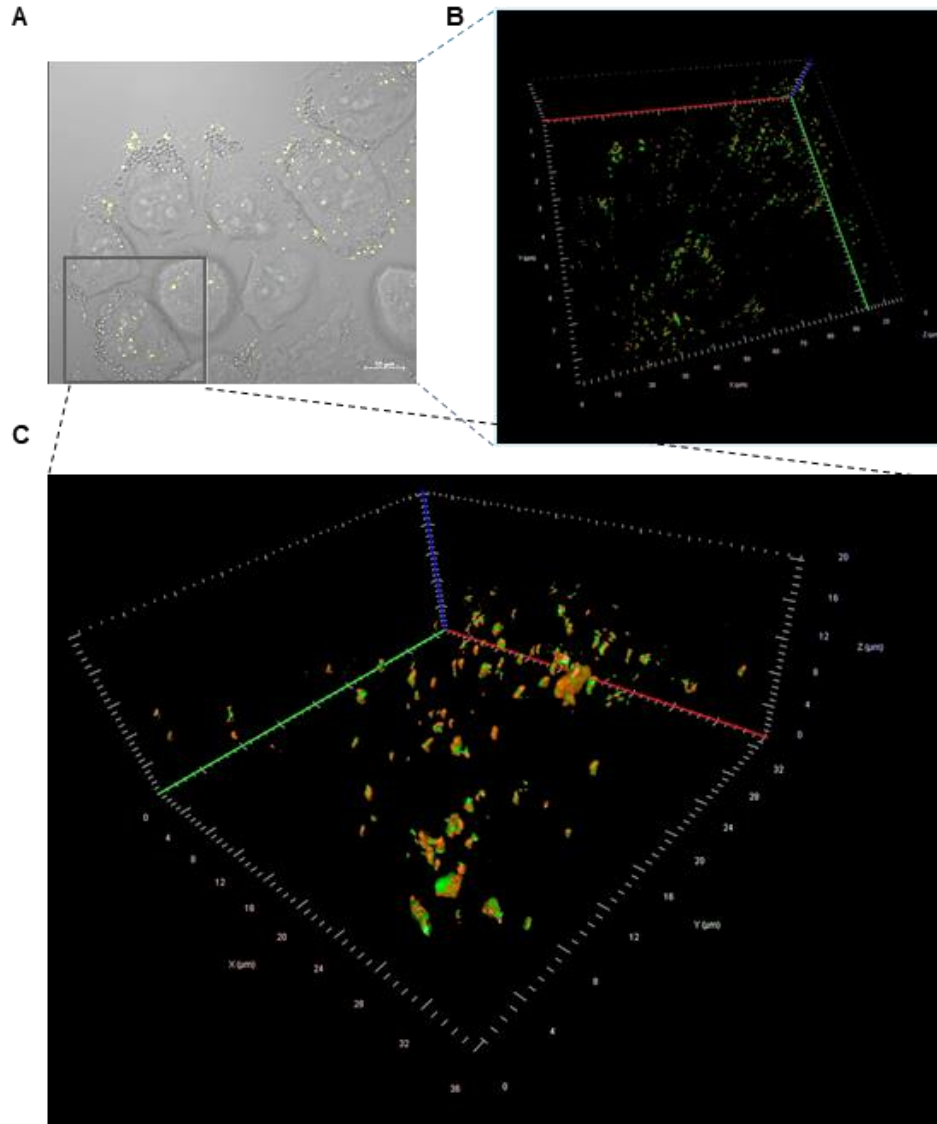
Związek C-2028, dostarczany w postaci koniugatu z QD_{zielonymi}, wnika do komórek nowotworowej linii H460 znacznie efektywniej, w porównaniu do jego nieskoniugowanej postaci. Dla komórek inkubowanych przez 24 h z C-2028 zaobserwowałam o wiele słabsze sygnały fluorescencyjne (kolor pomarańczowy, zaznaczony strzałkami) niż dla komórek traktowanych tą samą dawką chemioterapeutyku (w IC₈₀) ale dostarczanego w postaci koniugatu z QD_{zielonymi}.

Ze względu na fakt, iż związek C-2028 dostarczany jest efektywniej w postaci koniugatu z QD_{zielonymi} do komórek linii H460, postanowiłam sprawdzić w jakich przedziałach komórkowych lokalizują się poszczególne komponenty koniugatu. W tym celu wykonałam serię zdjęć reprezentujących przekroje optyczne przez komórki nowotworowej linii H460, traktowanej QD_{zielonymi}-C-2028, w stężeniu IC₈₀ przez 24 h, w krokach (1-12) co 0,3 µm (Rysunek 17.). Na Rysunku 18. przedstawiłam ten sam preparat w przekrojach optycznych w osi Z (Z-stack).



Rysunek 17. Przekroje optyczne przez komórki nowotworowej linii komórkowej H460, traktowane QD_{zielonymi}-C-2028 przez 24 h, w stężeniu IC₈₀. Kolor zielony reprezentuje QD_{zielone} (QD 545: wzbudzenie – 300 nm, emisja 543 nm) kolor pomarańczowy – C-2028 (AF 532: wzbudzenie – 528 nm, emisja 553 nm). Sekcje optyczne (1-12) zebrane w krokach co 0,3 µm, skala 10 µm

Analiza mikroskopowa przekrojów optycznych przez komórki linii H460 wykazała, że badany koniugat QD_{zielone}-C-2028, po wnikięciu do komórki, pozostaje w jej wnętrzu w cytoplaźmie w większości w postaci skoniugowanej oraz nie wnika do jądra komórkowego. Zaobserwowałam także poszczególne sygnały fluorescencyjne, pochodzące od nieobsadzonych kropek kwantowych (widoczne na zdjęciu z nałożonymi wszystkimi filtrami – kolor zielony), co może świadczyć o częściowym uwolnieniu związku z koniugatu.



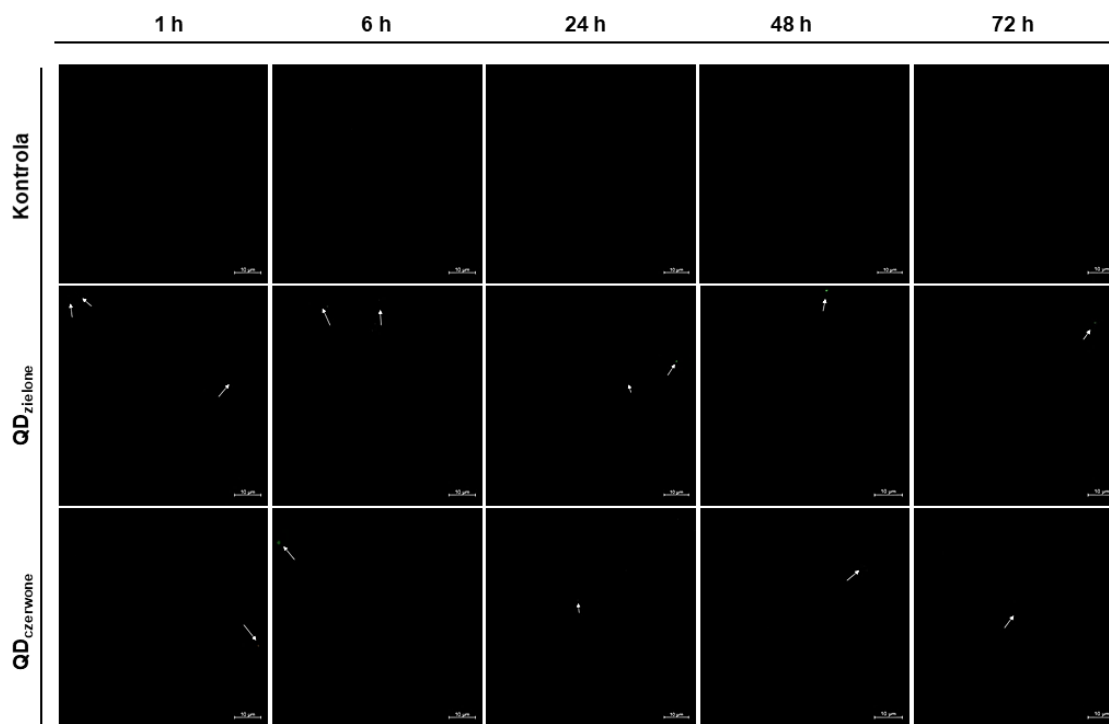
Rysunek 18. (A) przekroje optyczne w świetle przechodzącym (DIC) i w trybie fluorescencyjnym (Alexa Fluor 532, QD 545), (B) i (C) – (powiększone) przekroje optyczne w osi Z (Z-stack) przez komórki nowotworowej linii komórkowej H460, traktowane QD_{zielonymi}-C-2028 przez 24 h w stężeniu IC₈₀. Kolor zielony reprezentuje QD_{zielone} (QD 545: wzbudzenie – 300 nm, emisja 543 nm), kolor pomarańczowy – C-2028 (Alexa Fluor 532: wzbudzenie – 528 nm, emisja 553 nm). Sekcje optyczne zebrane w krokach co 0,3 µm; skala 10 µm

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie czy i jak szybko badane związki (w ich wolnej jak i skoniugowanej postaci) wnikają do komórek, a także sprawdzenie czy skoniugowanie UAs z QDs ma wpływ na szybkość ich wnikania i akumulację wewnątrz badanych komórek. W tym celu wykonałam zdjęcia preparatów po 1, 6, 24, 48 oraz 72 h, w stężeniu IC₈₀ (wyznaczonego dla nieskoniugowanych UAs dla komórek linii nowotworowych) dla komórek linii H460, HCT116,

MRC-5 oraz CCD 841 CoN. Przedstawione zdjęcia wykonałam w trybie fluorescencyjnym: kolor zielony jest reprezentatywny dla QDs (zielonych i czerwonych), natomiast pomarańczowy – dla UAs (C-2028/C-2045 w ich wolnej bądź skoniugowanej z QDs postaci).

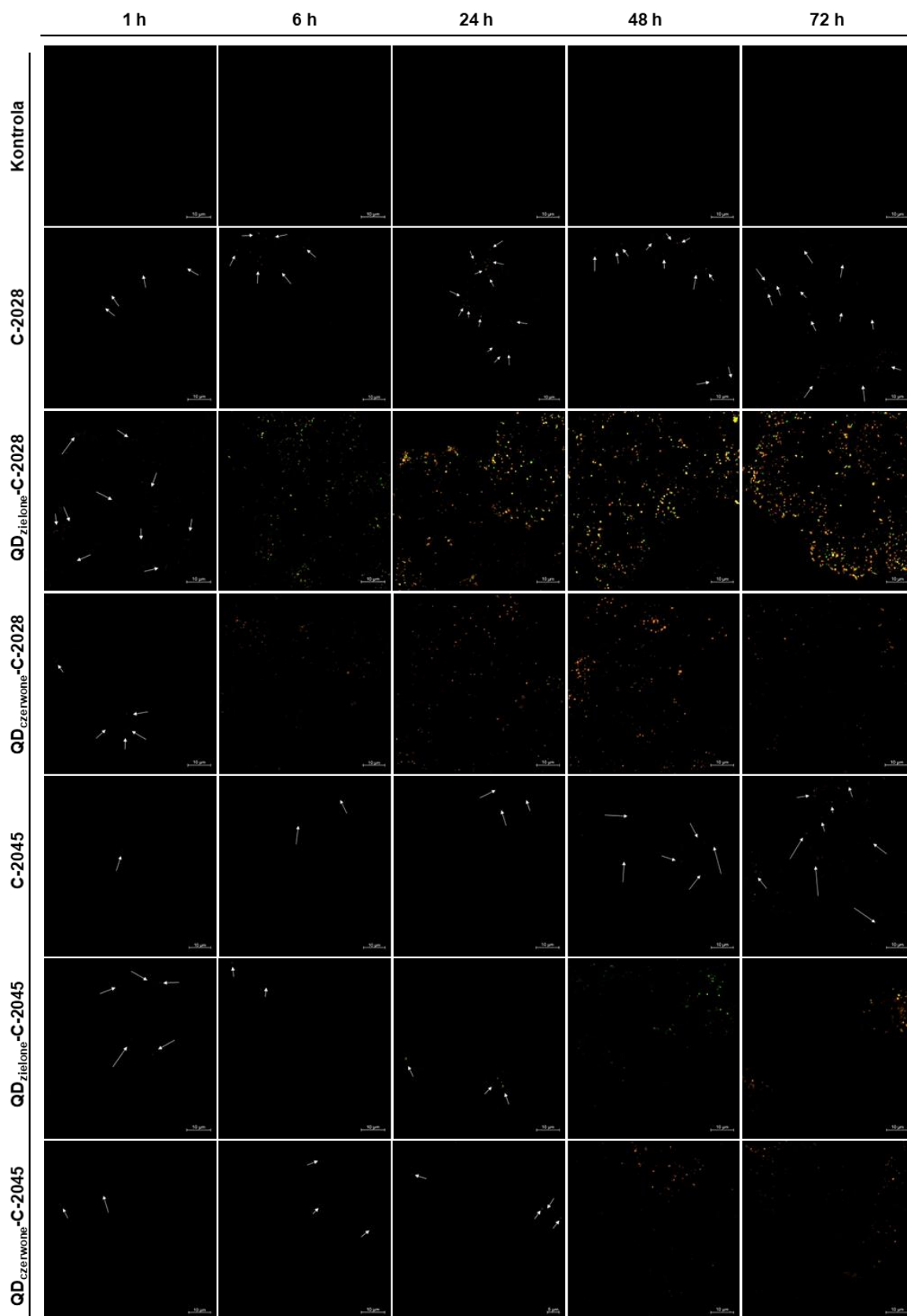
H460

Analiza zdjęć mikroskopowych wykazała, że zarówno zielone jak i czerwone kropki kwantowe (QDs) wnikają do komórek nowotworowej linii H460 począwszy od 1 h inkubacji (Rysunek 19.). Pojedyncze sygnały pochodzące od QDs (zaznaczone strzałkami) były jednak słabe i utrzymywały się na stosunkowo stałym poziomie, niezależnie od długości czasu inkubacji, jakim poddane były komórki. Długość czasu ekspozycji komórek linii H460 na działanie nieobsadzonych QD_{zielonych/czerwonych}, nie wpływała zatem na ich akumulację. W przypadku pozostałych badanych linii komórkowych, doszłam do podobnych wniosków. Zdjęcia po traktowaniu tych komórek z QDs umieściłam w Suplemencie niniejszej pracy (Rysunek S65-S67.).



Rysunek 19. Wnikanie QD_{zielonych} i QD_{czerwonych} do komórek nowotworowej linii H460 po 1, 6, 24, 48 oraz 72 h, w stężeniu IC₈₀ (stężenie QDs w koniugacie, odpowiadające IC₈₀ UAs w wolnej postaci). Kolor zielony reprezentuje QDs (sygnały zaznaczone strzałkami), skala 10 μm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Ilość sygnałów, pochodząca od C-2028 i C-2045, w komórkach linii H460 wzrastała stopniowo wraz z wydłużającym się czasem ich inkubacji ze związkami i była intensywniejsza dla związku C-2028 (Rysunek 20.). Pojedyncze sygnały fluorescencyjne (zaznaczone strzałkami) obserwowałam już w komórkach inkubowanych przez 1 h. Wzrost ilości i intensywności sygnałów fluorescencyjnych pochodzących od UAs był jednak stosunkowo niewielki.



Rysunek 20. Wnikanie UAs oraz ich koniugatów z QDs do komórek nowotworowej linii H460 po 1, 6, 24, 48 oraz 72 h inkubacji, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (C-2028/C-2045 w jego wolnej postaci). Kolor zielony reprezentuje QDs, kolor pomarańczowy – UAs; skala 10 μ m. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

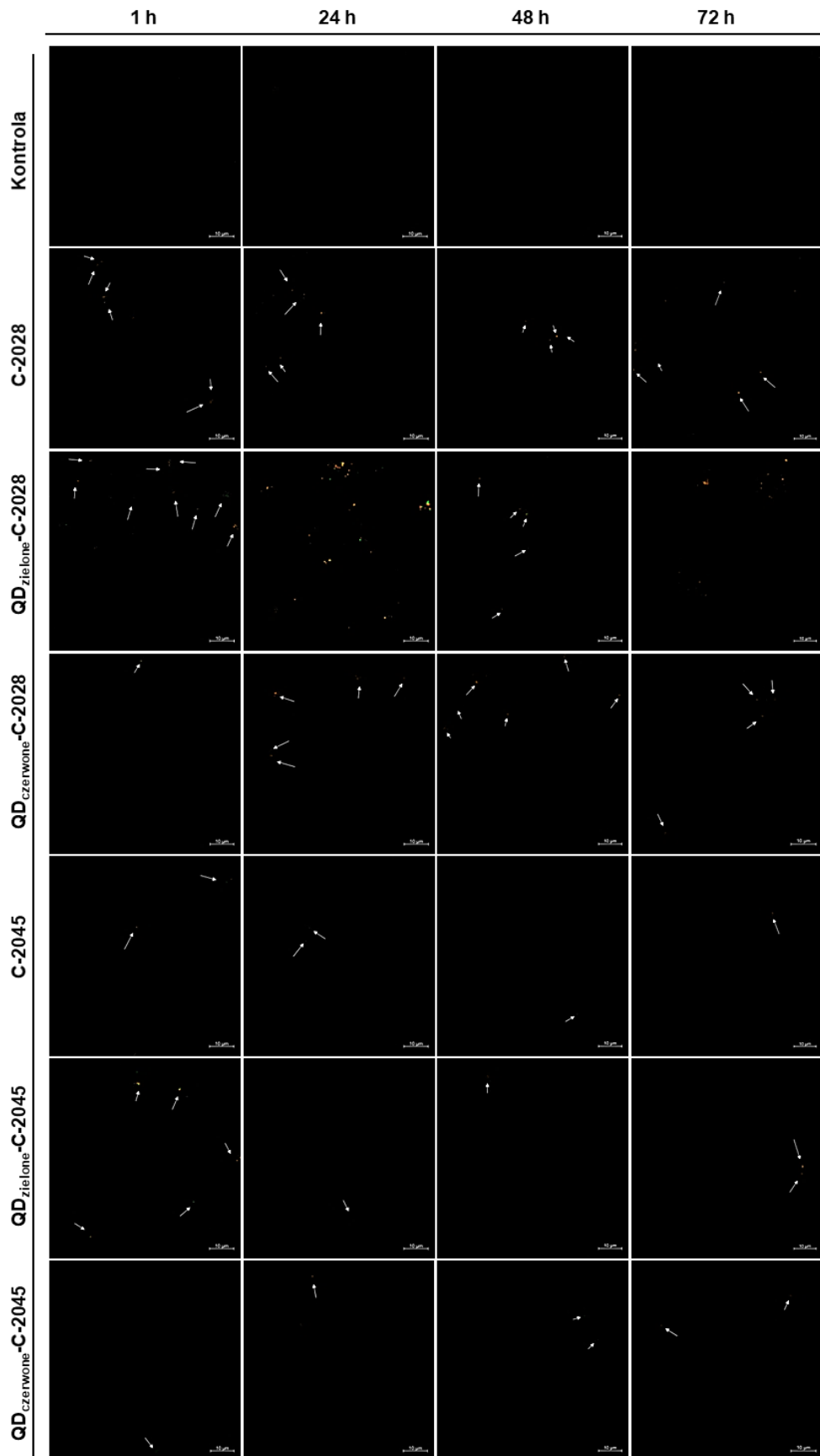
Skoniugowanie badanych związków (szczególnie C-2028) z QDs pozwoliło na ich znacznie efektywniejsze dostarczanie do komórek linii H460. Począwszy od 1 h inkubacji komórek z QDs-UAs, w stosunku do UAs w ich wolnej postaci, zaobserwowałam znaczny przyrost ilości i intensywności sygnałów fluorescencyjnych, pochodzących od QDs (kolor zielony) i UAs (kolor pomarańczowy). Co więcej, wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek z koniugatami QDs-UAs (głównie dla QD_{zielonych}-C-2028) ilość i intensywność tych sygnałów wzrastała. Może to świadczyć o tym, że skoniugowanie badanych związków z kropkami kwantowymi jako potencjalnymi nośnikami leków, pozwala nie tylko na efektywniejsze dostarczanie badanych chemioterapeutyków do komórek, ale także na ich akumulację wewnątrz komórek. W komórkach traktowanych QD_{czerwonymi}-C-2028 obserwowałam wzrost ilości i intensywności sygnałów fluorescencyjnych do 48 h inkubacji, po 72 h – następował ich spadek.

Skoniugowanie QDs z C-2045, pozwoliło na jego efektywniejsze dostarczenie do komórek, względem C-2045, w jego wolnej postaci. Ponadto, wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek z badanymi koniugatami (QDs-C-2045) ilość i intensywność sygnałów fluorescencyjnych, rosła (z wyjątkiem komórek traktowanych QD_{czerwonymi}-C-2045, gdzie najwyższą intensywność sygnałów od nich pochodzących zaobserwowałam po 48 h inkubacji - po dłuższym czasie (72 h) następował nieznaczny spadek ich intensywności). Sygnały fluorescencyjne, pochodzące od koniugatów QDs-C-2045, były znacznie słabsze, w porównaniu do komórek inkubowanych z QDs-C-2028. Intensywność fluorescencji, pochodząca od QD_{zielonych}-UAs jest wyższa niż dla koniugatów z QD_{czerwonymi}. Może być to związane z tym, że w skład QD_{zielonych} wchodzi więcej siarki (posiadającej właściwości luminescencyjne) oraz z tym, że na swojej powierzchni posiadają one mniej dostępnych miejsc do skoniugowania UAs (w porównaniu z QD_{czerwonymi}).

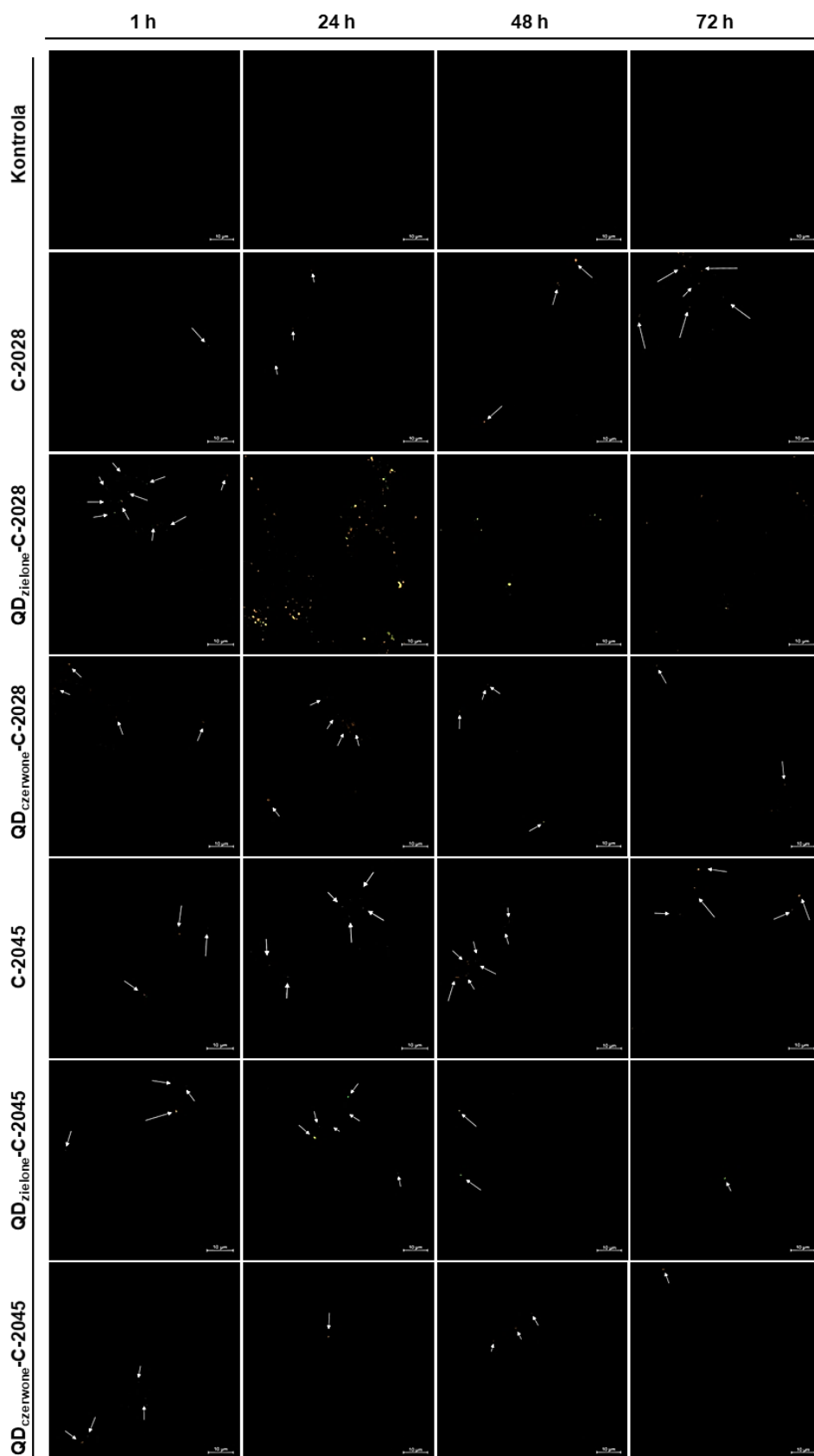
HCT116

Intensywność fluorescencji, pochodząca od C-2028, w komórkach linii HCT116 była słaba i utrzymywała się na stosunkowo stałym poziomie, niezależnie od długości czasu inkubacji. Sygnały pochodzące od C-2045 z kolei, były mniej intensywne od tych, pochodzących od C-2028. Skoniugowanie C-2028 z QD_{zielonymi} zwiększyło ilość związku dostarczanego do komórek, w porównaniu do C-2028 w jego wolnej postaci, ale tylko dla komórek inkubowanych przez 24 h. Dla pozostałych czasów inkubacji intensywność ta utrzymywała się na podobnym poziomie co dla komórek traktowanych C-2028. Dla koniugatów C-2028 z QD_{czerwonymi} nie zaobserwowałam natomiast zmian w ilości i intensywności fluorescencji, w porównaniu do C-2028, a nawet niewielki spadek dla komórek traktowanych przez 1 h.

Skoniugowanie C-2045 z QDs nie wpływało na zmianę ilości związku dostarczanego do komórek, niezależnie od czasu inkubacji. W przypadku komórek HCT116 traktowanych koniugatem QD_{czerwone}-C-2045 zaobserwowałam niewielki spadek intensywności fluorescencji, w porównaniu do C-2045 w jego wolnej postaci.



Rysunek 21. Wnikanie UAs oraz ich koniugatów z QDs do komórek nowotworowej linii HCT116 po 1, 24, 48 oraz 72 h inkubacji, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (C-2028/C-2045 w jego wolnej postaci). Kolor zielony reprezentuje QDs, kolor pomarańczowy – UAs; skala 10 μm . Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

MRC-5

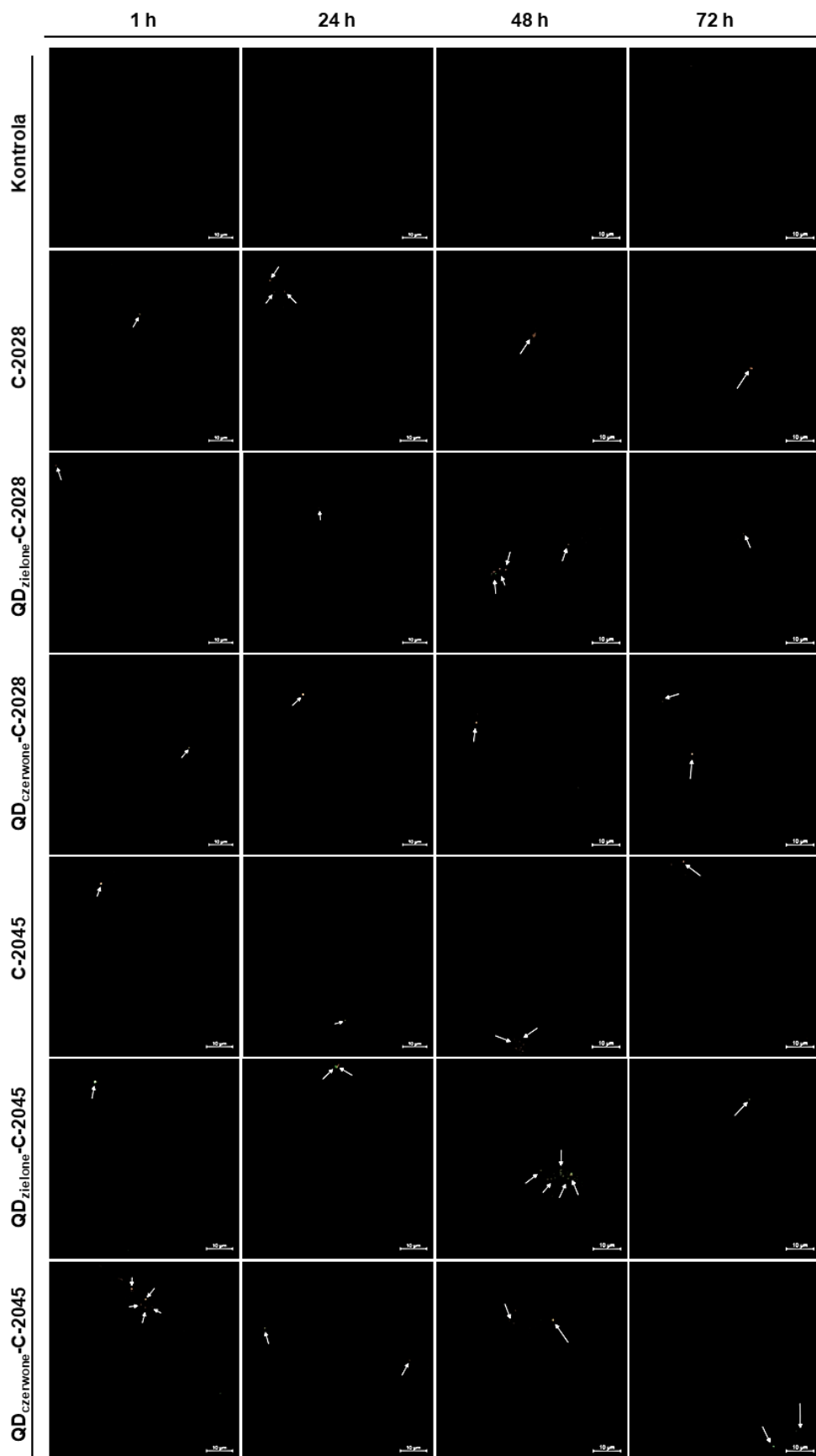
Rysunek 22. Wnikanie UAs oraz ich koniugatów z QDs do komórek prawidłowej linii MRC-5 po 1, 24, 48 oraz 72 h inkubacji, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} . Kolor zielony reprezentuje QDs, kolor pomarańczowy – UAs; skala 10 μ m. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Intensywność sygnałów fluorescencyjnych w komórkach prawidłowej linii MRC-5, pochodząca od C-2028 i C-2045, była słaba i utrzymywała się na stałym poziomie, niezależnie od długości czasu inkubacji komórek z badanymi związkami (Rysunek 22.). Skoniugowanie C-2028 z QDs, szczególnie z QD_{zielonymi}, zwiększyło ilość związku dostarczanego do komórek. Co ciekawe, najwyższą intensywność fluorescencji pochodzącą od QD_{zielonych}-C-2028 zaobserwowałam po 24 h inkubacji komórek z koniugatem. Dla dłuższych czasów ekspozycji (≥ 48 h) zaś, obserwowałam jej stopniowy spadek. Po 72 h inkubacji ilość i intensywność sygnałów fluorescencyjnych, pochodzących od QD_{zielonych} i C-2028, znacznie spadała, co może świadczyć o ich usuwaniu z komórki. Podobną tendencję zaobserwowałam dla komórek traktowanych QD_{czerwonymi}-C-2028, jednak sygnały od nich pochodzące były znacznie słabsze niż od QD_{zielonych}-C-2028. Najwyższą intensywność sygnałów fluorescencyjnych od nich pochodzących zaobserwowałam po 24 h inkubacji - dla dłuższych czasów inkubacji następował ich stopniowy spadek.

Skoniugowanie QDs z C-2045 nie zmieniło znacząco ilości związku dostarczanego do komórek, względem C-2045 w jego wolnej postaci, niezależnie od czasu inkubacji (z wyjątkiem QD_{czerwonych}-C-2045, gdzie obserwowałam nieznaczny spadek fluorescencji wraz z wydłużającym się czasem inkubacji).

CCD 841 CoN

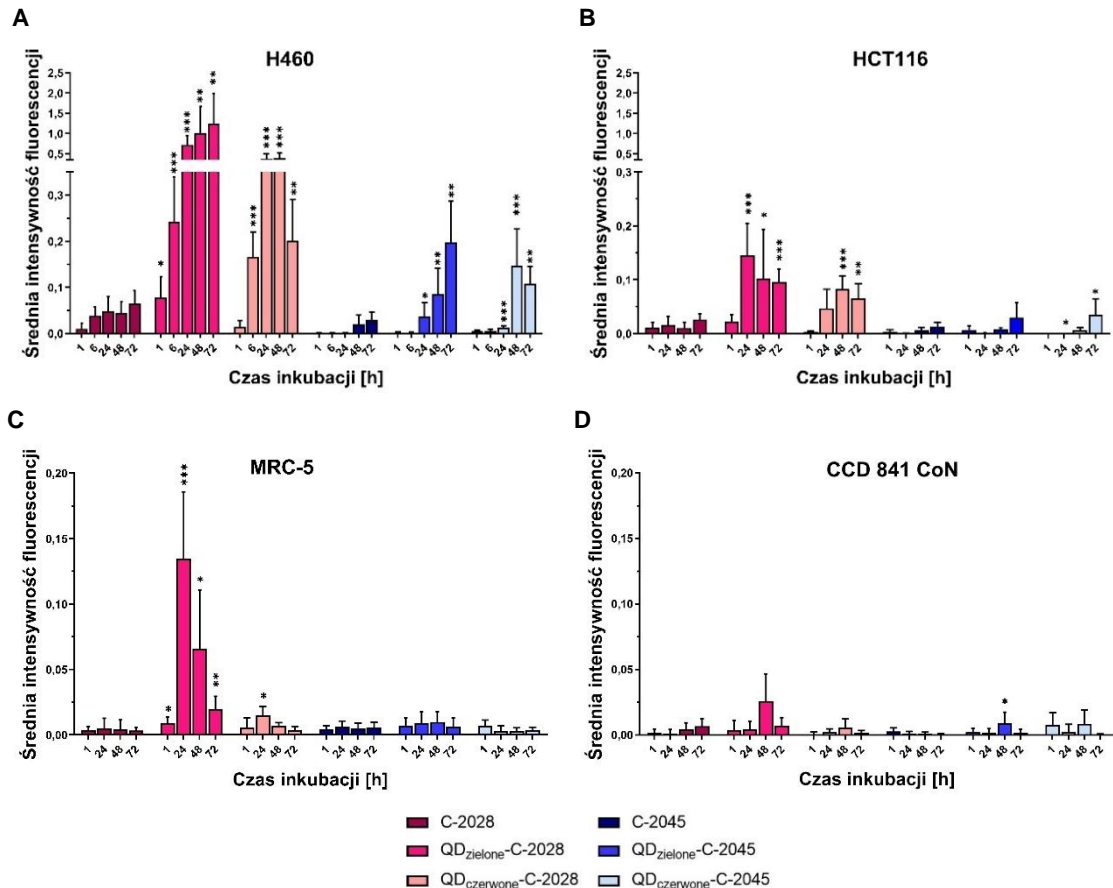
Ilość i intensywność sygnałów fluorescencyjnych w komórkach prawidłowej linii CCD 841 CoN pochodzących od związków, zarówno w ich wolnej jak i skoniugowanej postaci, była słaba i utrzymywała się, niezależnie od czasu inkubacji, na stosunkowo stałym poziomie (Rysunek 23.). Ponadto, intensywność obserwowanych sygnałów utrzymywała się na granicy wykrywalności, co może świadczyć o tym, że zarówno UAs jak i QDs-UAs dostarczane są do komórek linii CCD 841 CoN w niewielkich ilościach.



Rysunek 23. Wnikanie UAs oraz ich koniugatów z QDs do komórek prawidłowej linii CCD 841 CoN po 1, 24, 48 oraz 72 h inkubacji, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} . Kolor zielony reprezentuje QDs, kolor pomarańczowy – UAs; skala 10 μm . Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Podsumowanie

Zarówno QD_{zielone} jak i QD_{czerwone} wnikały do komórek badanych linii: H460, HCT116, MRC-5 i CCD 841 CoN, jednak intensywność ich fluorescencji była bardzo słaba (Rysunek 24.). Badane UAs, w ich wolnej postaci, wnikały efektywniej do nowotworowych komórek (H460 i HCT116) niż do ich prawidłowych odpowiedników (MRC-5 i CCD 841 CoN). Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji ilość i intensywność sygnałów fluorescencyjnych rosła – zwłaszcza dla związku C-2028 w komórkach nowotworu płuc (H460) i jelit (HCT116).



Rysunek 24. Średnia intensywność fluorescencji pochodząca od UAs w wolnej oraz skoniugowanej z QDs postaci (QDs-UAs) po ich wnikięciu do komórek linii: (A) H460, (B) HCT116, (C) MRC-5 i (D) CCD 841 CoN. Komórki traktowane były badanymi związkami w stężeniu odpowiadającym IC₈₀ UAs w ich wolnej postaci przez 1, 6, 24, 48 i 72 h. Intensywność fluorescencji wyznaczona na podstawie zdjęć mikroskopowych z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

Skoniugowanie UAs z QDs pozwoliło na znaczne zwiększenie ilości związku dostarczanego do komórek (w szczególności dla komórek nowotworu płuc). W przypadku linii H460 zaobserwowałam wzrost ilości i intensywności sygnałów pochodzących od wszystkich koniugatów (zarówno QD_{zielonych} i QD_{czerwonych} z C-2028 i C-2045). Dla komórek linii HCT116 i MRC-5 tendencję tę zaobserwowałam jedynie dla koniugatu QD_{zielonych}-C-2028. Ponadto, w komórkach nowotworu jelita grubego największą różnicę w ilości i intensywności sygnałów, pomiędzy QD_{zielonymi}-C-2028 a C-2028 zaobserwowałam po 24 h inkubacji, dla pozostałych czasów wartość ta była porównywalna. Może to świadczyć o tym, że skoniugowanie kropek kwantowych z UAs (zwłaszcza C-2028) pozwala na efektywniejsze dostarczanie związku do

komórek, natomiast po dłuższym czasie (>24 h) komórka usuwa związek na zewnątrz bądź też go metabolizuje. Skoniugowanie UAs z QDs z kolei, nie wpływało w sposób znaczący, na zwiększenie ilości dostarczanego związku do komórek linii CCD 841 CoN (z wyjątkiem komórek inkubowanych przez 48 h z QD_{zielonymi}-C-2045).

Badane związki w ich wolnej jak i skoniugowanej z nanocząstkami postaci wnikały efektywniej do komórek nowotworowej linii H460, w porównaniu do jej prawidłowego odpowiednika – linii MRC-5. Ilość i intensywność sygnałów, pochodzących od badanych związków (głównie C-2028) skoniugowanych z QD_{zielonymi}, w komórkach H460 wraz z wydłużającym się czasem inkubacji wzrastała – pozwalając na jego akumulację w komórkach (dla koniugatów UAs z QD_{czerwonymi} maksymalną intensywność fluorescencji pochodzącą od koniugatów obserwowałam po 48 h inkubacji, po 72 h – malała). Znaczącą różnicę w intensywności fluorescencji po skoniugowaniu UAs z QDs w komórkach MRC-5 zaobserwowałam jedynie dla QD_{zielonych}-C-2028 (w porównaniu do C-2028), była ona jednak znacząco niższa niż w komórkach linii H460. Ponadto, najintensywniejsze sygnały obserwowałam po 24 h – dla dłuższych czasów inkubacji były one słabsze. Może to świadczyć to o tym, że komórki prawidłowej linii MRC-5 usuwają związek na zewnątrz komórki, bądź też go metabolizują – w przeciwieństwie do komórek nowotworowej linii H460.

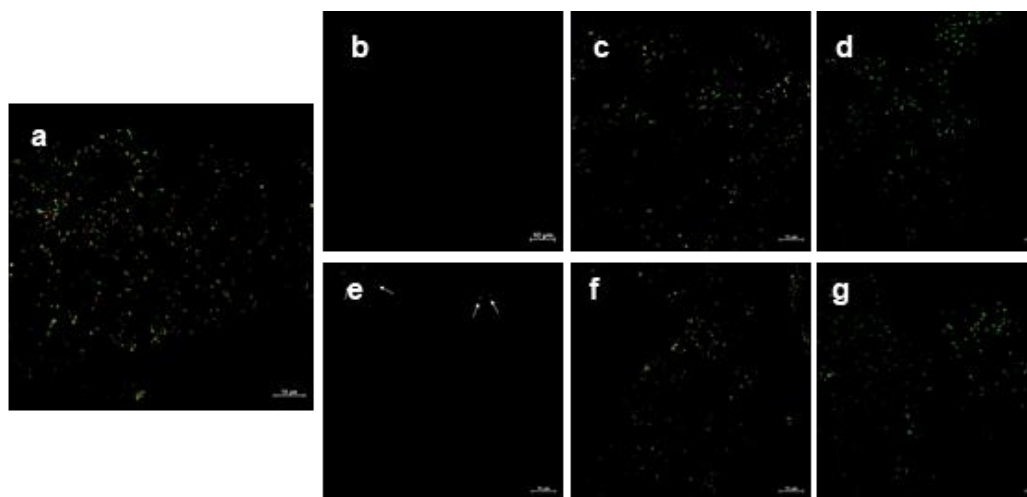
Dane te, korelują się z wynikami cytotoksyczności (Rysunek 15.), gdzie skoniugowanie UAs z QDs, w porównaniu do UAs w ich wolnej postaci, pozwoliło z jednej strony na zwiększenie ich cytotoksyczności względem nowotworowej linii H460, a z drugiej na jej obniżenie wobec prawidłowych linii MRC-5 i CCD 841 CoN, wykazując tym samym efekt ochronny.

3.2.2. Określenie mechanizmu wnikania QDs-UAs do komórek nowotworowych i prawidłowych

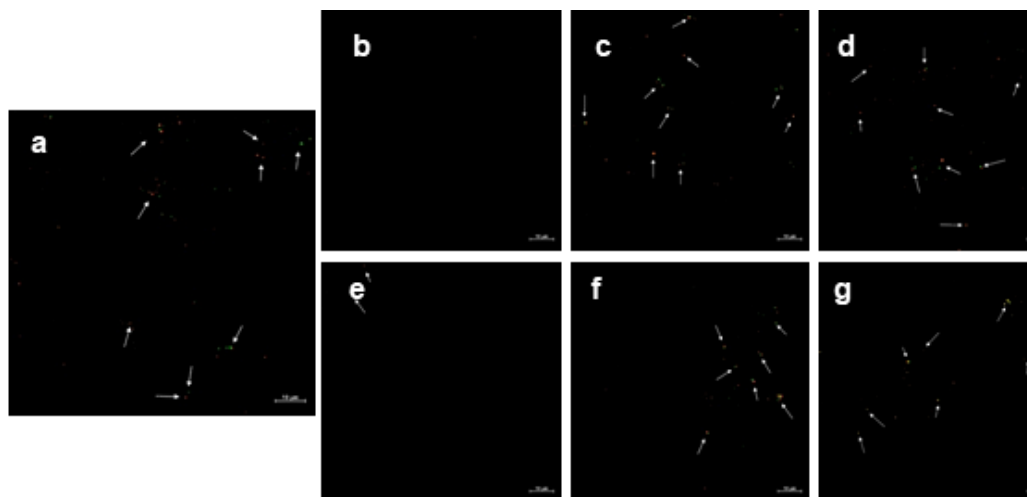
Ze względu na fakt, że koniugaty QDs-UAs dostarczane są do badanych komórek z różną efektywnością (szczególnie w przypadku komórek linii H460), celem kolejnego eksperymentu było zbadanie mechanizmu ich wnikania. W tym celu zastosowałam inhibitory różnych rodzajów endocytozy. Komórki linii nowotworowych (H460 i HCT116) oraz linii prawidłowej (MRC-5) poddałam 30 minutowej preinkubacji z: Cytochalazyną D (hamującą makropinocytózę/fagocytózę – inhibitor polimeryzacji aktyny), Amilorydem (inhibującym makropinocytózę (MP) – inhibitor wymiany Na⁺/H⁺), Dynasorem (inhibującym endocytozę zależną od klatryn (CME) – inhibitor aktywności GTPazy dynaminy), Pitstop 2 (inhibującym CME – blokuje dostęp ligandów do terminalnych domen klatryny), Filipiną III (inhibującą endocytozę zależną od kaweolin (CavME) – inhibitor czynnika wiążącego sterole, powodującego „demontaż” kaweoli) oraz temperaturą (4 °C, inhibitor procesów zależnych od energii), a następnie dodawałam QD_{zielone}-C-2028, w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ i inkubowałam przez kolejne 4 h. Stężenia badanych inhibitorów były nietoksyczne (wyznaczone na podstawie danych literaturowych (Engelberg S., 2018) oraz potwierdzone w teście MTT). Preparaty oglądałam z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (ZEISS LSM T-PMT) w trybie fluorescencyjnym, a średnią intensywność fluorescencji pochodzącej od badanych koniugatów wyznaczałam przy zastosowaniu oprogramowania ImageJ.

A

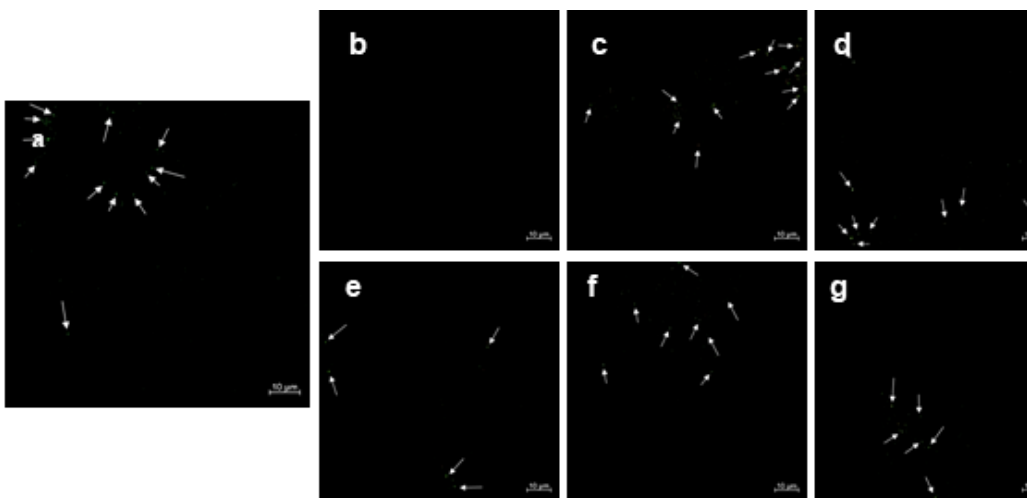
H460



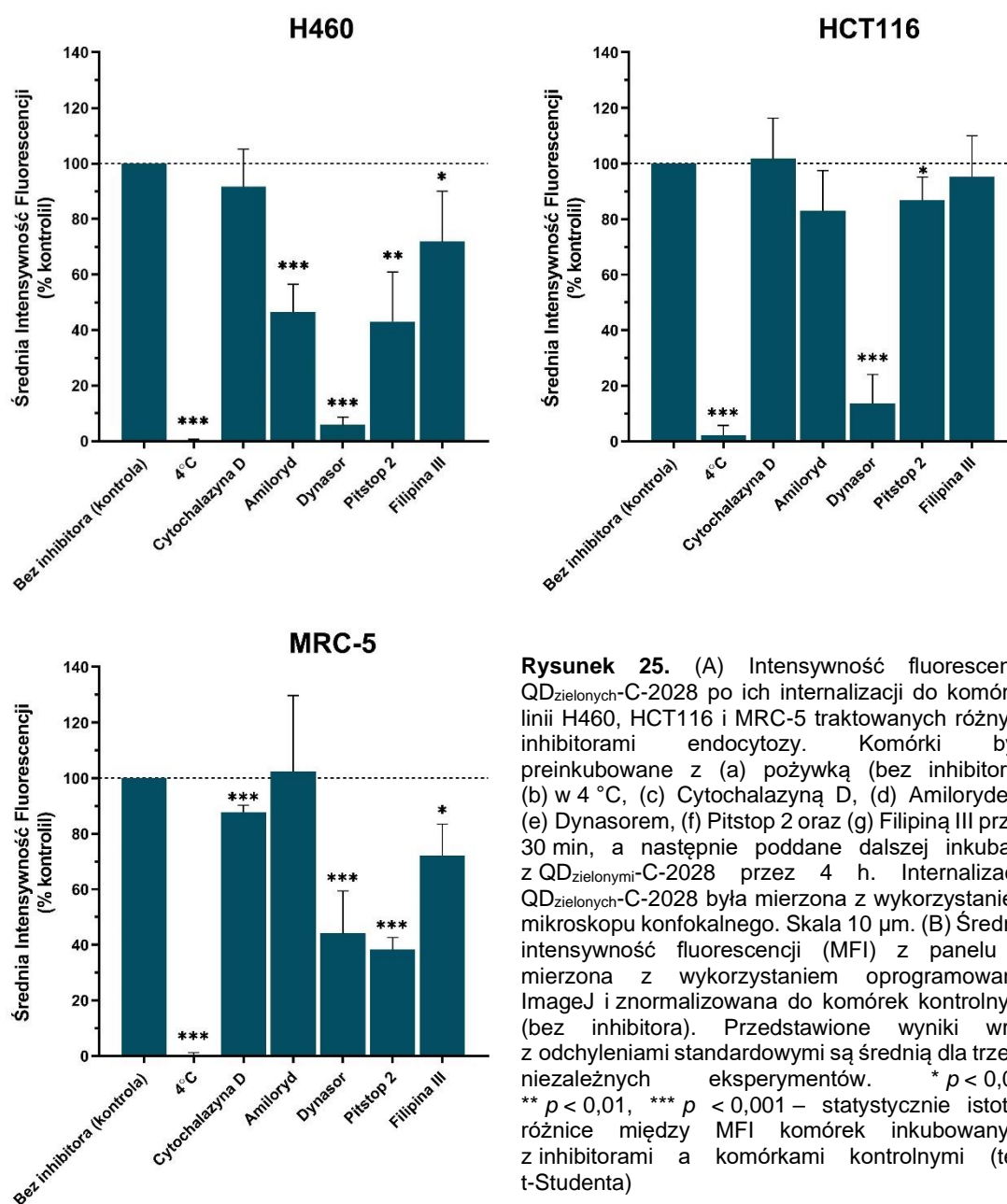
HCT116



MRC-5



B



Rysunek 25. (A) Intensywność fluorescencji QDzielonych-C-2028 po ich internalizacji do komórek linii H460, HCT116 i MRC-5 traktowanych różnymi inhibitorami endocytozy. Komórki były preinkubowane z (a) pożywką (bez inhibitora), (b) w 4 °C, (c) Cytochalazyną D, (d) Amilorydem, (e) Dynasorem, (f) Pitstop 2 oraz (g) Filipiną III przez 30 min, a następnie poddane dalszej inkubacji z QDzielonymi-C-2028 przez 4 h. Internalizacja QDzielonych-C-2028 była mierzona z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Skala 10 μ m. (B) Średnia intensywność fluorescencji (MFI) z panelu A mierzona z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ i znormalizowana do komórek kontrolnych (bez inhibitora). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi są średnią dla trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – statystycznie istotne różnice między MFI komórek inkubowanych z inhibitorami a komórkami kontrolnymi (test t-Studenta)

Rysunek 25. przedstawia średnią intensywność fluorescencji pochodzącą od QDzielonych-C-2028, po ich internalizacji do komórek linii H460, HCT116 oraz MRC-5 traktowanych różnymi inhibitorami endocytozy. W przypadku komórek linii CCD 841 CoN nie wykonywałam eksperymentu z uwagi na fakt, że sygnały pochodzące od UAs jak i QDs-UAs w komórkach tej linii wykazywały niską intensywność (na granicy wykrywalności), a co za tym idzie uzyskane wyniki mogłyby być obarczone dużym błędem.

We wszystkich badanych liniach komórkowych proces wnikania QDzielonych-C-2028 do komórek jest silnie zależny od energii oraz nie zależy od polimeryzacji aktyny (z wyjątkiem MRC-5). W komórkach linii H460 poddanych działaniu Amilorydu, Dynasoru, Pitstop 2 oraz Filipiny III zaobserwowałam znaczący spadek (istotny statystycznie) w internalizacji

QD_{zielonych}-C-2028. Oznacza to, że badany koniugat wnika do komórek linii H460 trzema ścieżkami endocytozy: makropinocytozy, endocytozy zależnej od kaweolin oraz klatryn. Co więcej, zarówno Dynasor jak i Pitstop 2, będące inhibitorami CME na różnych jej etapach, hamują internalizację QD_{zielonych}-C-2028. Może to świadczyć o tym, że krytycznymi momentami internalizacji badanych koniugatów na drodze CME, do komórek linii H460, jest zarówno tworzenie się pęcherzyka endocytarnego (którego inhibitorem jest Dynasor) jak i kosza klatrynowego (inhibitor – Pitstop 2).

Internalizacja QD_{zielonych}-C-2028 do komórek linii HCT116 natomiast zależna jest, istotnie statystycznie, od CME. Komórki poddane działaniu inhibitorów: Dynasoru oraz Pitstop 2 zahamowują ten rodzaj endocytozy, jednak w niższym stopniu niż w przypadku komórek linii H460. W przypadku zastosowania Amilorydu oraz Filipiny III, nie zaobserwowałam znaczącego zahamowania internalizacji badanego koniugatu do komórek badanej linii.

Internalizacja QD_{zielonych}-C-2028 do komórek linii MRC-5 zahamowywana była, istotnie statystycznie, w przypadku zastosowania Cytochalazyny D, Dynasoru, Pitstop 2 oraz Filipiny III. Świadczy to o tym, że badany koniugat wnika do komórek na drodze MP, CME oraz CavME. Pośród wszystkich badanych linii komórkowych Dynasor hamował internalizację QD_{zielonych}-C-2028 w najniższym stopniu.

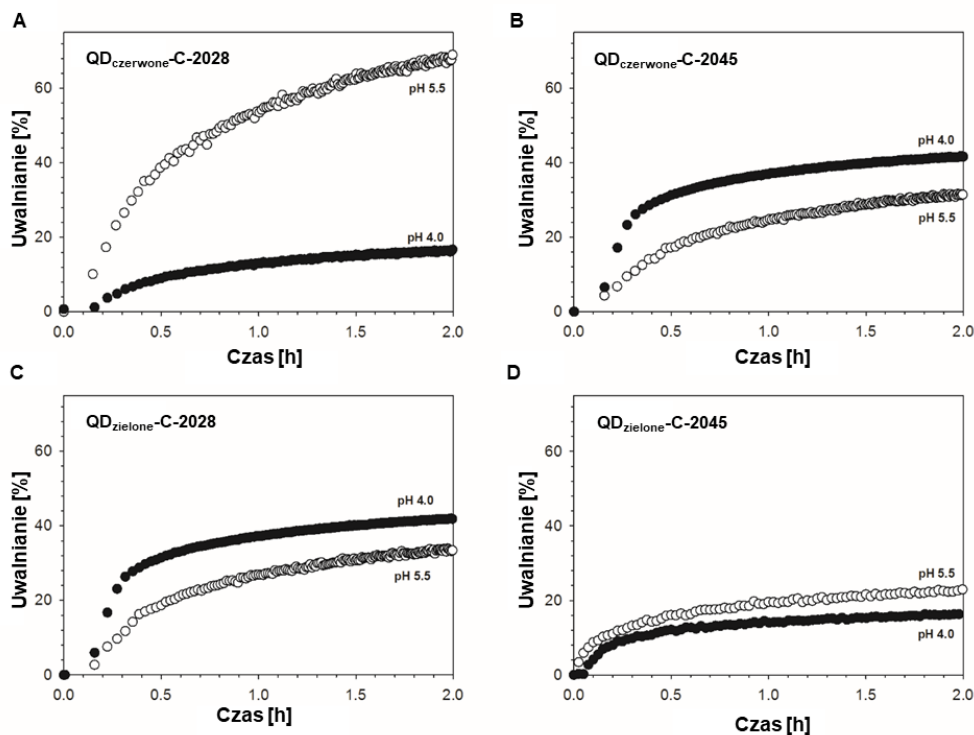
Ponadto, zarówno w przypadku komórek linii HCT116 jak i MRC-5, w przeciwieństwie do komórek linii H460, wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek z badanym koniugatem (QD_{zielonych}-C-2028), spada jego ilość (Rysunek 24.). Może to świadczyć o tym, że komórki te „wyrzucają” go na zewnątrz bądź też go metabolizują. W komórkach tych także, zaobserwowałam spadek cytotoksyczności QDs-UAs, w porównaniu do UAs w ich wolnej postaci. Zwiększona internalizacja, zachodząca na drodze różnych rodzajów endocytozy, koniugatów QDs-UAs w komórkach H460 może być zatem odpowiedzialna za zwiększenie aktywności cytotoksycznej badanych związków po skoniugowaniu ich z QDs.

3.3. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja QDs-UAs i ich uwalnianie w zależności od pH

W większości przypadków NPs i koniugaty chemioterapeutyków z NPs wnikają do komórki na zasadzie endocytozy, zmienia się wówczas pH mikrośrodowiska z około 7,4, panującego w środowisku zewnątrzkomórkowym, do 6,0–5,0 – we wczesnych endosomach, a po przyłączeniu pęcherzyków hydrolazowych, zawierających enzymy trawienne, wartość pH spada do około 4,5–4,0 (w lizosomach) (Deng J., 2016; Li Z., 2017). Uwalnianie badanych niesymetrycznych bisakrydyn z ich koniugatów z kropkami kwantowymi, zależne jest od pH środowiska. Zmiana pH w komórkach może przyczynić się zaś do uwalniania chemioterapeutyku z koniugatu, zwłaszcza gdy związek pozostaje w komórce przez dłuższy czas (Peng F., 2017).

W ramach współpracy, członkowie Zespołu prof. Anny Nowickiej wykonali badania, mające na celu sprawdzenie wpływu pH środowiska na uwalnianie *in vitro* UAs z koniugatów z QDs (QDs-UAs), w zależności od czasu (w systemie bezkomórkowym) (Rysunek 26.). W warunkach fizjologicznych (pH 7,4) wszystkie koniugaty były stabilne. W pH wynoszącym zaś 5,5 oraz 4,0, które odpowiadają pH odpowiednio w endosomach i lizosomach, związki uwalniały

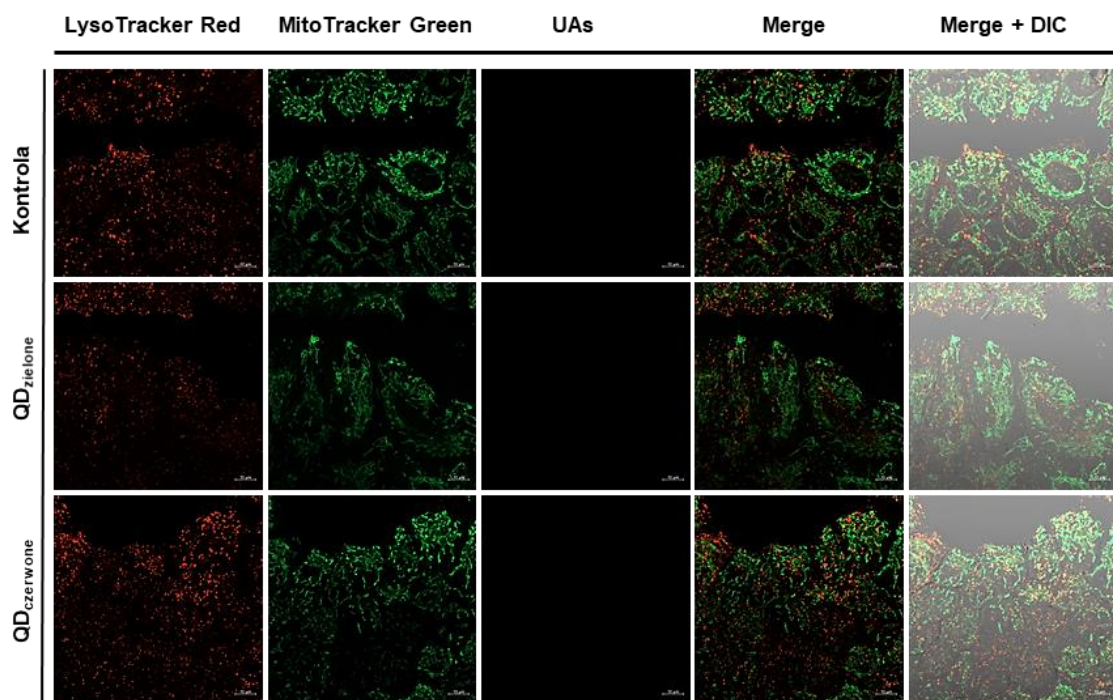
się z koniugatów. Uwalnianie się C-2045 z koniugatu z QD_{czerwonymi} było wyższe, zarówno w roztworze o pH 4,0 jak i 5,5, niż koniugatu z QD_{zielonymi}. Dla koniugatów C-2028 z QDs zaś, uwalnianie było intensywniejsze w roztworze o pH 5,5 dla QD_{czerwonych}, a w przypadku QD_{zielonych} w roztworze o pH 4,0 (Pilch J., 2020).



Rysunek 26. Profil uwalniania *in vitro* UAs z koniugatów QDs-UAs w systemie bezkomórkowym: (A) QD_{czerwone}-C-2028, (B) QD_{czerwone}-C-2045, (C) QD_{zielone}-C-2028, (D) QD_{zielone}-C-2045 w roztworach o pH: 4,0 i 5,5 [doświadczenie wykonane w Zespole prof. Anny M. Nowickiej z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego] (Pilch J., 2020)

We wstępnych badaniach lokalizacji badanych związków i ich koniugatów (Rysunek 18.) stwierdziłam, że nie „wchodzą” one do jądra komórkowego, lokalizując się w „strukturach pęcherzykowych” w cytoplazmie komórki. W celu sprawdzenia, gdzie w komórce lokalizują się UAs, QDs i QDs-UAs oraz czy indukują zmiany w ilości lizosomów i morfologii mitochondriów, zarówno w nowotworowych jak i w prawidłowych komórkach, wykonałam przyżyciowe barwienie organelli komórkowych. LysoTracker Red DND-99 jest barwnikiem, który pozwala na znakowanie i śledzenie kwaśnych organelli w komórkach. MitoTracker Green FM zaś, przenika przez błony plazmatyczne i akumuluje się w mitochondriach niezależnie od ich potencjału błonowego, pozwalając tym samym na określenie ich morfologii.

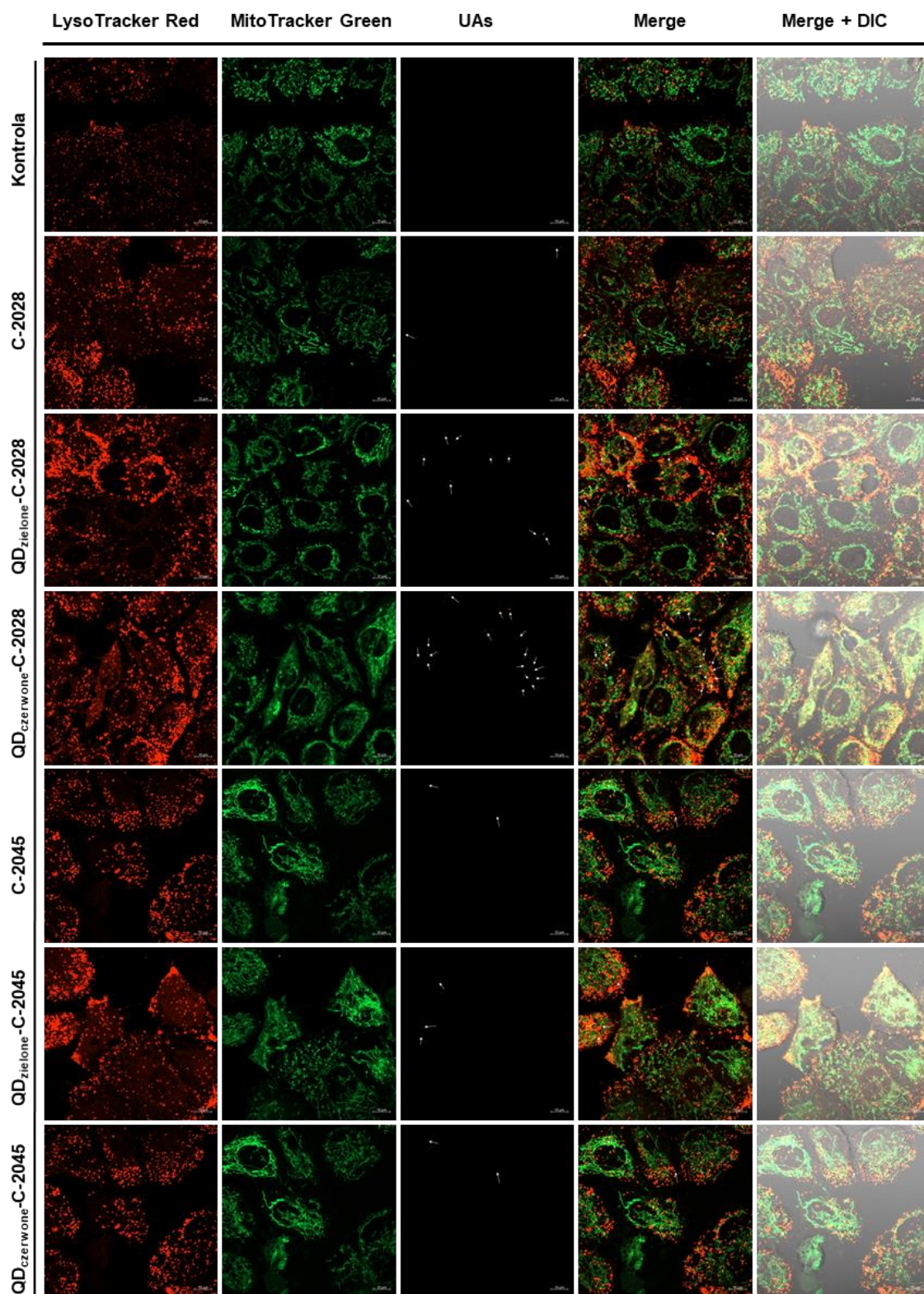
Barwienie organelli komórkowych wykonałam dla komórek wszystkich badanych linii, traktowanych odpowiednim wariantem związku, w stężeniu IC₈₀ (wyznaczonym dla nieskoniugowanych UAs dla komórek linii nowotworowych) przez 72 h. Przedstawione zdjęcia zostały wykonane w świetle przechodzącym (DIC) oraz trybie fluorescencyjnym. Kolor zielony jest reprezentatywny dla mitochondriów, czerwony – dla lizosomów, pomarańczowy – dla UAs (pochodzący od związków C-2028/C-2045 w ich wolnej bądź skoniugowanej z QDs postaci).

H460

Rysunek 27. Komórki nowotworowej linii H460 - kontrolne oraz traktowane QD_{zielonymi} i QD_{czerwonymi} (w stężeniu odpowiadającym IC₈₀ badanych UAs w koniugacie) przez 72 h. Obraz z mikroskopu konfokalnego: lizosomy wybarwione na czerwono (LysoTracker Red DND-99), mitochondria – na zielono (MitoTracker Green FM), UAs – na pomarańczowo (własna fluorescencja), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów

Zdjęcia mikroskopowe wskazują (Rysunek 27.), że zarówno zielone jak i czerwone kropki kwantowe (QDs), w porównaniu do komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem) nowotworowej linii H460, nie indukowały znaczących zmian w liczbie i intensywności sygnałów, pochodzących od kwaśnych organelli oraz w morfologii komórek (DIC). Zaobserwowałam natomiast niewielką zmianę w morfologii mitochondriów w przypadku komórek poddanych ekspozycji na QD_{zielone}, w porównaniu do komórek kontrolnych. Stały się one „bardziej rozciągnięte” i miejscami „tworzyły skupiska”. Zmian tych natomiast nie zaobserwowałam dla komórek traktowanych QD_{czerwonymi}. W przypadku pozostałych badanych linii komórkowych (HCT116, MRC-5 oraz CCD 841 CoN), analiza zdjęć mikroskopowych wskazuje, że zarówno zielone jak i czerwone QDs nie wpływały znacząco na zmianę ilości i intensywności sygnałów pochodzących od barwnika LysoTracker Red DND 99, jak również zmian w morfologii komórek (DIC) i mitochondriów (Mitotracker Green FM), względem komórek kontrolnych (Rysunek S68-S70.).

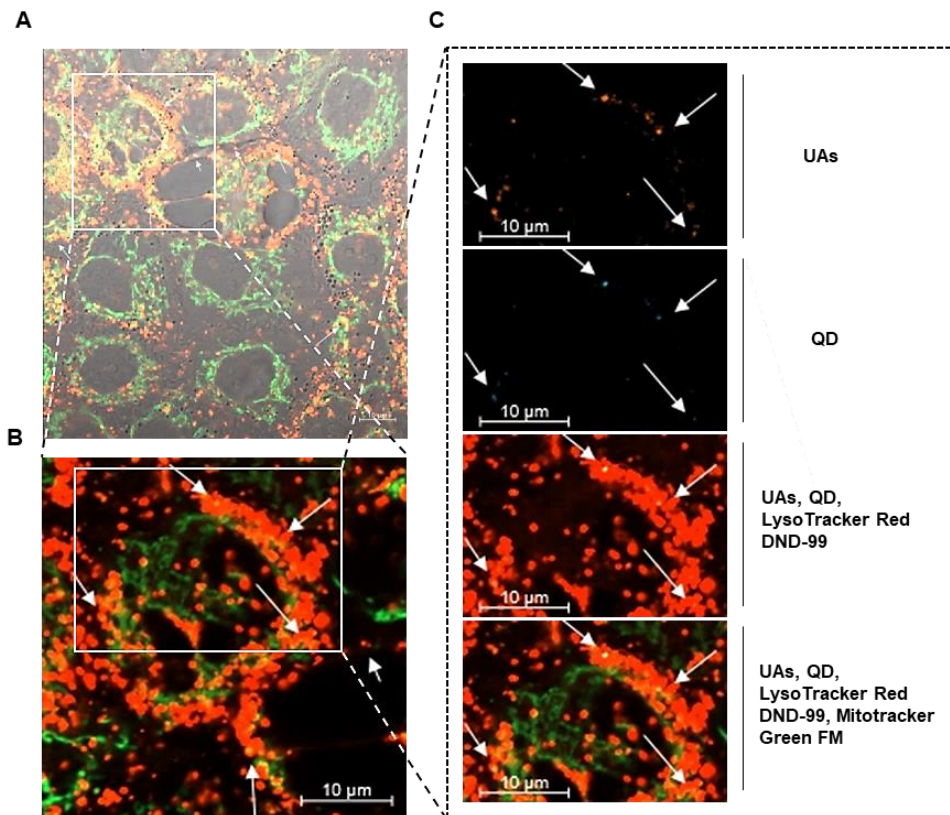
W komórkach linii H460, traktowanych nieskoniugowanym związkiem C-2028/C-2045, zaobserwowałam wzrost ilości i intensywności sygnałów pochodzących od kwaśnych organelli (LysoTracker Red DND-99), względem komórek kontrolnych (Rysunek 28.). Widoczne były również niewielkie zmiany w morfologii mitochondriów (głównie dla C-2045).



Rysunek 28. Obraz z mikroskopu konfokalnego, w świetle przechodzącym oraz trybie fluorescencyjnym, komórek nowotworowej linii H460, traktowanych C-2028/C-2045 oraz ich koniugatami z QD_{zielonymi} i QD_{czerwonymi} przez 72 h, w stężeniu IC₈₀. Lizosomy wybarwione na czerwono (LysoTracker Red DND-99), mitochondria – na zielono (MitoTracker Green FM), UAs – na pomarańczowo (zaznaczone strzałkami, własna fluorescencja), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów

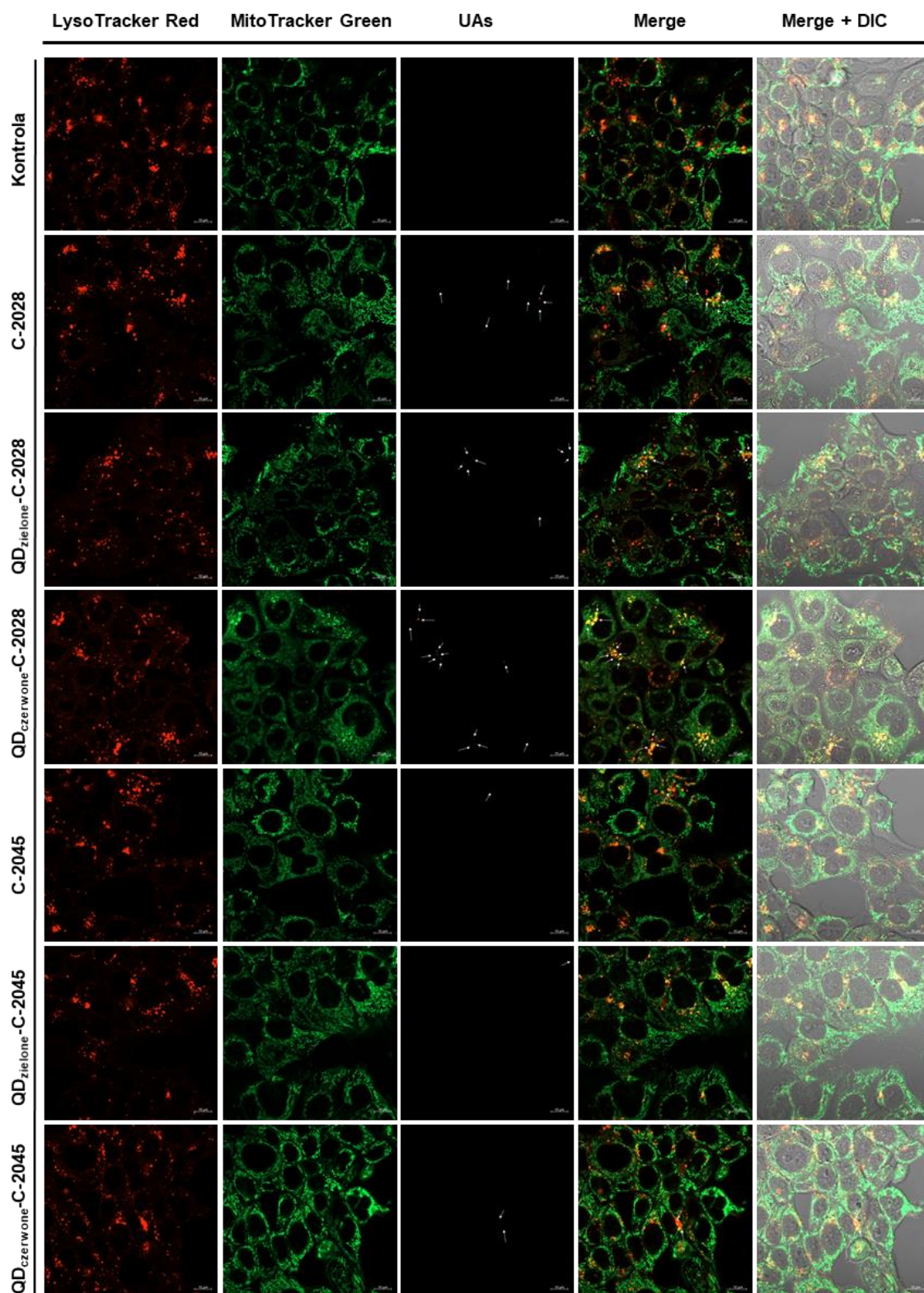
Skoniugowanie UAs z QDs spowodowało istotny wzrost ilości i intensywności sygnałów pochodzących od kwaśnych organeli w komórkach linii H460, którym towarzyszyły również zmiany w morfologii mitochondriów. Straciły one jednorodny charakter (część z nich „przyjęła” kształt sferoidów), a ich granice stały się „mniej wyraźne”.

Na podstawie zdjęć mikroskopowych można zaobserwować, że sygnały pochodzące od UAs (zaznaczone strzałkami), pochodzące zarówno od związków w ich skoniugowanej jak i wolnej postaci, nakładają się z sygnałami pochodzącymi od lizosomów. Świadczy to o tym, że związki te, po wnikięciu do komórek, lokalizują się w lizosomach. Ponadto, wzrostowi ilości sygnałów fluorescencyjnych, pochodzących od UAs w komórkach, towarzyszył wzrost ilości i intensywności sygnałów, pochodzących od LysoTracker Red DND-99.



Rysunek 29. Komórki nowotworowej linii komórkowej H460, traktowane QD_{zielonymi}-C-2028 przez 72 h, w stężeniu IC₈₀. Obraz z mikroskopu konfokalnego (A) w świetle przechodzącym oraz trybie fluorescencyjnym, powiększone - (B) i (C) w trybie fluorescencyjnym: lizosomy wybarwione na czerwono (LysoTracker Red DND-99), mitochondria – na zielono (MitoTracker Green FM), C-2028 (UAs) i QD_{zielone} (QD) – odpowiednio na pomarańczowo i niebiesko (własna fluorescencja; zaznaczone strzałkami). Skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów

Rysunek 29. przedstawia zdjęcia mikroskopowe, wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego, na przykładzie komórek nowotworowej linii H460, traktowanych QD_{zielonymi}-C-2028, w stężeniu IC₈₀ przez 72 h. Strzałki wskazują sygnały fluorescencyjne, pochodzące od C-2028 oraz QD_{zielonych}. Sygnały te nakładały się z sygnałami pochodzącymi od lizosomów (taką samą tendencję obserwowałam dla komórek wszystkich badanych linii poddanych ekspozycji UAs, w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci). Świadczy to o tym, że badane koniugaty wnikały do komórek linii H460 i lokalizowały się w lizosomach. W lizosomach zaś, panuje odpowiednie pH, do potencjalnego uwolnienia się badanego związku z koniugatu QD_{zielonych}-C-2028.

HCT116

Rysunek 30. Obraz z mikroskopu konfokalnego, w świetle przechodzącym oraz trybie fluorescencyjnym, komórek nowotworowej linii HCT116 traktowanych C-2028/C-2045 oraz ich koniugatami z QD_{zielonymi} i QD_{czerwonymi} przez 72 h, w stężeniu IC₈₀. Lizosomy wybarwione na czerwono (LysoTracker Red DND-99), mitochondria – na zielono (MitoTracker Green FM), UAs – na pomarańczowo (własna fluorescencja; zaznaczone strzałkami), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów

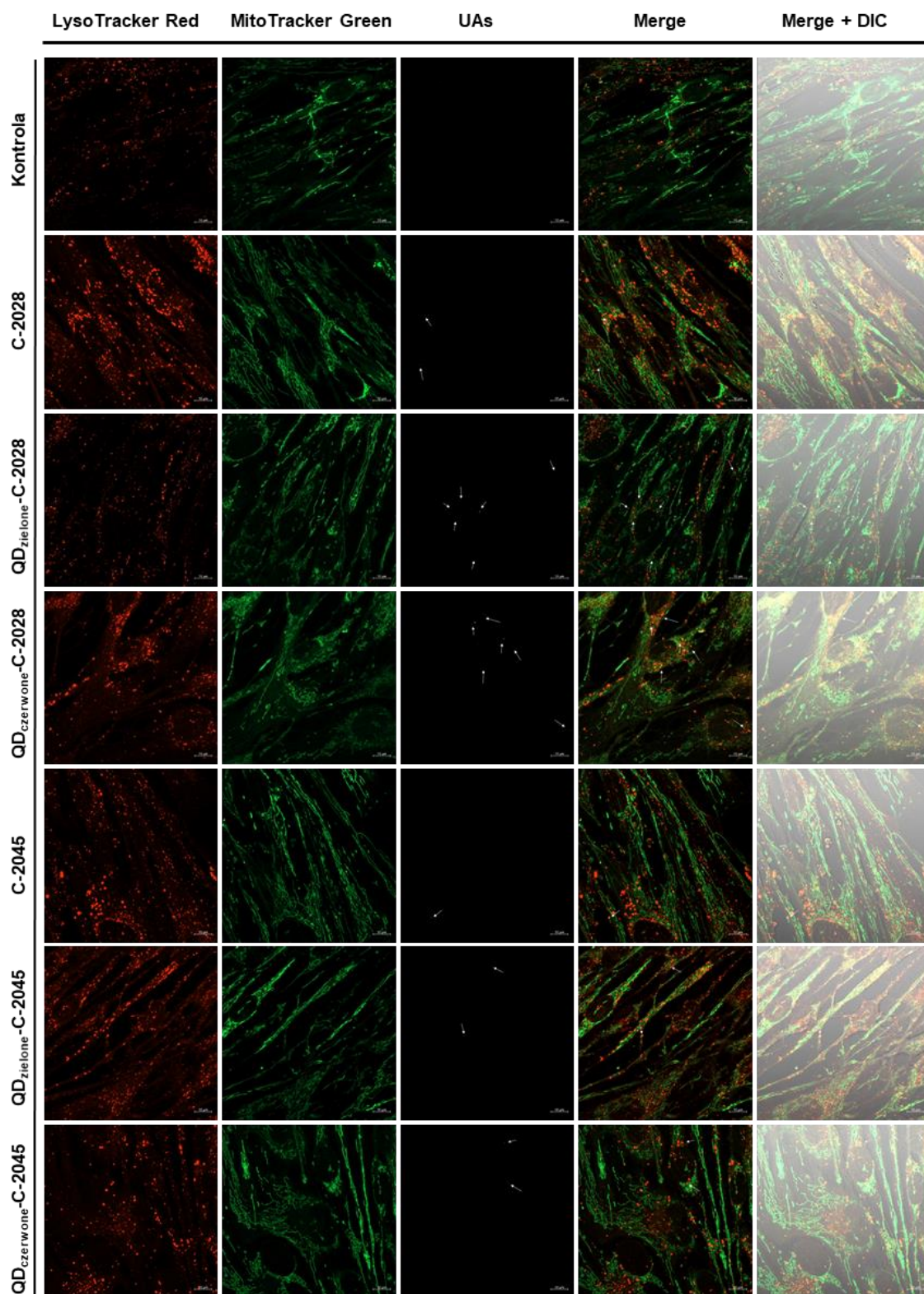
UAs zarówno w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci, nie indukowały wyraźnych zmian w intensywności czerwonej fluorescencji (LysoTracker Red DND-99), oprócz QD_{zielonych}-C-2028, gdzie obserwowałam jej nieznaczny spadek, względem komórek inkubowanych z C-2028 w jego wolnej postaci (Rysunek 30). Zaobserwowałam natomiast zmiany w morfologii mitochondriów, głównie dla komórek traktowanych QD_{czerwonymi}-C-2028, gdzie względem komórek kontrolnych, zmieniły one swój kształt przypominając sferoidy (szczególnie w komórkach, w których widoczne są sygnały pochodzące od UAs).

Podobnie jak dla komórek linii H460, sygnały pochodzące od badanych UAs w ich wolnej oraz skoniugowanej postaci w komórkach raka okrężnicy (HCT116), pokrywały się z sygnałami pochodzącymi od kwaśnych organelli. Świadczy to o tym, że badane związki lokalizowały się w lizosomach.

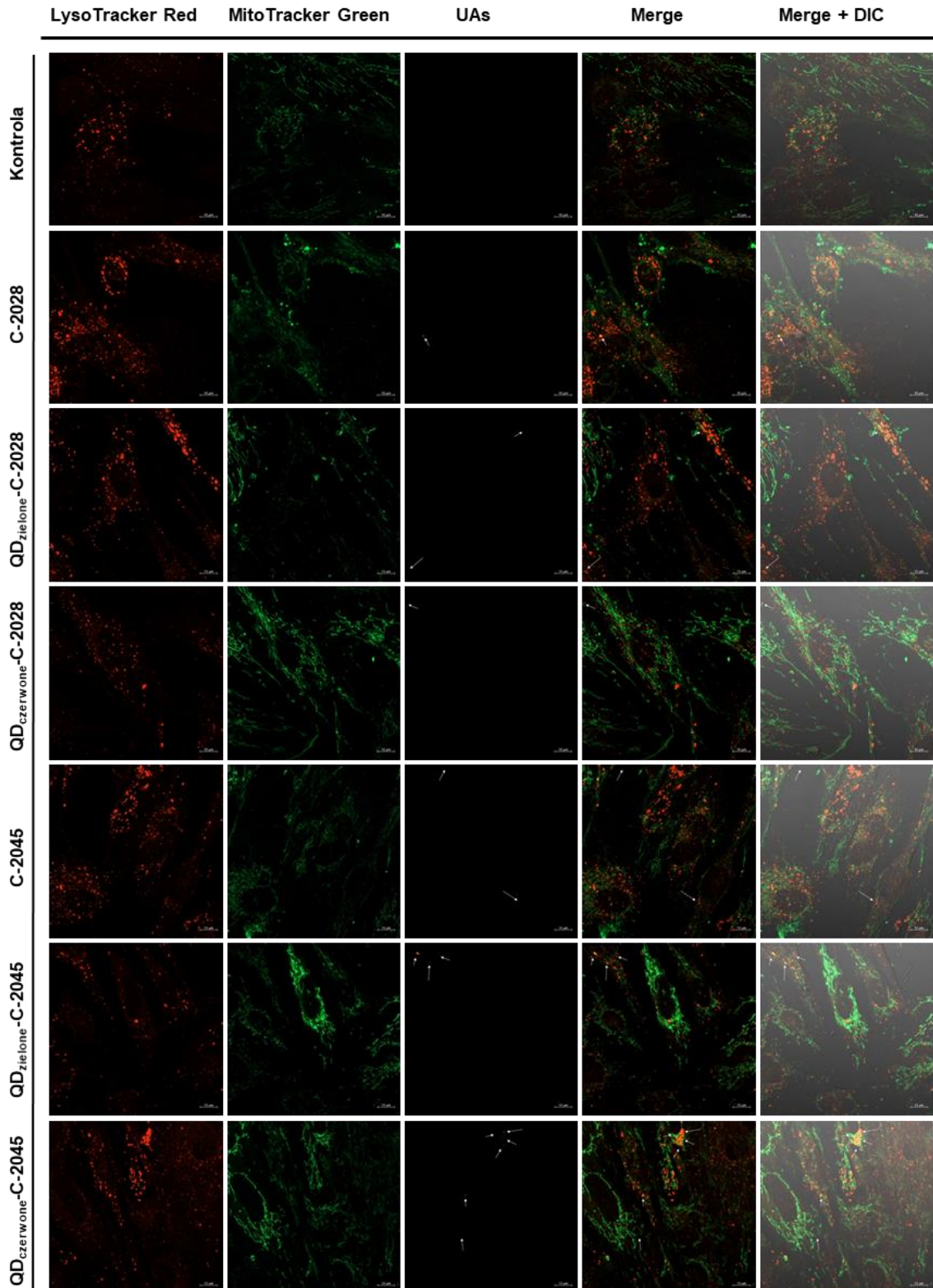
MRC-5

W komórkach traktowanych nieskoniugowanymi UAs zaobserwowałam wzrost intensywności czerwonej fluorescencji, pochodzącej od kwaśnych organelli (głównie dla związku C-2028), w stosunku do komórek kontrolnych. Skoniugowanie UAs z QDs, w porównaniu do komórek traktowanych UAs w ich wolnej postaci, nie zmieniło znacząco ilości i intensywności sygnałów pochodzących od LysoTracker Red DND-99, z wyjątkiem QD_{zielonych}-C-2028. Zaobserwowałam w nich znaczący spadek intensywności czerwonej fluorescencji do poziomu odpowiadającego komórkom kontrolnym. Morfologia mitochondriów, w komórkach traktowanych UAs i ich koniugatami z QDs, w stosunku do komórek kontrolnych, nie zmieniła się z wyjątkiem komórek poddanych ekspozycji QD_{czerwonymi}-C-2028. Mitochondria te zmieniły swój kształt, z „rozgałęzionych i długich” na te przypominające sferoidy.

Podobnie jak dla komórek nowotworowych (linii H460 i HCT116) sygnały pochodzące od UAs (w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci), w komórkach MRC-5, nakładały się z sygnałami pochodzącymi od kwaśnych organelli. Co świadczy o ich lokalizacji w lizosomach.



Rysunek 31. Obraz z mikroskopu konfokalnego, w świetle przechodzącym oraz trybie fluorescencyjnym, komórek prawidłowej linii MRC-5, traktowanych C-2028/C-2045 oraz ich koniugatami z QD_{zielonymi} i QD_{czerwonymi} przez 72 h, w stężeniu IC₈₀. Lizosomy wybarwione na czerwono (LysoTracker Red DND-99), mitochondria – na zielono (MitoTracker Green FM), UAs – na pomarańczowo (własna fluorescencja; zaznaczone strzałkami), skala 10 μm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów

CCD 841 CoN

Rysunek 32. Obraz z mikroskopu konfokalnego, w świetle przechodzącym oraz trybie fluorescencyjnym, komórek prawidłowej linii CCD 841 CoN, traktowanych C-2028/C-2045 oraz ich koniugatami z QD_{zielonymi} i QD_{czerwonymi} przez 72 h, w stężeniu IC₈₀. Lizosomy wybarwione na czerwono (LysoTracker Red DND-99), mitochondria – na zielono (MitoTracker Green FM), UAs – na pomarańczowo (własna fluorescencja; zaznaczone strzałkami), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów

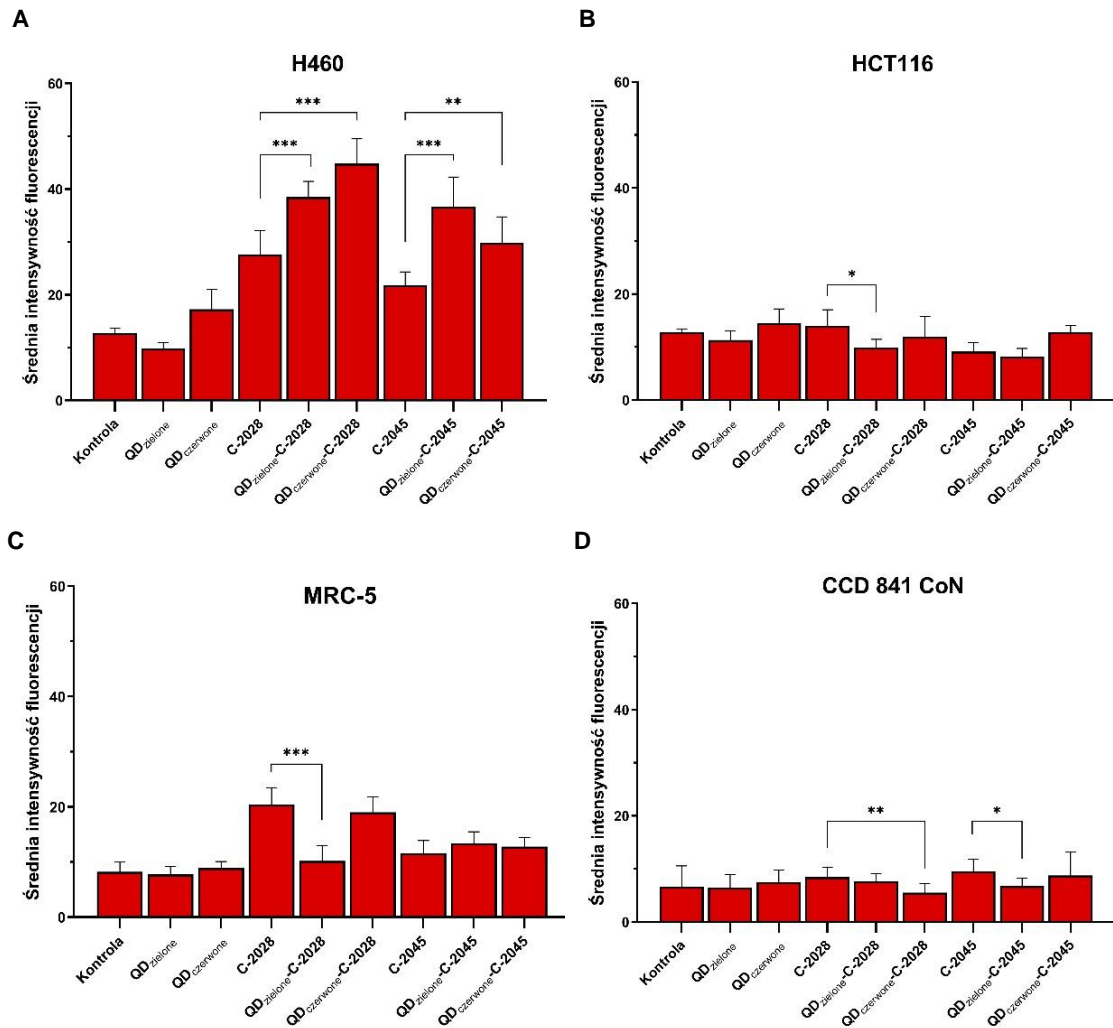
W komórkach linii CCD 841 CoN, traktowanych UAs w ich wolnej postaci, względem komórek kontrolnych, zaobserwowałam niewielki wzrost ilości kwaśnych organelli. Ilość i intensywność sygnałów, pochodzących od kwaśnych organelli w komórkach traktowanych QDs-UAs, względem UAs w ich wolnej postaci, utrzymywała się albo na stałym poziomie, bądź spadała. Spadek fluorescencji, pochodzący od kwaśnych organelli, zaobserwowałam dla komórek inkubowanych z QD_{czerwonymi}-C-2028 i QD_{zielonymi}-C-2045, który odpowiadał poziomowi komórek kontrolnych (nietraktowanych związkami). Morfologia mitochondriów komórek traktowanych UAs i ich koniugatami z QDs, nie różniła się znacząco od komórek kontrolnych (nietraktowanych związkami). Niewielkie zmiany, w postaci pojedynczych skupisk w kształcie sferoidów, obserwowałam dla komórek poddanych ekspozycji C-2028 i QD_{zielonymi}-C-2028.

Sygnały pochodzące od UAs, w ich wolnej lub skoniugowanej postaci (zaznaczone strzałkami), nakładały się z sygnałami pochodzącymi od LysoTracker Red 99-DND, co świadczy o tym, że zlokalizowane były w lizosomach.

Podsumowanie

QDs-UAs po ich wnikięciu do komórki, lokalizują się wewnątrz lizosomów (Rysunek 29.). Tendencję tę zaobserwowałam zarówno dla QDs, UAs jak i QDs-UAs dla wszystkich badanych linii komórkowych. W lizosomach z kolei, panuje odpowiednie pH, do uwalniania UAs z koniugatów QDs-UAs (Rysunek 26.). Największy przyrost w ilości i intensywności sygnałów pochodzących od kwaśnych organelli po traktowaniu komórek UAs, względem komórek kontrolnych, zaobserwowałam dla linii H460 (Rysunek 33.). Skoniugowanie UAs z QDs wzmacniło ten efekt, w sposób istotny statystycznie w komórkach nowotworu płuc. W przypadku jego prawidłowego odpowiednika – linii MRC-5, skoniugowanie UAs z QDs nie wpływało znacząco na ilość kwaśnych organelli w komórkach, z wyjątkiem QD_{zielonych}-C-2028, gdzie obserwowałam ich znaczący, istotny statystycznie, spadek.

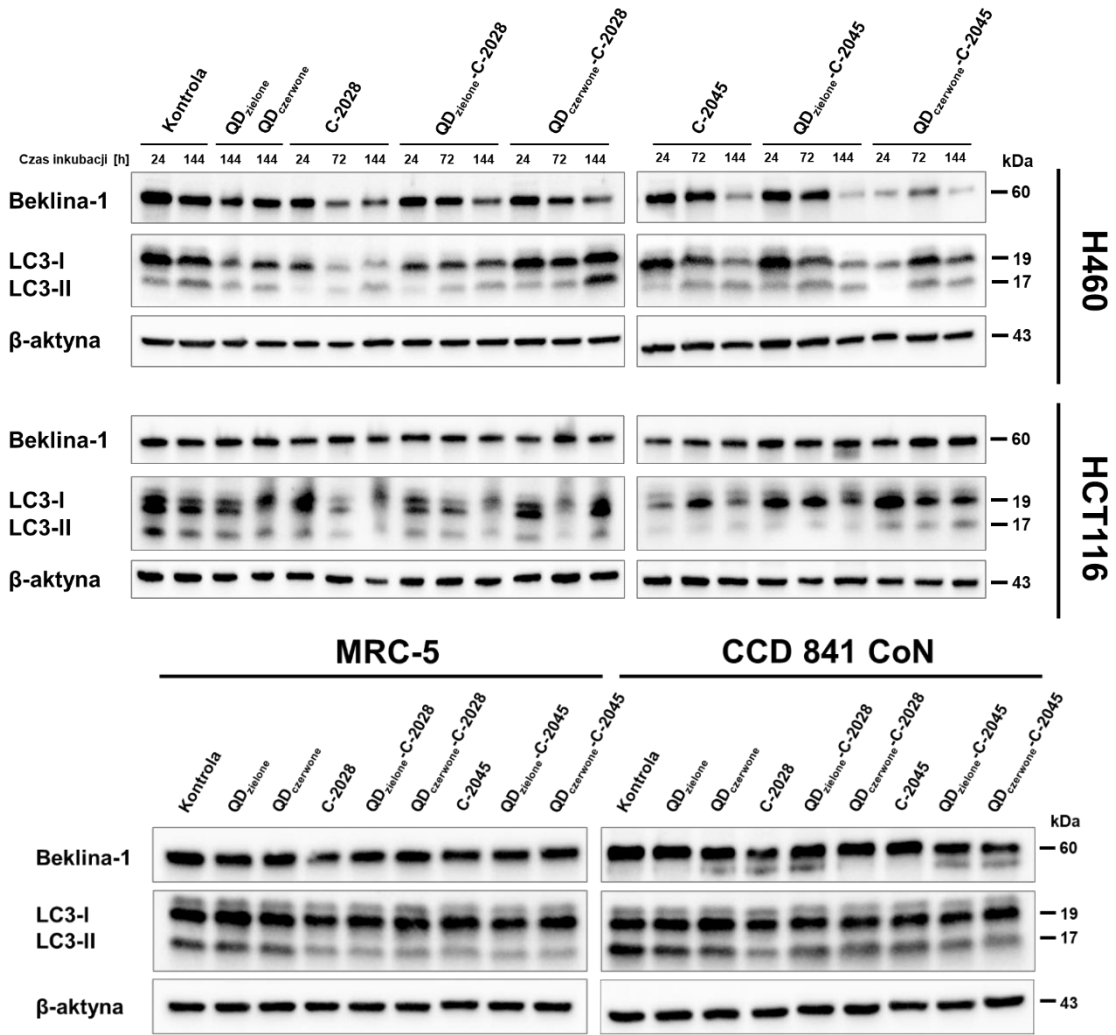
W komórkach nowotworu okrężnicy HCT116, traktowanych UAs, poziom średniej fluorescencji pochodzącej od kwaśnych organelli pozostawał na podobnym poziomie co w komórkach kontrolnych (nietraktowanych związkami) lub nieznacznie spadał (C-2045). Generalnie, skoniugowanie UAs z QDs nie zmieniało znacząco intensywności fluorescencji, z wyjątkiem QD_{zielonych}-C-2028 – gdzie zaobserwowałam jej spadek (względem C-2028) oraz QD_{czerwonych}-C-2045 – niewielki wzrost (względem C-2045). Dla prawidłowego odpowiednika nowotworu okrężnicy – linii CCD 841 CoN zaobserwowałam podobną tendencję – poziom średniej fluorescencji pochodzącej od kwaśnych organelli dla komórek traktowanych UAs pozostawał na podobnym poziomie co w komórkach kontrolnych. Skoniugowanie zaś UAs z QDs nie miało znaczącego wpływu na jej poziom, z wyjątkiem QD_{czerwonych}-C-2028 i QD_{zielonych}-C-2045, gdzie zaobserwowałam jej spadek. Zarówno QD_{zielone} jak i QD_{czerwone} nie wpływały znacząco na zmianę średniej fluorescencji, pochodzącej od kwaśnych organelli, w komórkach wszystkich badanych linii.



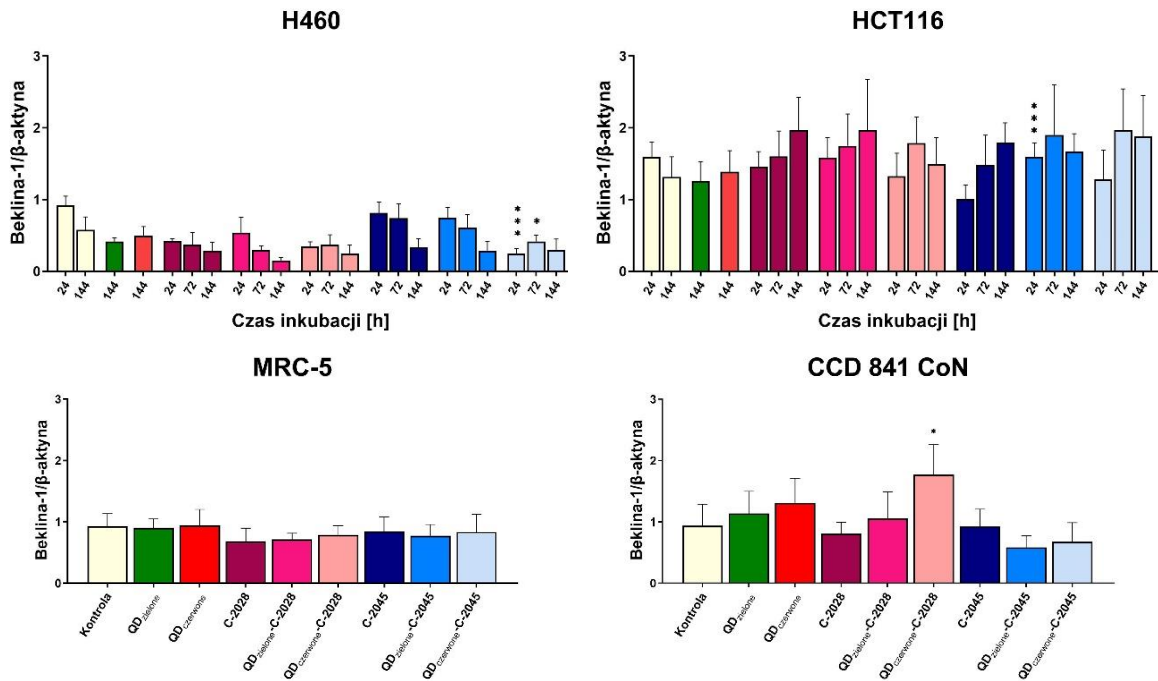
Rysunek 33. Średnia intensywność fluorescencji pochodząca od kwaśnych organelli wybarwionych LysoTracker Red DND-99 w komórkach linii: (A) H460, (B) HCT116, (C) MRC-5 i (D) CCD 841 CoN: komórek poddanych ekspozycji: C-2028, C-2045 oraz ich koniugatami z QDzielonymi i QDczerwonymi, a także nieskoniugowanymi QDzielonymi i QDczerwonymi w stężeniu IC_{80} oraz komórek kontrolnych przez 72 h. Intensywność fluorescencji wyznaczona na podstawie zdjęć mikroskopowych z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – statystycznie istotne różnice między związkiem w jego wolnej i skoniugowanej postaci (test t-Studenta)

W celu określenia czy wzrost kwaśnych organelli w komórkach badanych linii związany był z procesem autofagii określiłam poziom białek, będących znacznikami biochemicznymi tego procesu - bekliny-1 oraz LC3-II metodą Western blotting. Beklina-1 jest białkiem, które oddziałuje z BCL-2 lub PI3K klasy III, odgrywa kluczową rolę zarówno w regulacji autofagii, jak i śmierci komórek. Indukcja autofagii związana jest z obecnością wakuoli, znakowanych charakterystycznie białkiem LC3 (Valente G., 2014). Białko LC3 jest podstawowym znacznikiem biochemicznym procesu autofagii. Wyróżniamy jego dwie podstawowe postacie: LC3-I oraz LC3-II. LC3-I zlokalizowany jest w cytoplazmie, natomiast LC3-II związany jest z powierzchnią autofagosomu, korelując tym samym z ich liczbą. Proces konwersji LC3-I do LC3-II ulega wzmocnieniu, na skutek indukcji autofagii (Mizushima N., 2007).

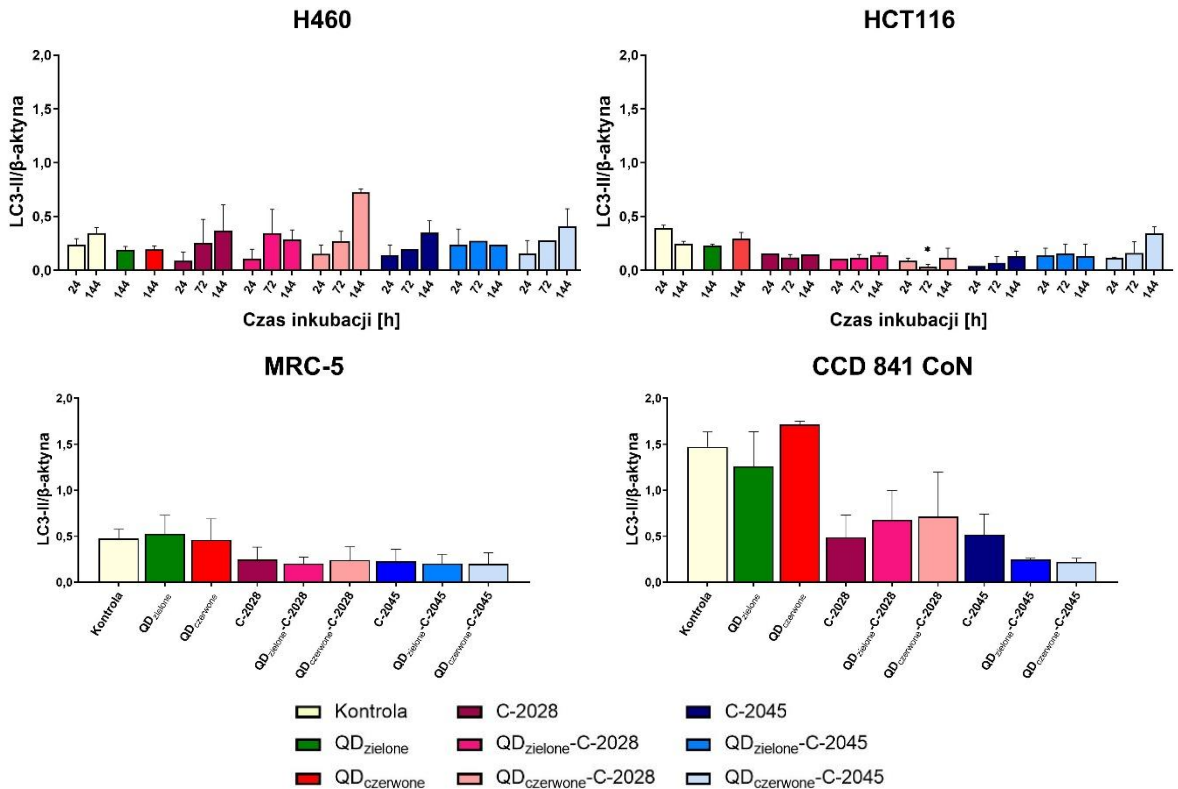
A



B



C

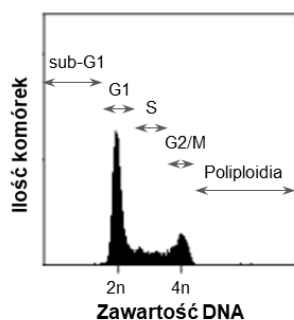


Rysunek 34. (A) Poziom białek bekliny-1 oraz LC3-II w komórkach linii H460, HCT116, MRC-5 oraz CCD 841 CoN traktowanych UAs, QDs oraz QDs-UAs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (UAs w ich wolnej postaci) przez podaną liczbę godzin (komórki linii MRC-5 oraz CCD 841 CoN – przez 72 h). Doświadczenie wykonano metodą Western blotting, gdzie β -aktyna stanowi kontrolę do równomiernego napełnienia studzienek. (B-C) Ilościowa analiza poziomu badanych białek wyrażonych względem β -aktyny. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem UAs w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

Wyniki analizy Western blotting wskazały, że poziom bekliny-1 w komórkach badanych linii komórkowych traktowanych UAs, oscyluje na poziomie odpowiadającym komórkom kontrolnym (nietraktowanym związkiem), bądź też jest nieznacznie niższy (Rysunek 34.). W przypadku komórek linii H460 spada on, wraz ze wzrastającym czasem inkubacji komórek ze związkiem, w przypadku komórek linii HCT116 – rośnie. Skoniugowanie UAs z QDs wpłynęło istotnie statystycznie na poziom bekliny-1 jedynie w przypadku QD czerwonych-C-2045 (inkubowanych przez 24-72 h dla komórek linii H460), QD zielonych-C-2045 (24 h dla komórek linii HCT116) oraz QD czerwonych-C-2028 (24 h dla komórek linii MRC-5). Analizując poziom białka LC3-II z kolei, można zauważyć, że w komórkach wszystkich badanych linii komórkowych nie przekracza on poziomu odpowiadającego komórkom kontrolnym. Istotną statystycznie zmianę poziomu tego białka w komórkach, traktowanych koniugatami QDs-UAs, zaobserwowałam w przypadku komórek linii HCT116 inkubowanych z QD czerwonymi-C-2028 przez 72 h. Zarówno QD zielone jak i QD czerwone nie wpływały znacząco na poziom oznaczanych białek (bekliny-1 jak i LC-3-II) w komórkach wszystkich badanych linii (względem komórek kontrolnych). Biorąc pod uwagę wyniki analizy poziomu oznaczanych białek, wzrost kwaśnych organelli w komórkach badanych linii (szczególnie linii H460), traktowanych QDs-UAs, nie był związany z indukcją autofagii.

3.4. Zmiany w dystrybucji komórek nowotworowych oraz prawidłowych w cyklu życiowym pod wpływem niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z nanocząstkami

Kolejnym etapem moich badań było określenie wpływu badanych związków (C-2028 i C-2045) w ich wolnej oraz skoniugowanej z QDs postaci na dystrybucję komórek nowotworowych i prawidłowych w cyklu życiowym. Obserwację zmian w dystrybucji komórek w cyklu życiowym poddanych ekspozycji badanego wariantu związku zbadalam w oparciu o analizę zawartości DNA w komórkach wybarwionych jodkiem propidyny (ang. propidium iodide, PI). Stechiometryczne wiązanie się tego barwnika do DNA pozwala na określenie jego zawartości w komórce, a tym samym na oznaczenie wielkości populacji komórek w danej fazie cyklu życiowego (Rysunek 35.). Zawartość DNA mierzona z wykorzystaniem cytometrii przepływowej pozwala także na oszacowanie frakcji komórek sub-G1 oraz ploidalności badanej populacji komórek (Darzynkiewicz Z., 2017).



Rysunek 35. Przykładowy histogram obrazujący dystrybucję komórek danej linii w cyklu życiowym. Fazy cyklu komórkowego: G1, S, G2/M i Poliploidia (Poli) oraz frakcja komórek sub-G1. Oś Y – ilość komórek, oś X – intensywność fluorescencji jodku propidyny, określającej zawartość DNA

Zawartość jądrowego DNA dla tzw. frakcji sub-G1, charakterystycznej dla komórek apoptotycznych wynosi $<2n$, komórek w fazie G1 - $2n$, komórek w fazie G2, mitozie lub post-mitotycznej tetraploidalnej fazie G1 - $4n$ oraz dla komórek poliploidalnych - $>4n$ (Passequé E., 2005). Frakcja sub-G1 może zawierać komórki apoptotyczne, jak również reprezentować komórki uszkodzone mechanicznie, czy też te o odmiennej strukturze chromatyny, wykazującej zmniejszoną dostępność DNA dla fluorochromów.

Poniżej, przedstawiłam histogramy obrazujące procentowe zmiany w dystrybucji komórek wszystkich badanych linii komórkowych w cyklu życiowym. Doświadczenie wykonałam dla komórek poddanych ekspozycji: QD_{zielonych}, QD_{czerwonych}, ze związkami: C-2028 i C-2045, a także koniugatami tych związków z QDs, inkubowanych przez 24, 48, 72 oraz 144 h (dla komórek nowotworowych) oraz przez 72 h (dla komórek prawidłowych), w stężeniach odpowiadających wartościom IC_{80} związków w ich wolnej, nieskoniugowanej postaci, wyznaczonych dla komórek linii nowotworowych oraz dla komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem).

H460

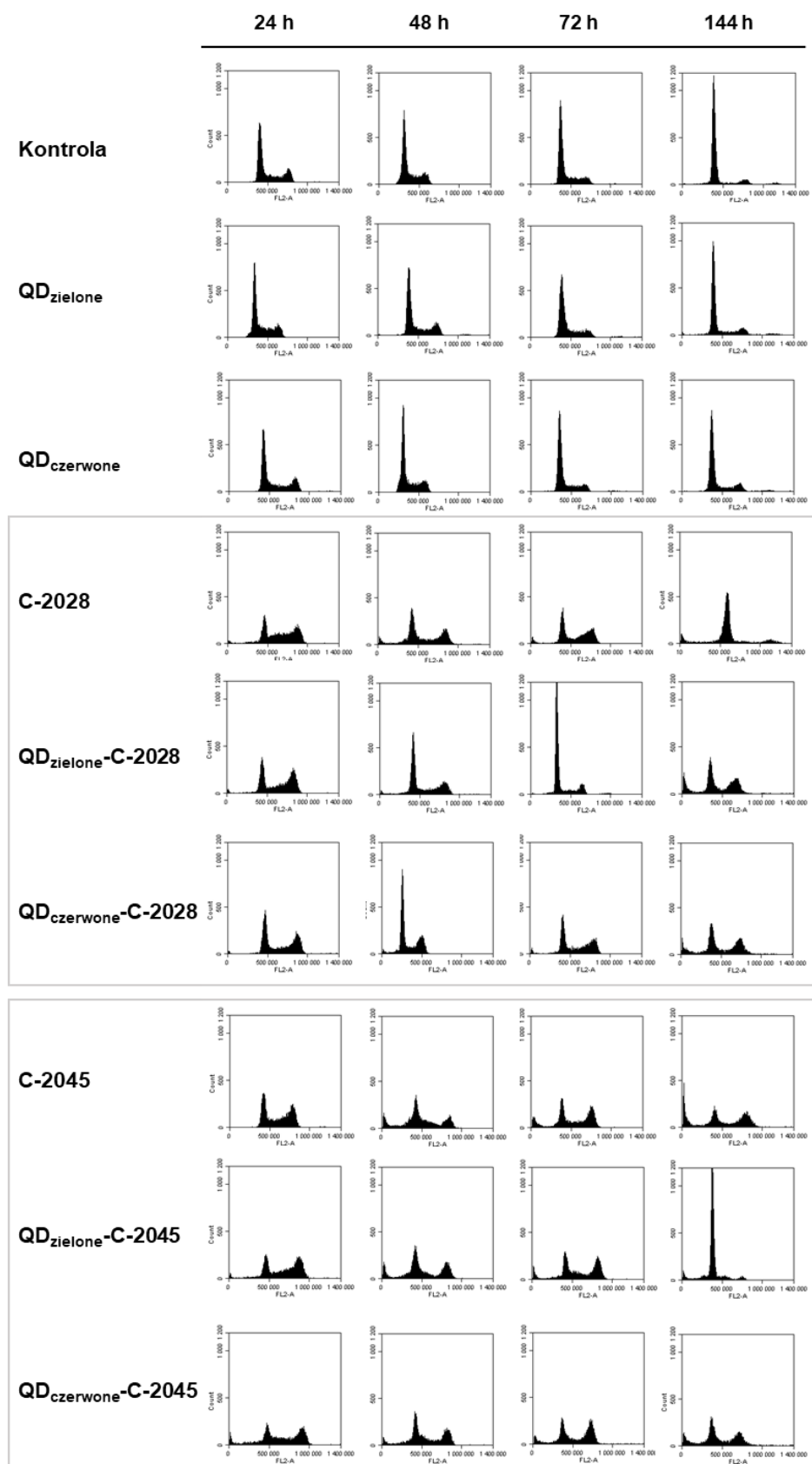
Analiza dystrybucji komórek linii H460, poddanych działaniu związków C-2028 oraz C-2045 wykazała, że związki te wywołują istotne zmiany w rozkładzie komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (Tabela S5, znajdująca się w suplemencie do niniejszej pracy),

Rysunek 36.). Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek ze związkami (C-2028/C-2045) wzrastała procentowa zawartość komórek w fazie sub-G1, malała w fazie S, a dla frakcji komórek poliploidalnych (Poli) pozostawała na stosunkowo stałym, niskim poziomie (około 2-5%). Procentowy udział komórek, inkubowanych ze związkiem C-2028 w fazie G1 był niższy niż dla komórek kontrolnych. Dla krótszych czasów inkubacji (24–72 h) oscylował na poziomie 35-49%, natomiast dla dłuższych (144 h) – około 67%. Jednocześnie spadkowi temu, towarzyszyła przejściowa akumulacja w fazie G2/M, aby po najdłuższym okresie inkubacji z badanym związkiem (144 h) osiągnąć podobną wartość co dla komórek kontrolnych (około 5%). Procentowy udział komórek, poddanych ekspozycji C-2045, w fazie G1 był niższy względem kontroli, przy czym dla komórek inkubowanych przez 24–72 h utrzymywał się na poziomie około 40-45%, a po 144 h spadł do ok. 25%. Z kolei, frakcja komórek w fazie G2/M wzrosła względem kontroli i pozostawała na stałym poziomie około 30%, niezależnie od czasu inkubacji. W komórkach inkubowanych z nieskoniugowanymi QDs nie obserwowałam istotnych zmian w cyklu komórkowym względem komórek kontrolnych.

Skoniugowanie badanych związków z kropkami kwantowymi spowodowało zmiany w rozkładzie komórek w poszczególnych fazach cyklu życiowego, w porównaniu do rozkładu komórek dla związków w ich wolnej postaci. Dla koniugatów C-2028 z QDs następowała przejściowa akumulacja w fazie G1 (48–72 h inkubacji), natomiast po 144 h - następował znaczny spadek ilości komórek w tej fazie (ok. 35%), względem związku w jego wolnej postaci. Zmianie ilości komórek w fazie G1 towarzyszył początkowy spadek (48–72 h) i późniejszy wzrost (144 h) ilości komórek w fazach sub-G1 oraz G2/M. Procentowy udział komórek w fazie G2/M, dla komórek inkubowanych z QDs-C-2028 początkowo (24–72 h) nieznacznie spadał (z wyjątkiem QD_{zielonych}-C-2028, inkubowanych przez 72 h), natomiast po 144 h inkubacji znacząco wzrastał z ok. 4% dla związku C-2028 do około 30% dla koniugatu tego związku z QDs. Liczba komórek poliploidalnych pozostawała na stosunkowo stałym poziomie.

W przeciwieństwie do komórek inkubowanych z nieskoniugowanym C-2045, gdzie ilość komórek we frakcji sub-G1 wzrastała wraz z czasem inkubacji, dla komórek inkubowanych z koniugatami tego związku z QDs tendencja była inna. Po 72 h inkubacji komórek z QDs-C-2045 (głównie z QD_{zielonymi}) następował znaczny spadek procentowej ilości komórek w fazie sub-G1, po czym po 144 h inkubacji ponownie wzrastał. Wartości te są jednak niższe niż odpowiadające ilości komórek w fazie sub-G1 dla komórek inkubowanych z C-2045 (30,1%, 15,1% oraz 23,8%, odpowiednio dla komórek traktowanych C-2045, QD_{zielonymi}-C-2045 oraz QD_{czerwonymi}-C-2045).

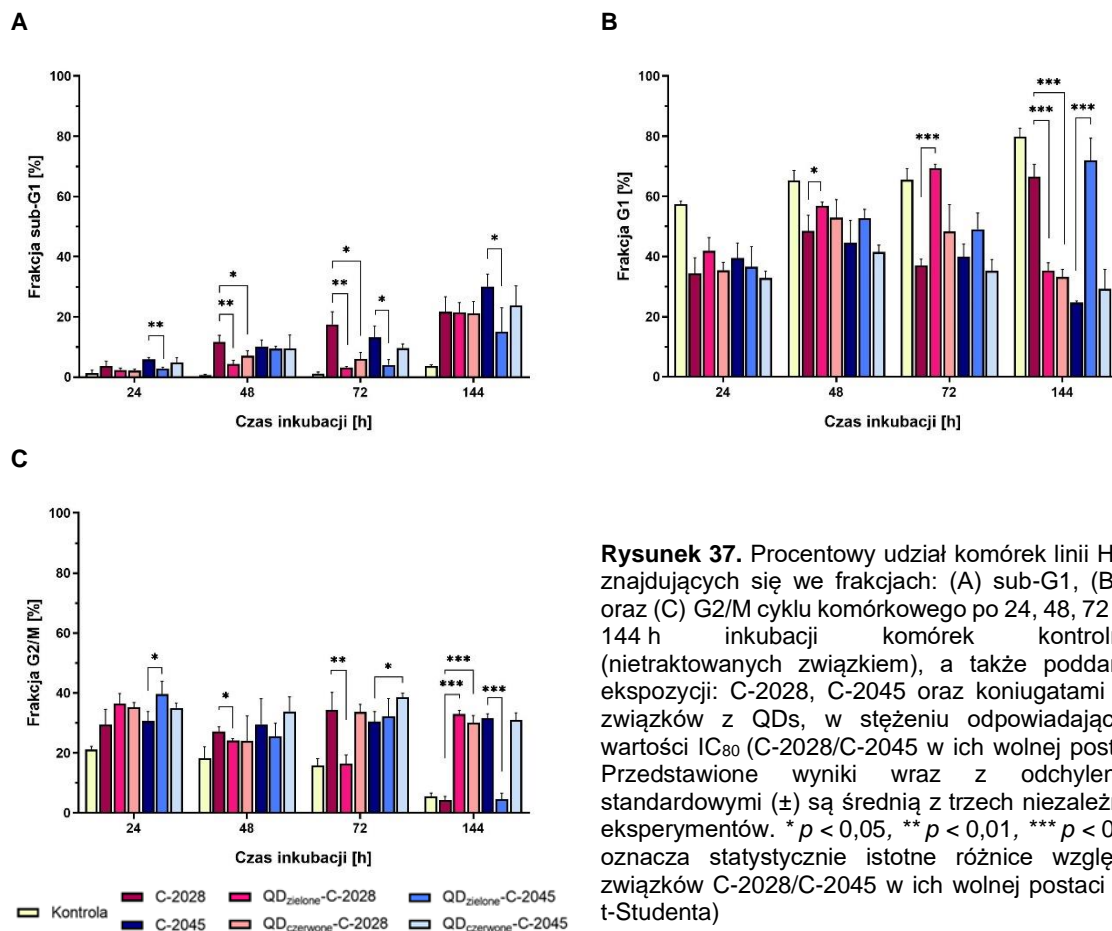
Z kolei, ilość komórek w fazie G2/M dla koniugatu QD_{czerwonych}-C-2045 pozostawała na stosunkowo stałym poziomie (względem C-2045), w przeciwieństwie do komórek traktowanych QD_{zielonymi}-C-2045. Po 144 h inkubacji komórek następował znaczny spadek ich udziału w fazie G2/M (do ok. 5%), kosztem wzrostu w fazie G1 (ok. 72%). Dla komórek poddanych ekspozycji QD_{czerwonych}-C-2045 udział komórek w fazie G1 pozostawał na stosunkowo stałym poziomie, względem komórek inkubowanych z C-2045. Ilość komórek, inkubowanych z QDs-C-2045, dla frakcji S oraz komórek poliploidalnych zaś pozostawał na stałym poziomie (względem C-2045).



Rysunek 36. Histogramy obrazujące zmiany w dystrybucji komórek kontrolnych linii H460 oraz inkubowanych z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} badanych związków w ich wolnej postaci przez 72 i 144 h. Oś X – intensywność fluorescencji jodku propidyny określającej zawartość DNA. Oś Y - ilość komórek. Uzyskane histogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń



Analizując liczbę komórek, znajdujących się we frakcjach sub-G1, G1 oraz G2/M w zależności od czasu inkubacji (Rysunek 37.) można zaobserwować, że skoniugowanie UAs z QDs wpłynęło, istotnie statystycznie, na zmianę dystrybucji komórek nowotworowej linii komórkowej H460 w cyklu życiowym. Największe różnice w ilości komórek, w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, zaobserwowałam po 144 h inkubacji komórek z danym wariantem związku (C-2028/C-2045) pomiędzy jego wolną a skoniugowaną postacią (głównie dla związku C-2028). Po 144 h inkubacji z QDs-C-2028 następował, istotny statystycznie, wzrost procentowej ilości komórek w fazie G2/M oraz spadek w fazie G1, względem komórek kontrolnych jak i tych inkubowanych z nieskoniugowanym C-2028. Udział komórek, inkubowanych z C-2045 w jego wolnej oraz skoniugowanej z QD_{czerwonymi} postaci, w poszczególnych fazach cyklu komórkowego pozostawał na stosunkowo poziomie. W przypadku komórek poddanych ekspozycji QD_{zielonych}-C-2045 przez 144 h, następował spadek ilości komórek w fazach: sub-G1 i G2/M oraz wzrost w fazie G1, względem komórek traktowanych C-2045.



Rysunek 37. Procentowy udział komórek linii H460, znajdujących się we frakcjach: (A) sub-G1, (B) G1 oraz (C) G2/M cyklu komórkowego po 24, 48, 72 oraz 144 h inkubacji komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem), a także poddanych ekspozycji: C-2028, C-2045 oraz koniugatami tych związków z QDs, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

HCT116

Podobnie jak w przypadku komórek linii nowotworowej H460, związki C-2028 oraz C-2045 wywoływały istotne zmiany w rozkładzie komórek nowotworowej linii HCT116 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (Tabela S6, Rysunek 38.). Wraz z wydłużającym się czasem ekspozycji na badany związek, wzrastała procentowa zawartość komórek w fazie

sub-G1 oraz malała w fazie G1, względem komórek kontrolnych. W komórkach inkubowanych zarówno ze związkami C-2028 i C-2045 najwyższy udział komórek w fazie G1 zaobserwowałam po 48 h inkubacji (odpowiednio ok. 51 i 44%). W porównaniu do komórek nietraktowanych chemioterapeutykami, procentowa zawartość komórek w fazie S malała wraz z wydłużającym się czasem inkubacji z badanym związkiem (C-2028/C-2045) – z wyjątkiem komórek traktowanych C-2028 przez 24 h, gdzie następował nieznaczny wzrost komórek w tej fazie. Udział komórek, poddanych ekspozycji C-2028/C-2045, w fazie G2/M malał wraz z wydłużającym się czasem inkubacji i był wyższy niż dla komórek kontrolnych (z wyjątkiem najdłuższego czasu inkubacji - 144 h, w przypadku obu związków). Najwyższy udział komórek w fazie G2/M następował po 24 h inkubacji (ok. 42% dla C-2028 i 54% dla C-2045). Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji wzrastał także udział komórek poliploidalnych (do około 17%). Należy podkreślić, iż w przypadku komórek linii H460 nie zaobserwowałam takiej tendencji.

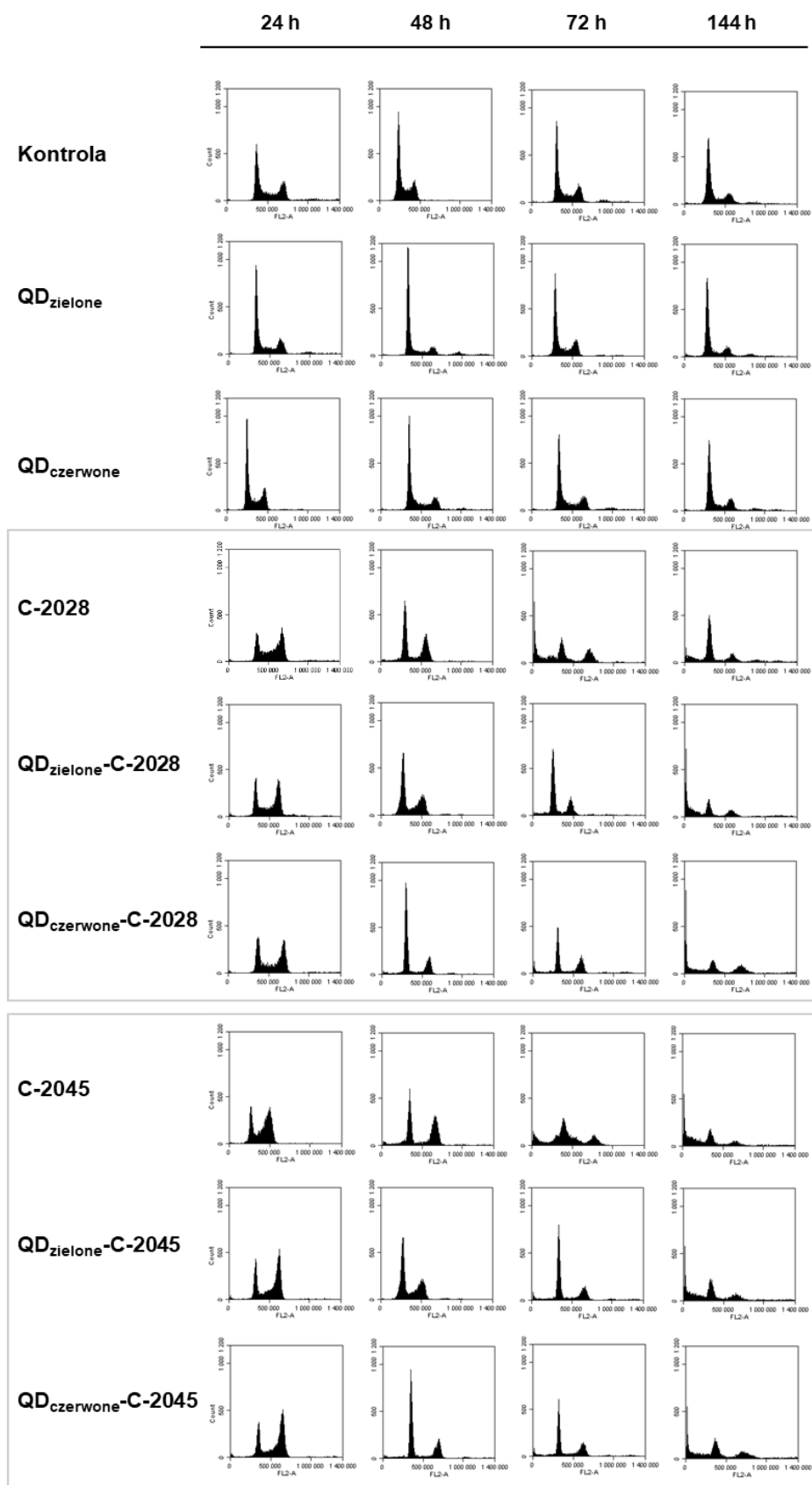
Skoniugowanie badanych związków z kropkami kwantowymi spowodowało zmiany w rozkładzie komórek poszczególnych fazach cyklu, względem związków w ich wolnej postaci. Dla koniugatów C-2028 z QDs, podobnie jak dla komórek linii H460, następowała przejściowa akumulacja w fazie G1 (48–72 h inkubacji), natomiast po 144 h - następował znaczny spadek ilości komórek w tej fazie (ok. 29% dla koniugatu z QD_{zielonymi} i ok. 22% - z QD_{czerwonymi}), względem związku w jego wolnej postaci. Utrzymywaniu się przejściowej akumulacji komórek w fazie G1 (głównie po 72 h inkubacji) towarzyszył spadek ilości komórek w fazie sub-G1 (udział komórek w fazie sub-G1 po 72 h inkubacji z: C-2028 – około 29%, QD_{zielonymi}-C-2028 – ok. 8%, QD_{czerwonymi}-C-2028 – ok. 16%). Po 144 h inkubacji, udział komórek w fazie sub-G1, traktowanych QDs-UAs, utrzymywał się na stałym poziomie, bądź nieznacznie wzrastał (C-2028 – ok. 31%, QD_{zielone}-C-2028 – ok. 32%, QD_{czerwone}-C-2028 – ok. 38%). Udział komórek w fazie G2/M oraz komórek poliploidalnych, inkubowanych zarówno z C-2028 w jego wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci pozostawał na stosunkowo stałym poziomie.

Dla komórek linii HCT116, poddanych ekspozycji QDs-C-2045 (podobnie jak dla QDs-C-2028), zaobserwowałam przejściową akumulację w fazie G1 (48–72 h), po 144 h ilość komórek w tej fazie spadła i utrzymywała się na poziomie około 27% i 31% - odpowiednio dla koniugatów C-2045 z QD_{zielonymi} i QD_{czerwonymi}), względem związku C-2045 w jego wolnej postaci. Jednocześnie z wraz z przejściową akumulacją komórek w fazie G1, następował spadek ilości komórek w fazie sub-G1 (głównie po 72 h inkubacji). Po 144 h inkubacji procentowa zawartość komórek w fazie sub-G1 dla koniugatów C-2045 z QD_{zielonymi} nie zmieniała się (ok. 43%) względem komórek inkubowanych z nieskoniugowanym związkiem (ok. 46%), a dla koniugatów z QD_{czerwonymi} spadła do ok. 32%. Udział komórek w fazie G2/M, dla komórek inkubowanych z QDs-C-2045 przez 24 – 48 h, był niższy niż dla komórek poddanych ekspozycji C-2045, dla pozostałych czasów pozostawał na stosunkowo stałym poziomie (z wyjątkiem komórek inkubowanych z QD_{czerwonymi}-C-2045 przez 144 h, gdzie następował nieznaczny wzrost ilości komórek w tej fazie). Procentowa zawartość komórek w fazie S, w przypadku inkubacji z QDs-C-2045 przez 24 h była nieznacznie wyższa względem komórek traktowanych związkiem w jego wolnej postaci – odpowiednio dla koniugatu C-2045 z QD_{zielonymi} - ok. 13%

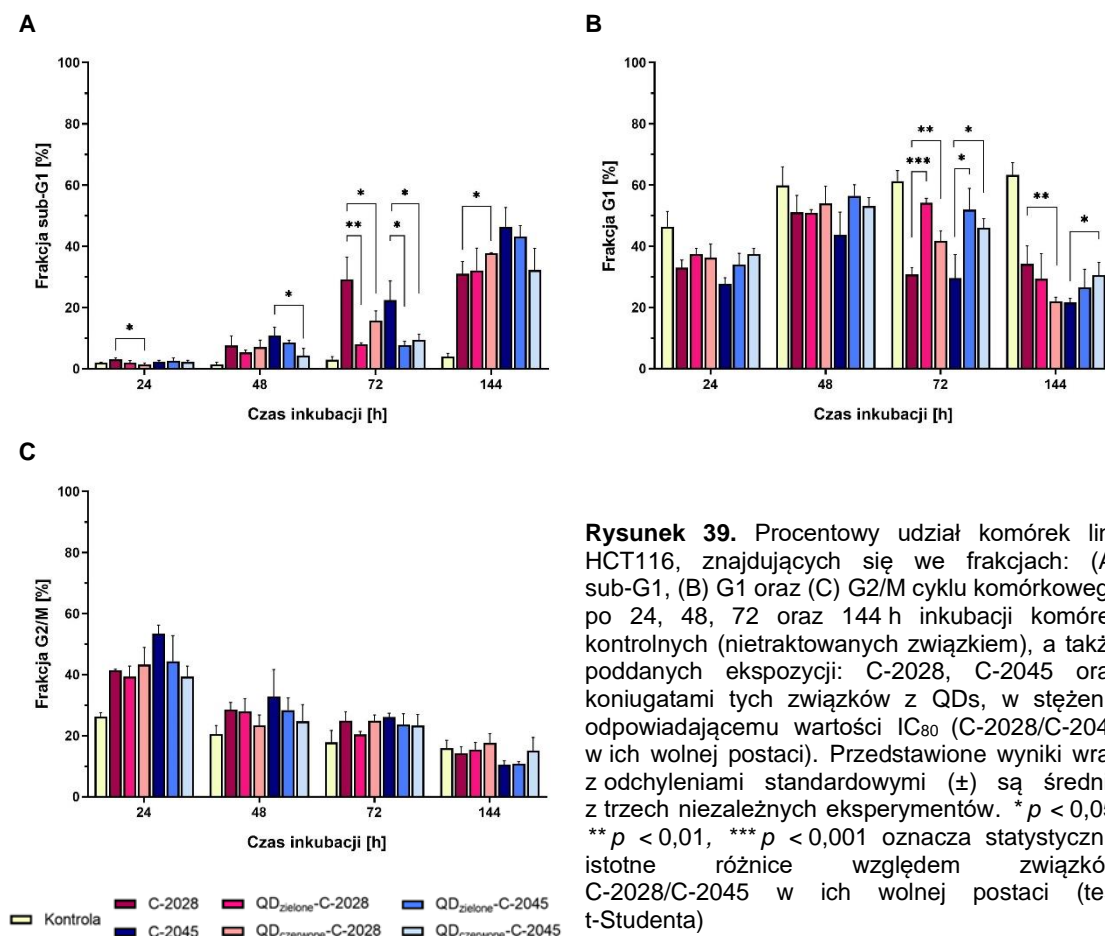
i QD_{czerwonymi} – ok. 17%, dla pozostałych czasów inkubacji wartości te pozostawały na stosunkowo stałym poziomie. Podobnie jak dla fazy S, ilość komórek poliploidalnych dla komórek traktowanych QDs-C-2045 (względem C-2045) pozostawała na stosunkowo stałym poziomie.

Na podstawie procentowego udziału komórek, znajdujących się we frakcjach sub-G1, G1 oraz G2/M w zależności od czasu inkubacji (Rysunek 39.) można zaobserwować, że skoniugowanie związków C-2028 i C-2045 z kropkami kwantowymi wpłynęło, istotnie statystycznie, na zmianę dystrybucji komórek nowotworowej linii komórkowej HCT116 w cyklu życiowym. Największe różnice w ilości komórek, w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, zaobserwowałam dla faz sub-G1 oraz G1 po 72 i 144 h inkubacji komórek z danym wariantem związku (C-2028/C-2045) pomiędzy jego wolną a skoniugowaną postacią.

Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek poddanych ekspozycji UAs, wzrastał udział komórek w fazie sub-G1. Skoniugowanie UAs z QDs początkowo (24–72 h inkubacji) wpływało na zmniejszenie udziału komórek w tej fazie, natomiast po 144 h inkubacji – jego wzrost (QDs-C-2028). Jednocześnie spadkowi komórek w fazie sub-G1, inkubowanym przez 72 h z koniugatami QDs-UAs, względem UAs w ich wolnej postaci, towarzyszył ich wzrost w fazie G1. Po 144 h inkubacji komórek z QDs-C-2028, populacja komórek w fazie sub-G1 wzrastała, kosztem spadku populacji w fazie G1. Dla koniugatów QDs-C-2045 – następował spadek ilości komórek w fazie sub-G1 (względem C-2045), przy jednoczesnym wzroście w fazie G1. Nie zaobserwowałam, istotnych statystycznie, różnic procentowej zawartości komórek linii HCT116 w fazie G2/M pomiędzy komórkami traktowanymi związkami z C-2028/C-2045 w ich wolnej jak i skoniugowanej postaci, niezależnie od czasu inkubacji.



Rysunek 38. Histogramy obrazujące zmiany w dystrybucji komórek kontrolnych linii HCT116 oraz inkubowanych z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} badanych związków w ich wolnej postaci przez 72 i 144 h. Oś X – intensywność fluorescencji jodu propidyny określającej zawartość DNA. Oś Y - ilość komórek. Uzyskane histogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

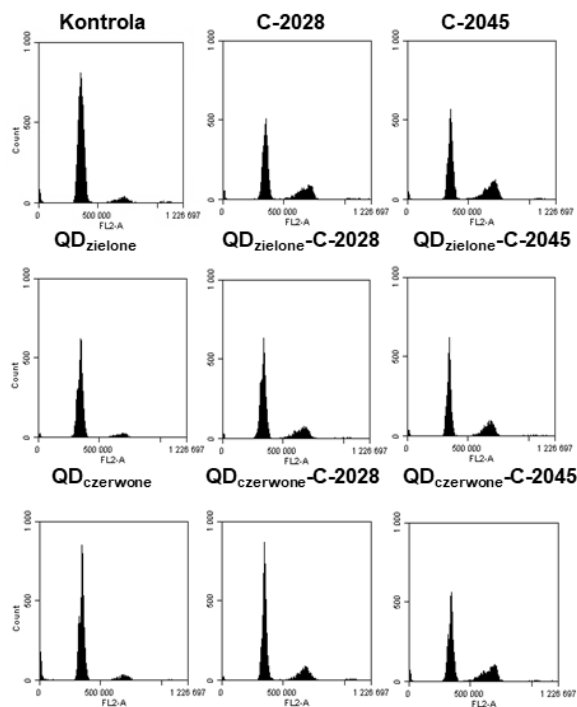


Rysunek 39. Procentowy udział komórek linii HCT116, znajdujących się we frakcjach: (A) sub-G1, (B) G1 oraz (C) G2/M cyklu komórkowego po 24, 48, 72 oraz 144 h inkubacji komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem), a także poddanych ekspozycji: C-2028, C-2045 oraz koniugatami tych związków z QDs, w stężeniu odpowiadającemu wartości IC_{80} (C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

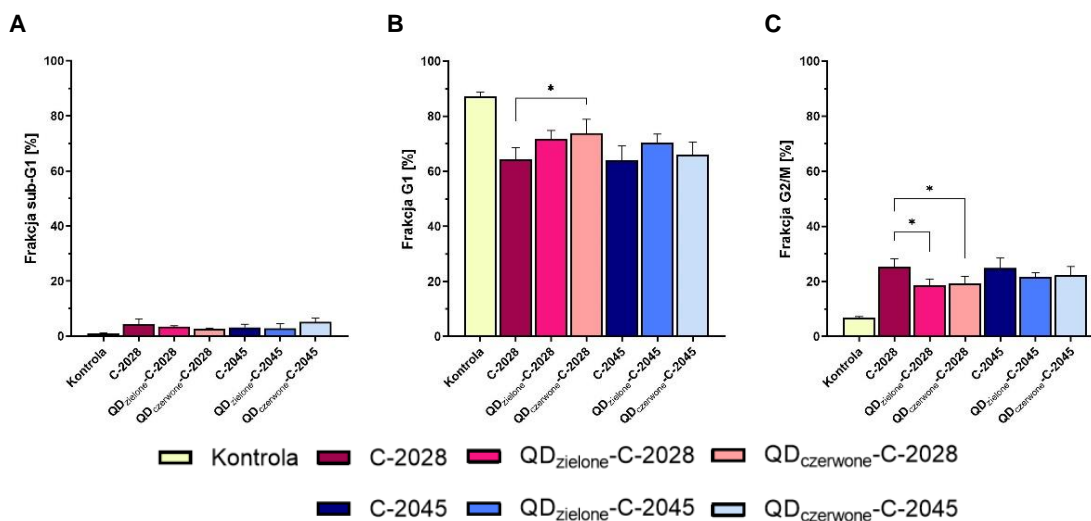
MRC-5

Analiza dystrybucji komórek prawidłowej linii MRC-5, poddanych działaniu związków C-2028 oraz C-2045 w stężeniu IC_{80} (wyznaczonym względem nowotworowej linii H460) przez 72 h wykazała, że związki te wywołują również niewielkie zmiany w procentowym rozkładzie komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (Tabela S7., Rysunek 40.). UAs powodowały spadek procentowej ilości komórek w fazie G1 kosztem wzrostu w fazie G2/M oraz w niewielkim stopniu we frakcji sub-G1 i Poli (komórek poliploidalnych), względem komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem). Podobnie jak w przypadku obu linii nowotworowych (H460 oraz HCT116), QD_{zielone} i QD_{czerwone} nie powodowały zmian w cyklu komórkowym linii MRC-5, względem komórek kontrolnych.

Skonjugowanie UAs z QDs, względem związków w ich wolnej postaci, spowodowało spadek procentowego udziału komórek w fazie G2/M oraz S, przy jednoczesnym wzroście ich udziału w fazie G1. Liczba komórek w fazie sub-G1 nieznacznie spadła (z wyjątkiem koniugatu QD_{czerwone}-C-2045). Procentowy udział komórek poliploidalnych (Poli) pozostawał na stosunkowo stałym poziomie – dla koniugatów UAs z QD_{zielonymi} nieznacznie spadał, dla QD_{czerwonych} - rósł.



Rysunek 40. Histogramy obrazujące zmiany w dystrybucji komórek kontrolnych linii MRC-5 oraz inkubowanych z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami QDs z C-2028/C-2045 w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} badanych związków w ich wolnej postaci przez 72 h. Oś X – intensywność fluorescencji jodu propidyny określającego zawartość DNA. Oś Y - ilość komórek. Uzyskane histogramy są reprezentacyjne dla trzech niezależnych doświadczeń



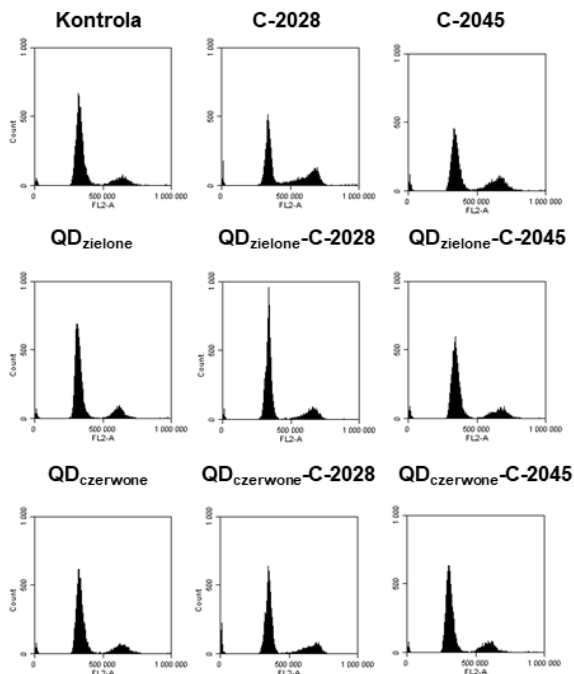
Rysunek 41. Procentowy udział komórek linii MRC-5, znajdujących się we frakcjach: (A) sub-G1, (B) G1 oraz (C) G2/M cyklu komórkowego po 72 h inkubacji z C-2028 i C-2045 oraz koniugatami tych związków z QDs, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci, wyznaczonej względem nowotworowej linii komórkowej H460). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

Analizując procentowy udział komórek, znajdujących się we frakcjach: sub-G1, G1 oraz G2/M po 72 h inkubacji z UAs oraz QDs-UAs (Rysunek 41.) można zauważyć, że indukują one niewielkie zmiany w progresji komórek prawidłowych linii MRC-5. Nie zaobserwowałam istotnej statystycznie różnicy w procentowej ilości komórek w fazie sub-G1, pomiędzy komórkami traktowanymi UAs a QDs-UAs. Traktowanie związkiem C-2028/C-2045 w jego wolnej postaci, powodowało zwiększenie udziału komórek MRC-5 we frakcji G2/M, kosztem spadku w fazie G1,

względem komórek kontrolnych. Co więcej, skoniugowanie UAs z QDs pozwoliło na zmniejszenie różnicy w ilości komórek w fazach G1 oraz G2/M, pomiędzy komórkami kontrolnymi a poddanymi ekspozycji nieskoniugowanego związku (C-2028/C-2045). Zjawisko to miało miejsce (istotnie statystycznie) głównie dla koniugatów C-2028 z QDs (głównie z QD_{czerwonymi}).

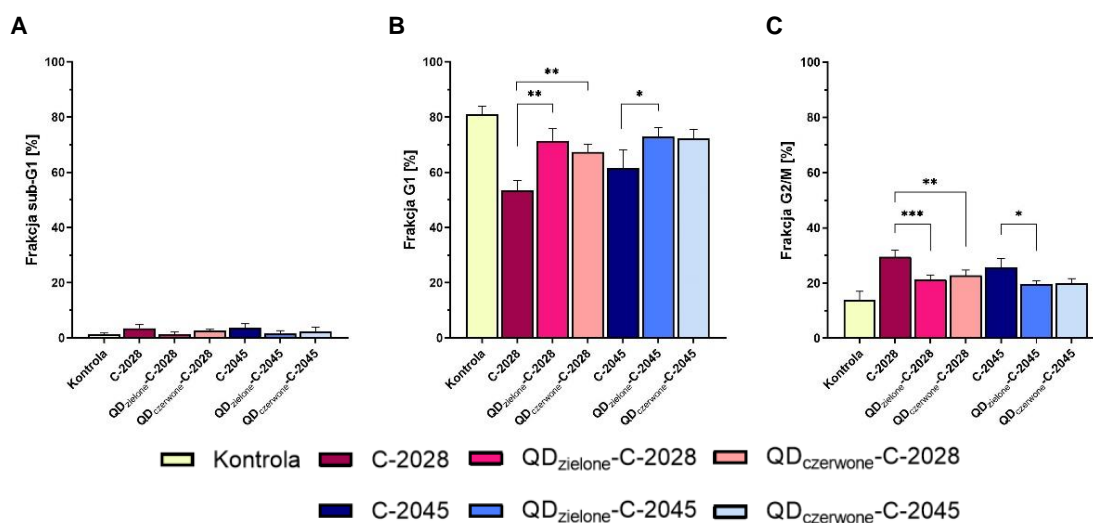
CCD 841 CoN

Badane związki C-2028 oraz C-2045 w stężeniu IC₈₀, wywoływały zmiany w procentowym rozkładzie komórek linii CCD 841 CoN w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (Tabela S8., Rysunek 42.). UAs, podobnie jak dla linii komórkowej MRC-5, powodowały spadek procentowej ilości komórek w fazie G1 kosztem wzrostu w fazie G2/M oraz w niewielkim stopniu we frakcji sub-G1, względem komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem) po 72 h inkubacji. W porównaniu do komórek kontrolnych wzrosła również procentowa zawartość komórek poliploidalnych, w szczególności dla komórek poddanych ekspozycji na działanie związku C-2028. Inkubacja komórek z QD_{zielonymi} oraz QD_{czerwonymi} nie powodowała zmian w cyklu komórkowym względem komórek kontrolnych. Skoniugowanie UAs z QDs, względem związków w ich wolnej postaci, spowodowało spadek populacji w fazie G2/M oraz S, przy jednoczesnym wzroście ich udziału w fazie G1. Liczba komórek w fazie sub-G1 nieznacznie spadła. Obserwowałam znaczny spadek procentowego udziału komórek poliploidalnych (Poli), względem komórek poddanych ekspozycji na związki w ich wolnej postaci, do wartości na poziomie komórek kontrolnych (nietraktowanych badanymi związkami).



Rysunek 42. Histogramy obrazujące zmiany w dystrybucji komórek kontrolnych linii CCD 841 CoN oraz inkubowanych z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami QDs z C-2028/C-2045 w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ badanych związków w ich wolnej postaci przez 72 h. Oś X – intensywność fluorescencji jodku propidyny określającego zawartość DNA. Oś Y - ilość komórek. Uzyskane histogramy są reprezentacyjne dla trzech niezależnych doświadczeń

Porównując procentowy udział komórek linii CCD 841 CoN we frakcjach: sub-G1, G1 oraz G2/M cyklu komórkowego po 72 h inkubacji z UAs można zaobserwować, że indukowały one zmiany w progresji komórek w cyklu życiowym (Rysunek 43.). Największe zmiany zaobserwowałam w fazie G1 oraz G2/M. Udział komórek w fazie G1 zmniejszał się, kosztem wzrostu w fazie G2/M, względem komórek kontrolnych. Z kolei, skoniugowanie UAs z QDs spowodowało istotnie statystycznie, zwiększenie procentowej zawartości komórek w fazie G1, przy jednoczesnym spadku w fazie G2/M, względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (głównie dla koniugatów C-2028 z QD). Udział komórek w fazie sub-G1 zaś pozostawał na stosunkowo stałym poziomie, niezależnie od postaci związku, jakim traktowane były komórki (związek w wolnej i skoniugowanej postaci).



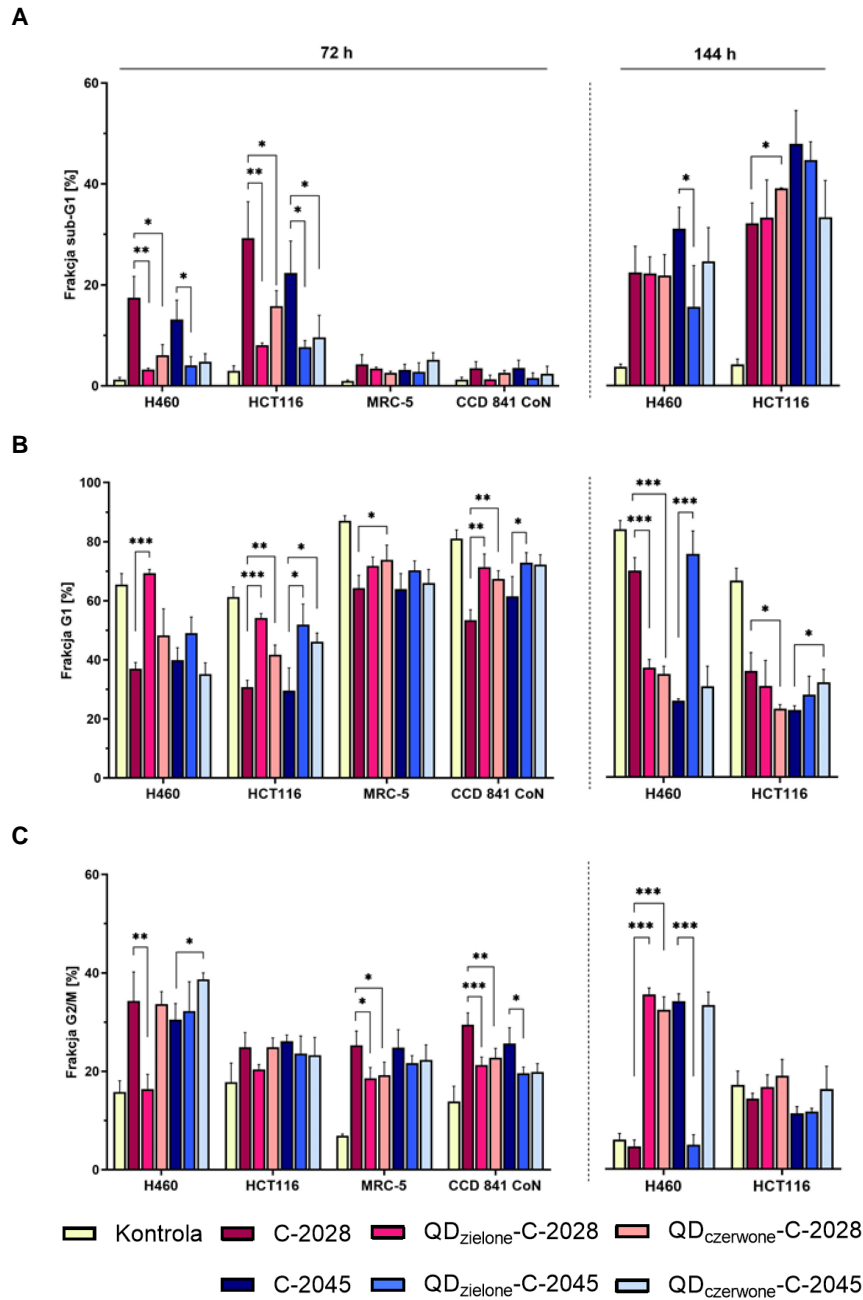
Rysunek 43. Procentowy udział komórek linii CCD 841 CoN, znajdujących się we frakcjach: (A) sub-G1, (B) G1 oraz (C) G2/M cyklu komórkowego po 72 h inkubacji z C-2028 i C-2045 oraz koniugatami tych związków z QDs, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci, wyznaczonej względem nowotworowej linii komórkowej HCT116). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

Podsumowanie

Badane związki oraz ich koniugaty z QDs wpłynęły znacząco na przebieg cyklu życiowego komórek nowotworowych, natomiast w komórkach prawidłowych zmiany te były mniej intensywne (Rysunek 44.). Skoniugowanie UAs z QDs spowodowało istotne zmiany (względem komórek traktowanych C-2028/C-2045) w procentowym udziale komórek nowotworowych linii H460 oraz HCT116 w fazie sub-G1, zarówno po 72 jak i 144 h inkubacji. Zmian tych nie zaobserwowałam w przypadku prawidłowych linii komórkowych: MRC-5 oraz CCD 841 CoN. We wszystkich liniach komórkowych zaobserwowałam natomiast zmiany w procentowej zawartości komórek w fazie G1 – głównie dla koniugatów C-2028 z QDs. Zmiana procentowego udziału komórek, poddanych ekspozycji QDs-UAs, w fazie G2/M natomiast, była istotna statystycznie dla wszystkich badanych linii komórkowych, z wyjątkiem linii HCT116.

Analizując przebieg cyklu życiowego komórek prawidłowych można zauważyć, że skoniugowanie badanych związków wpływało na zmianę procentowej zawartości komórek

w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, przybliżając je w „stronę” rozkładu poszczególnych faz komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem).

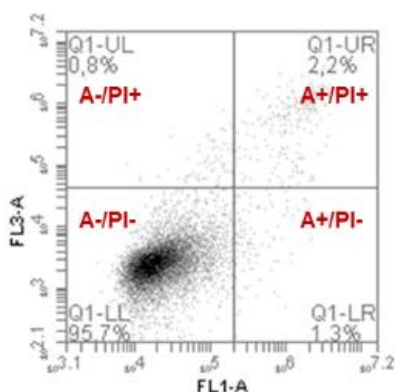


Rysunek 44. Procentowy udział komórek linii: H460, HCT116, MRC-5 oraz CCD 841 CoN, znajdujących się we frakcji: (A) sub-G1 (B) G1 i (C) G2/M cyklu komórkowego po 72 i 144 h inkubacji z komórkami kontrolnymi (nietraktowanymi badanymi związkami), C-2028 i C-2045 oraz koniugatami tych związków z QDs, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

Ze względu na znaczący udział komórek nowotworowych linii H460 oraz HCT116 w fazie sub-G1 (DNA $<2n$), charakterystycznej dla komórek apoptotycznych, kolejnym celem moich badań było zbadanie tego procesu.

3.5. Badanie zmian w budowie błony cytoplazmatycznej komórek ludzkich raków płuc i okrężnicy poddanych działaniu UAs, QDs oraz QDs-UAs

Celem kolejnego eksperymentu było sprawdzenie czy badane związki, zarówno w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci powodują zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej, wskazującej na indukcję określonego rodzaju śmierci komórkowej. W komórkach prawidłowych, ujemnie naładowana fosfatydyloseryna znajduje się po wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. W komórkach ulegających apoptozie, dochodzi zaś do jej translokacji do warstwy zewnętrznej. Białko – aneksyna V (A), w obecności jonów wapnia (Ca^{2+}) wykazuje silne powinowactwo do fosfatydyloseryny. Dzięki skoniugowaniu go z fluorochromem np. z tioizocyjanianem fluoresceiny (FITC) możliwa jest cytometryczna detekcja komórek apoptotycznych. Jodek propidyny (PI) z kolei, wnika do jądra komórek umierających i martwych, które posiadają uszkodzoną błonę cytoplazmatyczną. Podwójne barwienie Aneksyną V/PI pozwala więc na określenie rozkładu komórek żywych (A-/PI-), wczesnoapoptotycznych (A+/PI-), późnoapoptotycznych lub nekroptotycznych (A+/PI+) oraz nekrotycznych (A-/PI+) (Kowalski S., 2017).



Rysunek 45. Przykładowy cytogram obrazujący rozkład komórek w teście aneksyna V/PI:

- A-/PI- komórki żywe
- A+/PI- komórki wczesnoapoptotyczne
- A+/PI+ komórki późnoapoptotyczne lub nekroptotyczne
- A-/PI+ komórki nekrotyczne

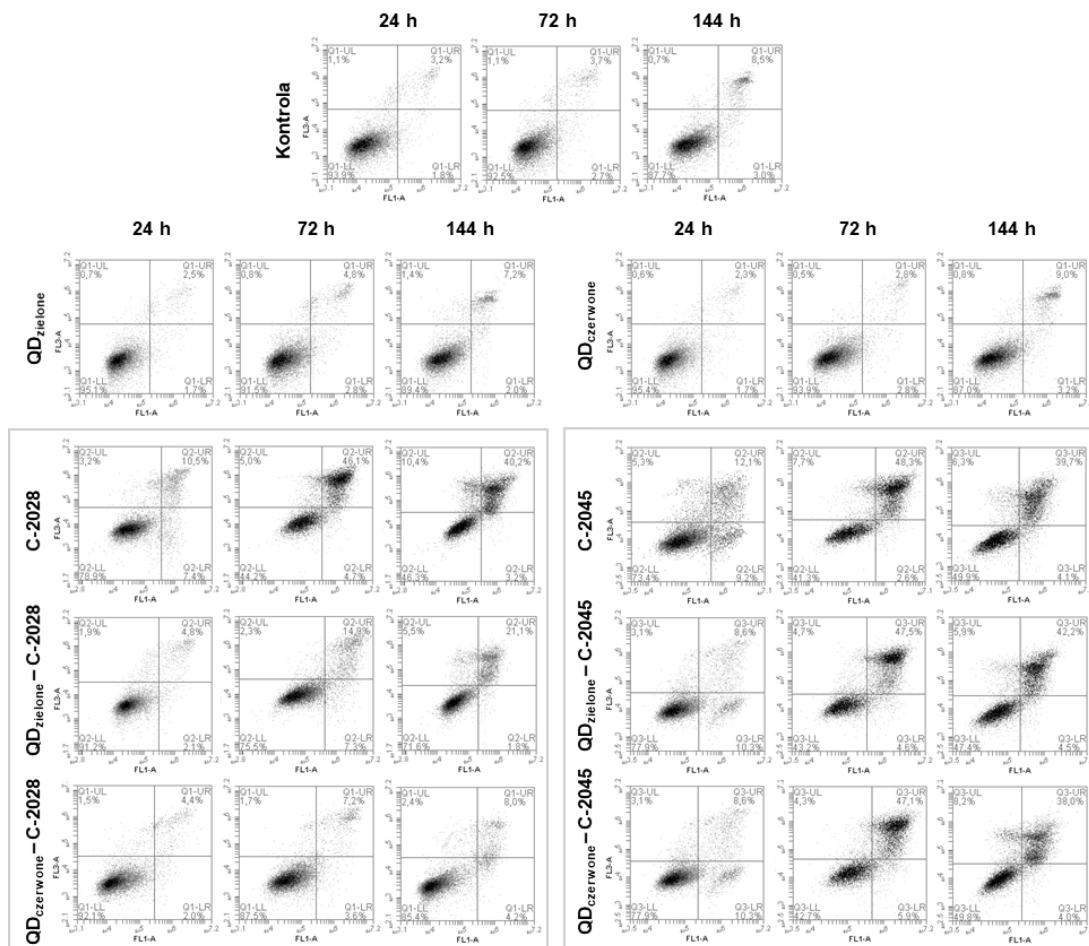
FL1-A - Intensywność fluorescencji FITC (skoniugowanej z aneksyną V); FL3-A - intensywność fluorescencji PI

Poniżej, przedstawiłam cytogramy oraz wykresy obrazujące rozkład komórek nowotworowych (H460 oraz HCT116) w teście aneksyna V/PI. Doświadczenie wykonałam dla komórek poddanych ekspozycji: QDs, ze związkami: C-2028 i C-2045, a także koniugatami tych związków z QDs, inkubowanych przez 24, 72 oraz 144 h, w stężeniach odpowiadających wartościom IC_{80} związków w ich wolnej, nieskoniugowanej postaci oraz dla komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem).

H460

W komórkach linii H460, pierwsze zmiany w budowie błony komórkowej, poddanych działaniu związków C-2028 oraz C-2045 obserwowałam już po 24 h inkubacji (Tabela S5., Rysunek 46.). Wraz ze wydłużającym się czasem ich inkubacji z badanymi związkami rosła ilość komórek późnoapoptotycznych (A+/PI+) oraz nekrotycznych (A-/PI+). Największą zaś populację komórek wczesnoapoptotycznych (A+/PI-), obserwowałam po 24 h inkubacji z UAs. Dla dłuższych czasów jej wielkość malała, głównie kosztem wzrostu populacji komórek późnoapoptotycznych (A+/PI+) oraz nekrotycznych. Dla najdłuższego czasu inkubacji (144 h) obserwowałam niewielki

spadek ilości komórek późnoapoptotycznych (o około 3-5%), kosztem wzrostu populacji komórek z niezmienną błoną komórkową. Nieskoniugowane QDs (zielone i czerwone) nie wpływały znacząco na zmianę w budowie błony cytoplazmatycznej komórek linii H460, względem komórek kontrolnych.

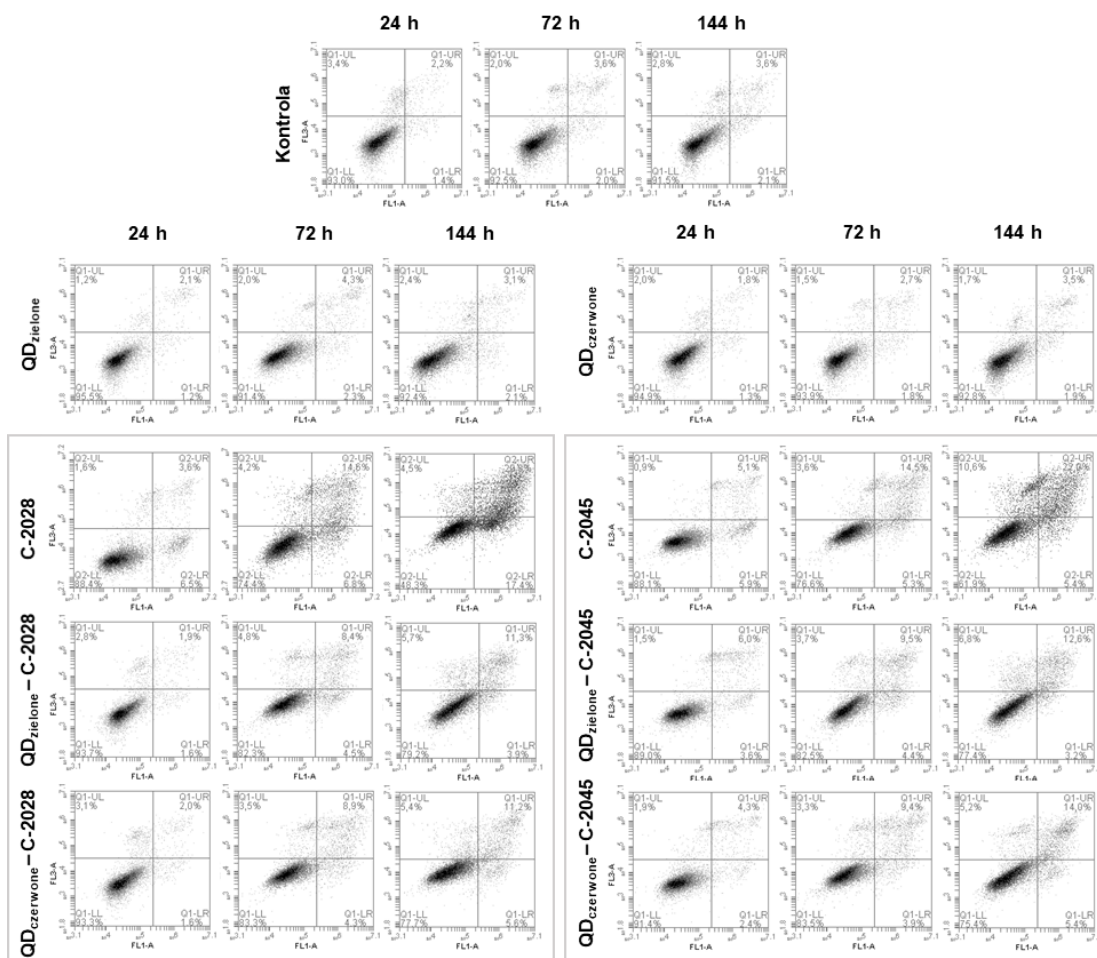


Rysunek 46. Zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej komórek kontrolnych linii H460 oraz traktowanych QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} badanych związków w ich wolnej postaci przez 24, 72 i 144 h. Oś X (FL1-A - intensywność fluorescencji FITC skoniugowanej z aneksyną V), oś Y (FL3-A - intensywność fluorescencji PI). Uzyskane cytogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Skoniugowanie UAs z QDs w przypadku związku C-2045 nie zmieniło znacząco odpowiedzi komórkowej. Niewielką zmianę (około 5%) w wielkości poszczególnych populacji (głównie komórek późnoapoptotycznych) obserwowałam pomiędzy koniugatami QDs-C-2045 a C-2045, w jego wolnej postaci. Populacja komórek późnoapoptotycznych (inkubowanych ≥ 72 h) była większa (QD_{zielone}-C-2045) bądź mniejsza (QD_{czerwone}-C-2045) niż w przypadku komórek traktowanych nieskoniugowanym C-2045. Co ciekawe, skoniugowanie C-2028 z QDs wpłynęło na znaczący spadek ilości komórek późnoapoptotycznych, jak również – w mniejszym stopniu, na ilość komórek wczesnoapoptotycznych oraz nekrotycznych kosztem wzrostu ilości komórek z niezmienną błoną komórkową (A-/PI-; Tabela S5.).

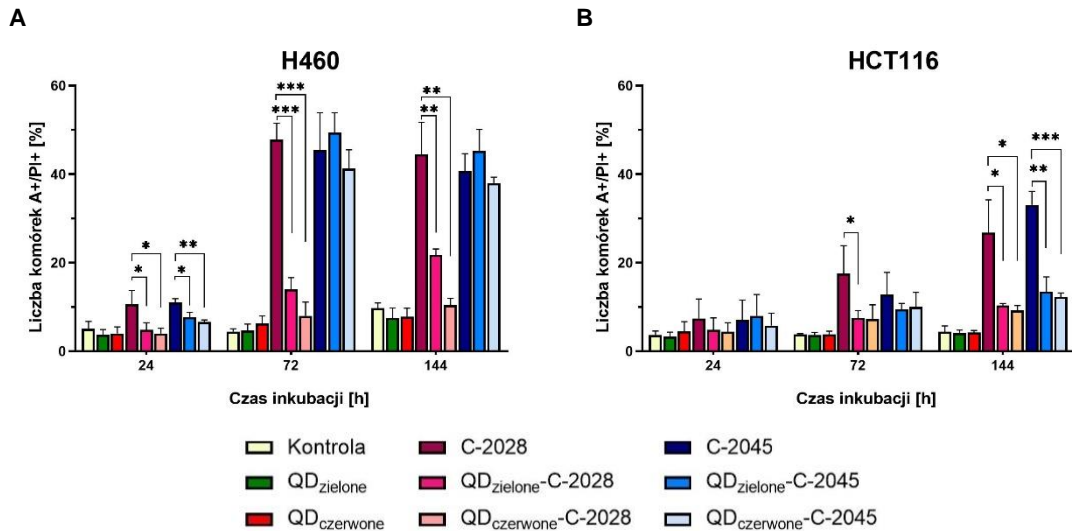
HCT116

Pierwsze zmiany w budowie błony komórkowej, w komórkach nowotworowej linii HCT116 poddanych działaniu niesymetrycznych bisakrydyn (C-2028 i C-2045) obserwowaliśmy już po 24 h inkubacji (Tabela S10., Rysunek 47.). Wraz ze wzrastającym czasem ich inkubacji rosła ilość komórek wczesno- (A+/PI-) i późnoapoptotycznych (A+/PI+) oraz nekrotycznych (A-/PI+). Nieskoniugowane kropki kwantowe (QD_{zielone} i QD_{czerwone}) nie wpływały zaś, na zmianę asymetrii i przepuszczalności błony komórkowej, względem komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem).



Rysunek 47. Zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej komórek kontrolnych linii HCT116 oraz traktowanych QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{50} badanych związków w ich wolnej postaci przez 24, 72 i 144 h. Oś X (FL1-A - intensywność fluorescencji FITC skoniugowanej z aneksyną V), oś Y (FL3-A - intensywność fluorescencji PI). Uzyskane cytogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Skoniugowanie UAs z kropkami kwantowymi (QDs) spowodowało spadek ilości komórek apoptotycznych (głównie późnoapoptotycznych), kosztem wzrostu populacji komórek z niezmienną błoną komórkową (A-/PI-). Tendencja ta wzrastała, wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek z QDs-UAs (Tabela S10.).

Podsumowanie

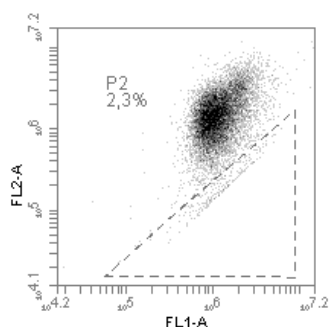
Rysunek 48. Wpływ czasu inkubacji komórek linii (A) H460 oraz (B) HCT116 z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} związków w ich wolnej postaci na ilość komórek późnoapoptotycznych (A+/PI+). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

Badane związki indukowały wyraźne zmiany w ilości komórek późnoapoptotycznych (A+/PI+), szczególnie w przypadku komórek linii H460 (Rysunek 48.). Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek badanych linii rosła procentowa ilość komórek późnoapoptotycznych (z wyjątkiem komórek linii H460, gdzie po 144 h inkubacji z UAs ich ilość spadała o około 5%). Nieobsadzone QDs nie wpływały natomiast na wzrost ilości komórek A+/PI+, niezależnie od badanej linii komórkowej.

Skoniugowanie UAs z QDs spowodowało spadek ilości komórek późnoapoptotycznych w komórkach linii H460 i HCT116. W przypadku komórek H460 istotny statystycznie spadek ilości komórek A+/PI+ obserwowałam już po 24 h inkubacji z QDs-UAs. Dla dłuższych czasów obserwowałam go jedynie dla komórek inkubowanych z QDs-C-2028, przy czym tendencja ta była wyższa dla koniugatów $QD_{czerwonych}$ -C-2028. Nie obserwowałam natomiast znaczącej różnicy w zmianie ilości komórek A+/PI+ traktowanych C-2045 w jego wolnej jak i skoniugowanej postaci (QDs-C-2045). W przypadku komórek linii HCT116 istotne zmiany w ilości komórek późnoapoptotycznych obserwowałam zarówno dla komórek inkubowanych z QDs-C-2028 (≥ 72 h) jak i QDs-C-2045 (144 h). Interesującym jest fakt, iż mimo znacznego spadku populacji komórek późnoapoptotycznych (linii H460) traktowanych QDs-C-2028, koniugaty te wykazują wyższą aktywność cytotoksyczną niż związek C-2028 w jego wolnej postaci (Rysunek 9.).

3.6. Oznaczenie zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ w komórkach ludzkich raków płuc i okrężnicy traktowanych QDs, UAs oraz QDs-UAs

Jednym z głównych parametrów określających zaburzenie funkcji mitochondriów podczas apoptozy jest spadek potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$) na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Adrie C., 2000; Sivandzade F., 2019). Oznaczenie zmian $\Delta\Psi_m$ pod wpływem UAs, ich koniugatów z QDs, a także nieobsadzonych związkami QDs, inkubowanych przez 24, 72 oraz 144 h, w stężeniach odpowiadających wartościom IC_{80} związków w ich wolnej, nieskoniugowanej postaci przeprowadziłam dla nowotworowych linii komórkowych H460 oraz HCT116 z wykorzystaniem barwnika JC-1. Ten lipofilowy barwnik, wnika do mitochondriów akumulując się w nich i o ile potencjał błonowy jest wysoki (błona mitochondrialna jest spolaryzowana) tworzy agregaty. W przypadku gdy wartość mitochondrialnego potencjału błonowego spada, ze względu na zwiększoną przepuszczalność błony, np. w komórkach apoptotycznych, spada również ilość agregatów barwnika, który zaczyna występować w formie monomeru (Sivandzade F., 2019).



Rysunek 49. Przykładowy cytogram obrazujący zmiany w mitochondrialnym potencjale błonowym komórek danej linii.

Oś X: FL1-A - intensywność fluorescencji pochodzącej od monomerów JC-1, oś Y: FL2-A - intensywność fluorescencji pochodząca od agregatów JC-1. Zaznaczony obszar przedstawia komórki, w których doszło do spadku mitochondrialnego potencjału błonowego

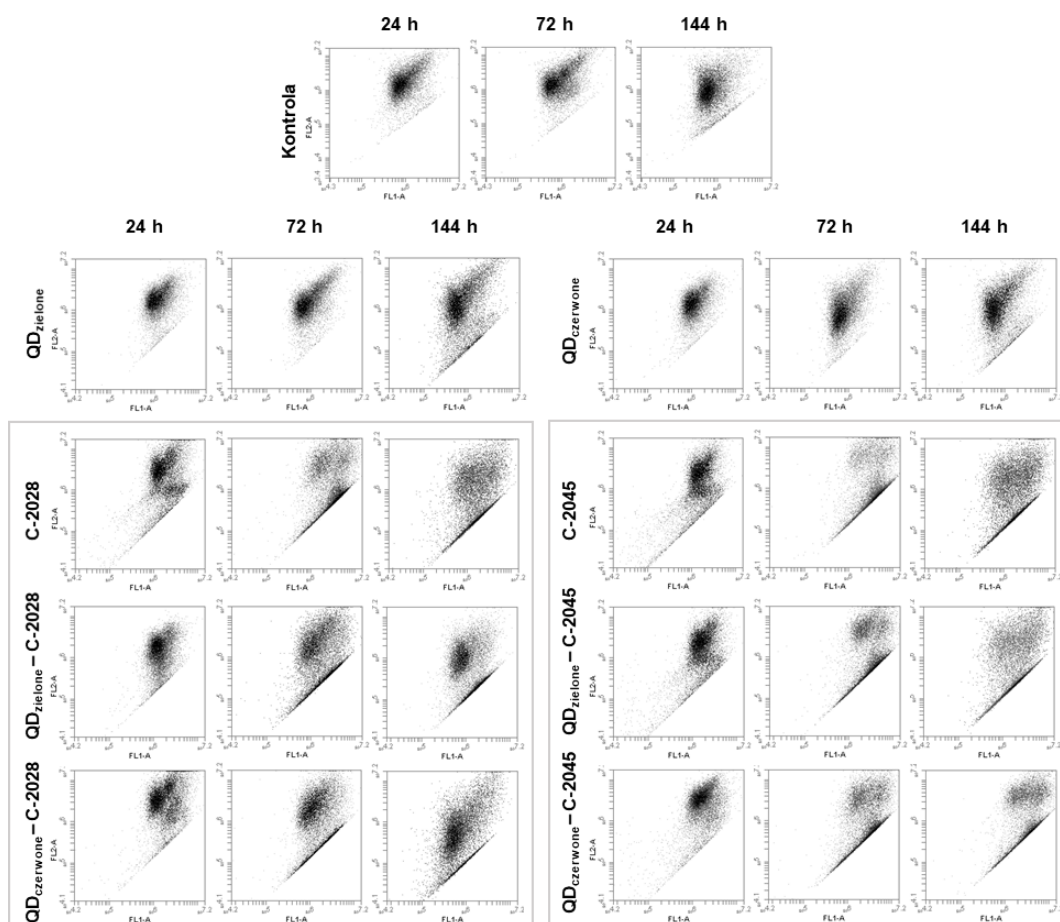
JC-1 w swojej monomerycznej postaci emituje zieloną fluorescencję, natomiast tworząc agregaty – emituje fluorescencję czerwoną. W komórkach, w których dochodzi do spadku mitochondrialnego potencjału błonowego, obserwuje się zatem spadek intensywności czerwonej fluorescencji, pochodzącej od agregatów JC-1, przy jednoczesnym wzroście intensywności zielonej fluorescencji pochodzącej od monomerów tego barwnika.

H460

Niesymetryczne bisakrydyny (UAs) indukują spadek mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$) w komórkach linii H460. Odsetek komórek z niskim $\Delta\Psi_m$ rośnie wraz z wydłużającym się czasem inkubacji (z wyjątkiem C-2045, gdzie najwyższy odsetek komórek z niskim $\Delta\Psi_m$ (około 61%) obserwowaliśmy po 72 h inkubacji) (Tabela S11., Rysunek 50.). Zarówno zielone jak i czerwone kropki kwantowe, niezależnie od czasu inkubacji nie wpływają, w sposób istotny statystycznie, na spadek potencjału błonowego, względem komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem).

Skoniugowanie C-2028 z QDs wpłynęło, istotnie statystycznie, na spadek odsetka komórek z obniżonym mitochondrialnym potencjałem błonowym. Tendencja ta była silniejsza w przypadku komórek inkubowanych z koniugatami badanego związku z QD_{czerwonymi}, niezależnie od czasu inkubacji. Dla komórek traktowanych QD_{zielonymi}-C-2028 najwyższy spadek $\Delta\Psi_m$

zaobserwowałam po 72 h inkubacji, którego wartość po 144 h pozostawała na podobnym poziomie (spadek o około 1%). W przypadku komórek traktowanych koniugatami QDs-C-2045, w porównaniu do nieskoniugowanego C-2045, początkowo (do 72 h inkubacji) obserwowałam spadek odsetka komórek z obniżonym mitochondrialnym potencjałem błonowym. Po 144 h natomiast wzrastał on o około 11% (względem C-2045), szczególnie dla koniugatu QD_{zielonych}-C-2045. Różnice ilości komórek z niskim potencjałem błonowym pomiędzy komórkami linii H460, traktowanymi UAs i QDs-UAs były znacząco wyższe dla C-2028 aniżeli dla C-2045.

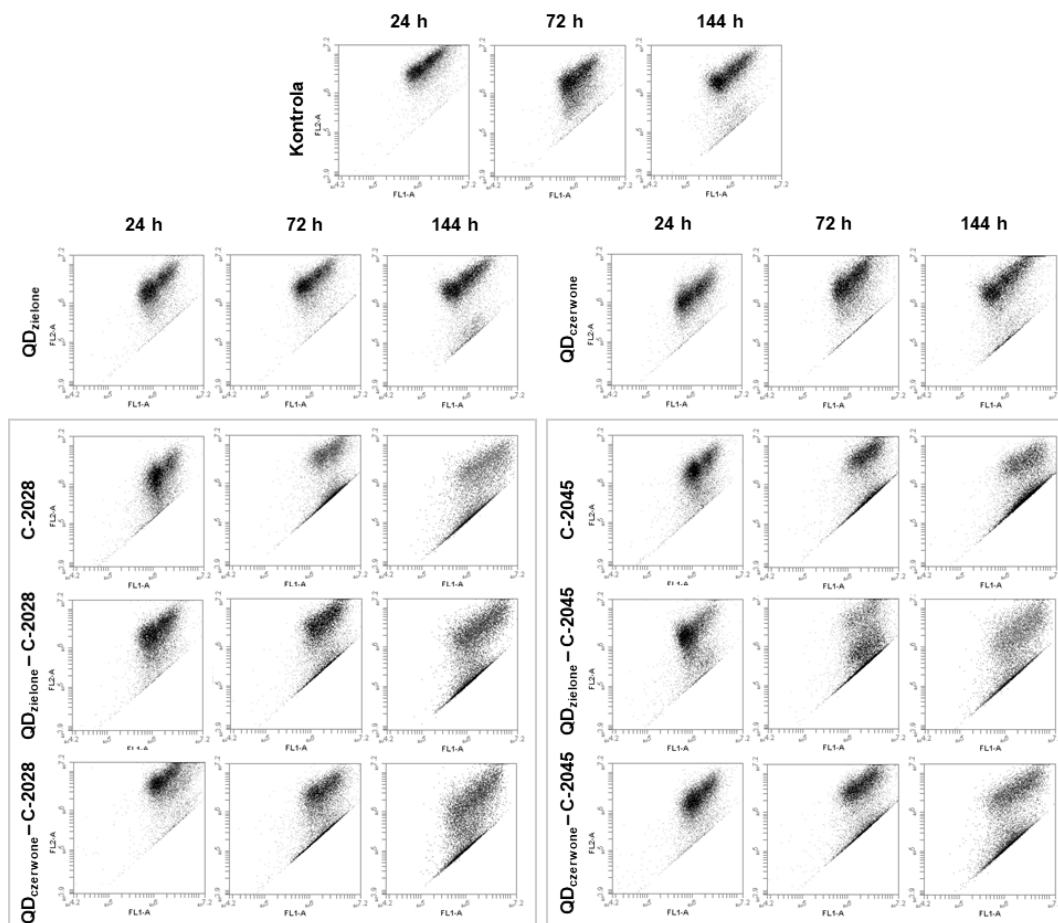


Rysunek 50. Cytometryczna analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego komórek linii H460 po 24, 72 i 144 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ związków w ich wolnej postaci. Oś X (FL1-A - intensywność fluorescencji pochodzącej od monomerów JC-1), oś Y (FL2-A - intensywność fluorescencji pochodząca od agregatów JC-1). Uzyskane cytogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

HCT116

Badane związki indukują spadek mitochondrialnego potencjału błonowego w komórkach linii HCT116. Odsetek komórek z niskim $\Delta\Psi_m$ rośnie wraz z wydłużającym się czasem inkubacji (Tabela S12., Rysunek 51.). Tendencja ta jest silniejsza w przypadku komórek traktowanych związkiem C-2028, w porównaniu do C-2045. Nieskoniugowane kropki kwantowe (QD_{zielone} i QD_{czerwone}) nie wpływają znacząco na wzrost odsetka komórek z obniżonym mitochondrialnym potencjałem błonowym.



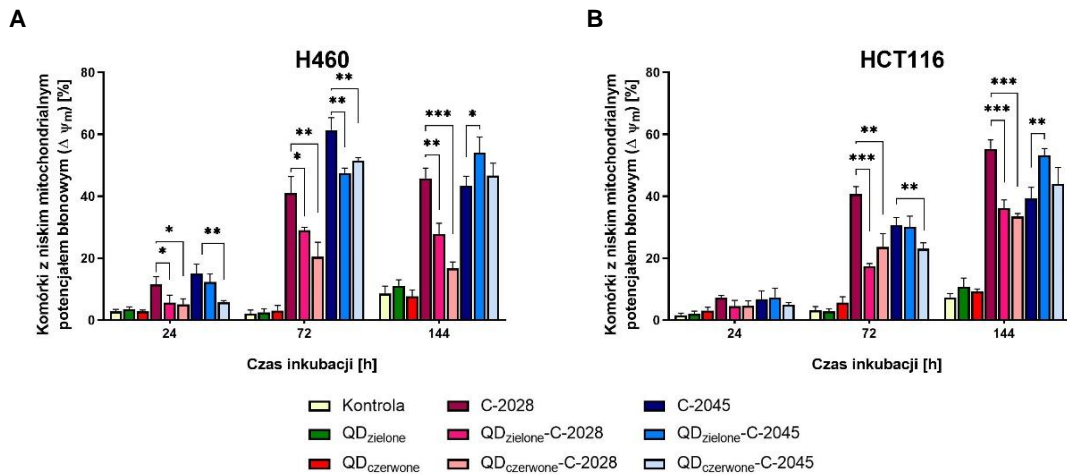


Rysunek 51. Cytometryczna analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego komórek linii HCT116 po 24, 72 i 144 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} związków w ich wolnej postaci. Oś X (FL1-A - intensywność fluorescencji pochodzącej od monomerów JC-1), oś Y (FL2-A - intensywność fluorescencji pochodząca od agregatów JC-1). Uzyskane cytogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Skoniugowanie C-2028 z QDs wpłynęło na spadek odsetka komórek z niskim potencjałem błonowym, niezależnie od czasu inkubacji. QDs-C-2028 obniżyły odsetek komórek z niskim $\Delta\Psi_m$ do stosunkowo podobnych wartości (różnice 3–6%). Porównując odsetek komórek linii HCT116 z niskim $\Delta\Psi_m$, traktowanych C-2045 w jego wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci można zauważyć, że do 72 h inkubacji pozostawał on na podobnym poziomie (z wyjątkiem QDczerwonych-C-2045 dla 72 h). Po 144 h inkubacji z QDs-C-2045 natomiast, wzrastał, szczególnie w przypadku QDzielonych-C-2045 (do około 53%). Różnice w ilości komórek z niskim potencjałem błonowym pomiędzy komórkami linii HCT116, traktowanymi UAs i QDs-UAs były wyższe dla C-2028 niż dla C-2045 i zależały od czasu inkubacji.

Podsumowanie

UAs indukują spadek mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$) w obydwu badanych liniach komórkowych (Rysunek 52.). Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji z UAs rośnie odsetek komórek z obniżonym $\Delta\Psi_m$ (z wyjątkiem komórek linii H460 traktowanych C-2045, gdzie ich najwyższy odsetek obserwowaliśmy po 72 h inkubacji). Nieobsadzone QDs nie wpływały natomiast znacząco, na zmianę ilości komórek z $\Delta\Psi_m$, względem komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem), niezależnie od badanej linii komórkowej.



Rysunek 52. Odsetek komórek linii (A) H460 oraz (B) HCT116 z niskim mitochondrialnym potencjałem błonowym ($\Delta\Psi_m$) po 24, 72 i 144 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} związków w ich wolnej postaci. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

Skoniugowanie C-2028 z QDs wpłynęło, w sposób istotny statystycznie, na spadek odsetka komórek z $\Delta\Psi_m$ w komórkach obydwu badanych linii, niezależnie od czasu inkubacji. Tendencja ta była wyższa dla koniugatów badanego związku z QD czerwonymi (z wyjątkiem komórek linii HCT116 inkubowanych przez 72 h). Zmiany w wielkości odsetka komórek z $\Delta\Psi_m$ po skoniugowaniu C-2045 z QDs, zależne były od czasu inkubacji. Dla krótszych czasów (do 72 h inkubacji), skoniugowanie badanego związku z kropkami kwantowymi albo nie wpływało, albo powodowało niewielkie obniżenie odsetka komórek z $\Delta\Psi_m$. Po 144 h natomiast, obserwovałam wzrost odsetka komórek z niskim mitochondrialnym potencjałem błonowym. Różnice te były jednak o wiele niższe niż dla komórek inkubowanych z koniugatami QDs-C-2028 (względem C-2028 w jego wolnej postaci).

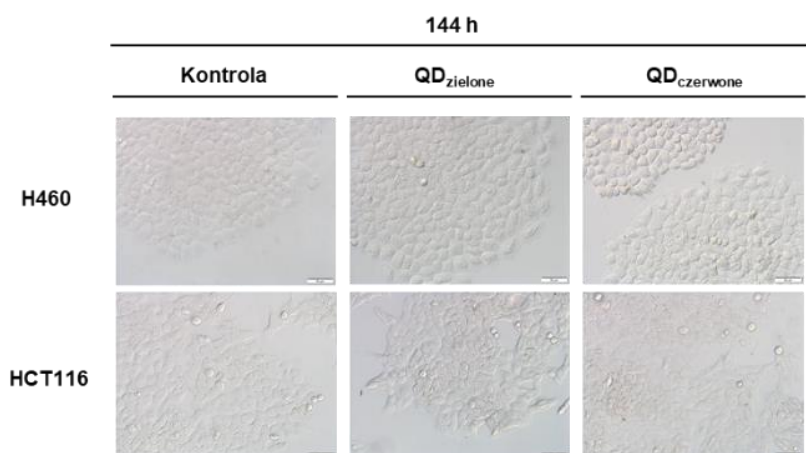
Kinetyka zmian w ilości komórek z obniżonym $\Delta\Psi_m$ obydwu badanych linii komórkowych, traktowanych UAs po ich skoniugowaniu z QDs, koreluje się z kinetyką zmian w ilości komórek późnoapoptotycznych (test aneksyna V/PI; Rysunek 48.) (z wyjątkiem HCT116 traktowanych QDs-C-2045 przez 144 h). Co ciekawe, mimo znacznego spadku ilości komórek z niskim $\Delta\Psi_m$ oraz komórek późnoapoptotycznych, traktowanych koniugatami QDs-C-2028, obydwu badanych linii, koniugaty te wykazują wyższą aktywność cytotoksyczną niż związek C-2028 w jego wolnej postaci, ale tylko w przypadku komórek linii H460 (Rysunek 9.). Może to świadczyć o tym, że wzrost aktywności cytotoksycznej badanych koniugatów wobec komórek linii H460, nie jest bezpośrednio związany ze spadkiem ilości komórek z obniżonym $\Delta\Psi_m$ czy ze zmienioną budową błony cytoplazmatycznej, a odpowiedzialne są za to dodatkowo inne procesy zachodzące w komórce.

3.7. Określenie zdolności niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z kropkami kwantowymi do indukowania procesu przyspieszonego starzenia w komórkach ludzkich raków okrężnicy i płuc

Ze względu na fakt, że dość znaczna frakcja komórek, traktowanych związkami C-2028 oraz C-2045, zarówno w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci (w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} związków w ich wolnej postaci, wyznaczonych względem danej linii nowotworowej) pozostawała żywa, celem kolejnego eksperymentu było sprawdzenie czy ulegają one przyspieszonemu starzeniu komórkowemu.

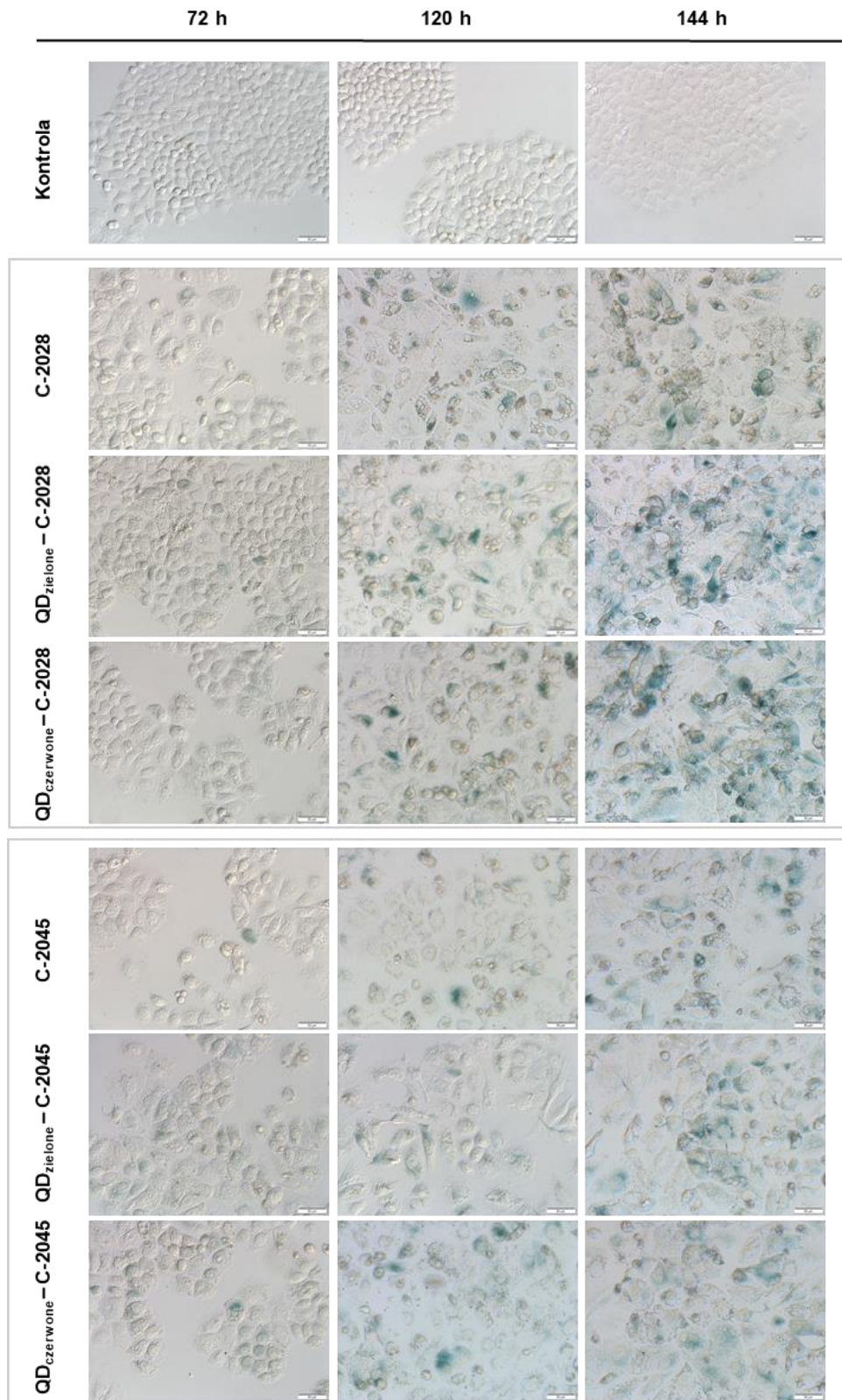
Badanie indukcji przyspieszonego procesu starzenia komórkowego pod wpływem UAs, ich koniugatów z QDs, a także nieobsadzonych związkami QDs, inkubowanych przez 72, 120 oraz 144 h, w stężeniach odpowiadających wartościom IC_{80} związków w ich wolnej, nieskoniugowanej postaci przeprowadziłam dla nowotworowych linii komórkowych (H460, HCT116) z wykorzystaniem X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktopiranozyd). Jest on substratem enzymu SA- β -galaktozydazy (ang. Senescence-Associated β -galactosidase), który w komórkach podlegających starzeniu komórkowemu ulega nadekspresji. Enzym ten hydrolizuje X-Gal w pH równym 6,0, do widocznego pod mikroskopem świetlnym niebieskiego produktu. Obok zmian na poziomie biochemicznym (rozkład X-Gal do widocznego niebieskiego produktu), komórki ulegające procesowi starzenia cechują się zmianami morfologicznymi – są powiększone i spłaszczone, a w ich wnętrzu można dostrzec liczne ziarnistości (Dimri G. P., 1995).

W celu wykazania, że starzenie komórek jest wynikiem działania związku, a nie zbyt długim czasem inkubacji, przegęszczeniem komórek bądź też brakiem składników odżywczych, do każdego z czasów inkubacji komórek z danym wariantem związku przedstawiłam zdjęcia preparatów komórek nietraktowanych związkiem (komórek kontrolnych).



Rysunek 53. Indukcja procesu przyspieszonego starzenia w komórkach poddanych ekspozycji QD_{zielonych} i QD_{czerwonych} oraz w komórkach kontrolnych (nietraktowanych związkiem) nowotworowych linii H460 i HCT116, w stężeniu IC_{80} (stężenie QDs w koniugacie, odpowiadające IC_{80} UAs w wolnej postaci) przez 144 h; skala 50 μ m. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Zarówno zielone jak i czerwone kropki kwantowe inkubowane przez 144 h z komórkami linii H460 i HCT116, nie indukowały przyspieszonego starzenia komórkowego (Rysunek 53.). Nie zaobserwowałam zmian zarówno w powstawaniu niebieskiego produktu (na skutek hydrolizy X-Gal), jak również w wielkości i kształcie komórek, względem komórek kontrolnych.

H460

Rysunek 54. Indukcja procesu przyspieszonego starzenia komórkowego nowotworowej linii H460 w komórkach kontrolnych (nietraktowanych związkiem) oraz poddanych ekspozycji: C-2028 i C-2045 i koniugatami tych związków z QDs po 72, 120 i 144 h inkubacji, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci). Charakterystyczne niebieskie zabarwienie cechuje komórki starzejące się; skala 50 μ m. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Analiza zdjęć mikroskopowych wykazała, że związki C-2028 i C-2045, w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci, w stężeniu IC_{80} (wyznaczonymi dla nieskoniugowanych związków) indukowały przyspieszone starzenie w komórkach nowotworowej linii H460, (Rysunek 54.). Począwszy od 72 h inkubacji, obserwovałam komórki o niebieskim zabarwieniu, powstałym na skutek rozkładu X-Gal przez SA- β -galaktozydazę. Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji ze związkiem (C-2028/C-2045) ilość komórek o niebieskim zabarwieniu wzrastała, a komórki, względem komórek kontrolnych, były powiększone oraz lekko spłaszczone i wydłużone. Związki C-2028 oraz C-2045 indukowały proces przyspieszonego starzenia komórkowego nowotworowej linii H460 w podobnym stopniu. Po 72 h inkubacji procentowy udział komórek starzejących się w populacji wynosił dla związku C-2028 około 1,2%, dla C-2045 – około 2,3%, po 120 h odpowiednio: 19,7% i 18,8% oraz po 144 h – 65,4% i 59,7%.

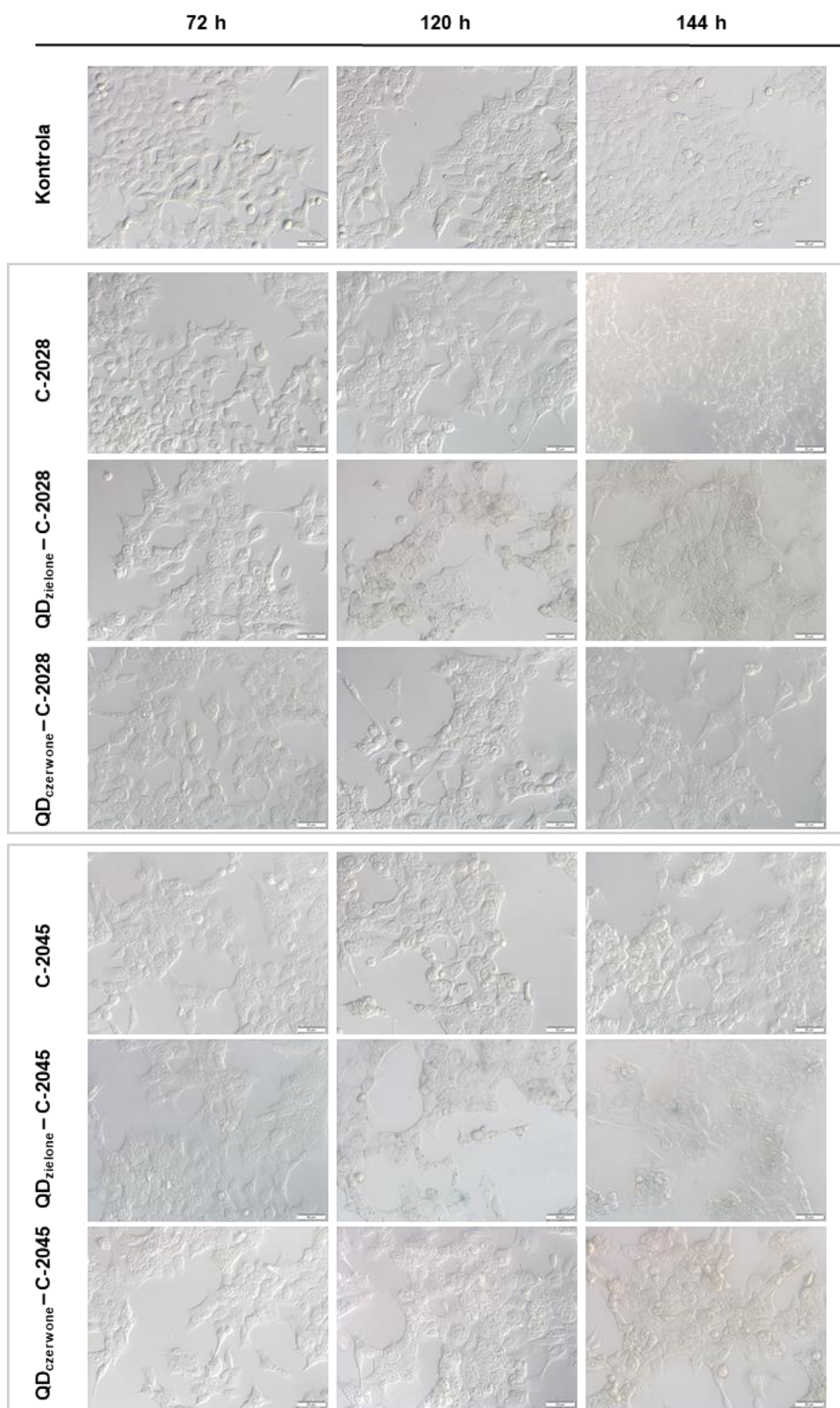
Skoniugowanie UAs z QDs prowadziło do zwiększonej indukcji procesu przyspieszonego starzenia komórkowego. W porównaniu do komórek traktowanych związkiem (C-2028/C-2045) w jego wolnej postaci, ilość powstającego niebieskiego produktu na skutek rozkładu X-Gal'u była wyższa, istotnie statystycznie, dla komórek poddanych ekspozycji tych związków skoniugowanych z kropkami kwantowymi. Wielkość i kształt komórek inkubowanych z koniugatami UAs z QDs była podobna do komórek traktowanych nieskoniugowanymi UAs.

Największe zmiany, istotne statystycznie, w procentowej zawartości komórek starzejących się nowotworowej linii H460, po traktowaniu ich koniugatami UAs z QDs, niezależnie od czasu inkubacji, zaobserwovałam dla koniugatów: QD_{zielonych}-C-2028 i QD_{czerwonych}-C-2045. Ponadto, ilość komórek starzejących się, po najdłuższym czasie inkubacji (144 h) z wszystkimi koniugatami QDs-UAs, wzrosła istotnie statystycznie, w porównaniu do komórek inkubowanych ze związkami (C-2028/C-2045) w ich wolnej postaci. Po 144 h inkubacji procentowa zawartość komórek starzejących się linii H460 wynosiła dla: QD_{zielonych}-C-2028 – 80,2%, QD_{czerwonych}-C-2028 – 77,4%, QD_{zielonych}-C-2045 – 67,1% oraz QD_{czerwonych}-C-2045 – 67,6%.

HCT116

Badane niesymetryczne bisakrydyny (C-2028/C-2045) nie indukowały przyspieszonego starzenia komórkowego nowotworowej linii HCT116 (Rysunek 55.). Niezależnie od czasu inkubacji komórek z UAs (72, 120 i 144 h) w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} , procentowa zawartość komórek starzejących się w populacji oscylowała na poziomie 1%. Komórki poddane ekspozycji UAs dla dłuższych czasów inkubacji (≥ 120 h), były nieznacznie powiększone i lekko wydłużone, względem komórek kontrolnych.

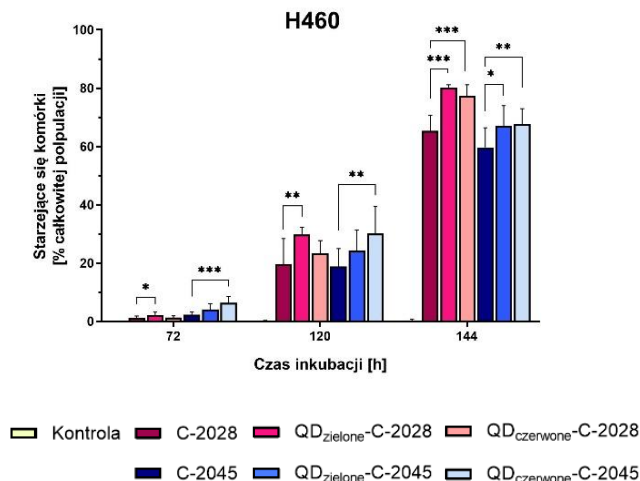
Skoniugowanie UAs z kropkami kwantowymi nie przełożyło się na wzmożenie procesu indukcji przyspieszonego starzenia komórkowego. Pojedyncze komórki z niebieskim produktem, o lekko zmienionym kształcie (powiększone, wydłużone) zaobserwovałam jedynie dla komórek inkubowanych z koniugatami QDs-C-2045 (głównie QD_{zielonymi}-C-2045 do około 3%) dla dłuższych czasów inkubacji (≥ 120 h).



Rysunek 55. Indukcja procesu przyspieszonego starzenia komórkowego nowotworowej linii HCT116 w komórkach kontrolnych (nietraktowanych związkami) oraz poddanych ekspozycji: C-2028 i C-2045 i koniugatami tych związków z QDs po 72, 120 i 144 h inkubacji, w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ (C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci). Charakterystyczne niebieskie zabarwienie powinno cechować komórki starzejące się; skala 50 μm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Podsumowanie

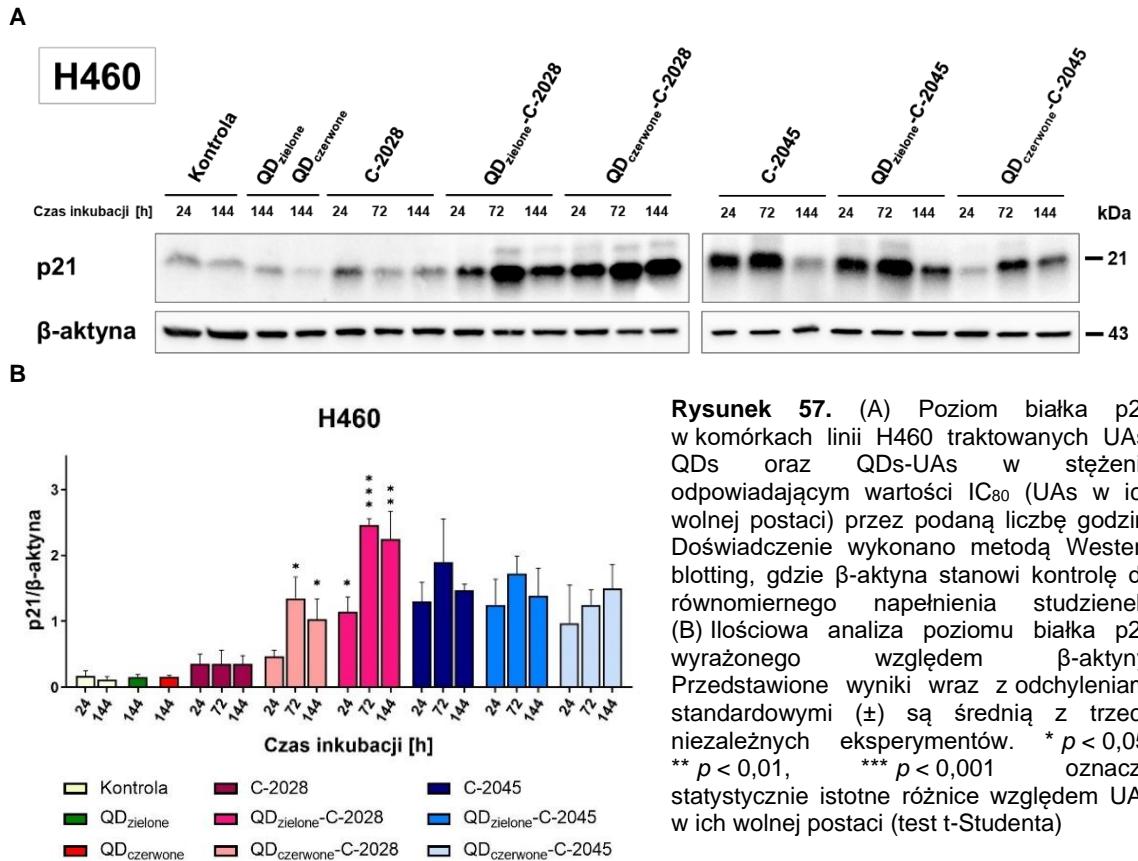
Badane związki (C-2028/C-2045) w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci indukowały proces przyspieszonego starzenia komórkowego nowotworowej linii H460, w przeciwieństwie do linii HCT116. Zarówno zielone jak i czerwone kropki kwantowe po 144 h inkubacji, nie indukowały przyspieszonego procesu starzenia w komórkach H460 i HCT116.



Rysunek 56. Zmiany w procentowej ilości starzejących się komórek nowotworowej linii H460 z aktywną SA- β -galaktozydazą: w komórkach kontrolnych (nietraktowanych związkiem) oraz poddanych ekspozycji: C-2028 i C-2045 i koniugatami tych związków z QDs po 72, 120 i 144 h inkubacji, w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ (C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią dla trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek linii H460 z UAs ilość powstającego niebieskiego produktu, powstałego na skutek hydrolizy X-Gal, wzrastała. Skoniugowanie zaś UAs z QDs wzmacniało ten proces, w sposób istotnie statystyczny, w porównaniu do komórek inkubowanych z UAs w ich wolnej postaci (Tabela S13., Rysunek 56.). UAs w ich wolnej, jak i skoniugowanej z QDs postaci, nie indukowały przyspieszonego procesu starzenia w komórkach linii HCT116. Wzrost procentowej ilości komórek starzejących się, istotny statystycznie, zaobserwowałam jedynie dla komórek, poddanych ekspozycji (≥ 120 h) z QDs-C-2045. Wartości te jednak nie przekraczały 3% komórek starzejących się w całkowitej populacji.

Wyniki mikroskopowej analizy zdjęć komórek linii H460 poparłam dodatkowo analizą Western blotting poziomu ekspresji białka p21. Białko to jest inhibitorem kinaz zależnych od cyklu regulującym cykl komórkowy w fazie G1, jak również pośredniczy w procesie starzenia komórkowego (Shamloo B., 2019). Rysunek 57. ilustruje poziom białka p21 w komórkach linii H460 traktowanych QDs, UAs oraz QDs-UAs. Badane związki (UAs) indukują wzrost poziomu białka p21 w komórkach badanej linii, przy czym w znacznie wyższym stopniu w przypadku związku C-2045. Skoniugowanie C-2028 z QDs zwiększyło poziom białka p21 niezależnie od czasu inkubacji komórek z danym wariantem koniugatu (który był wyższy w przypadku QD_{czerwonych}-C-2028). Z kolei, skoniugowanie C-2045 z QDs nie zmieniło, istotnie statystycznie poziomu tego białka w komórkach linii H460, niezależnie od czasu inkubacji.



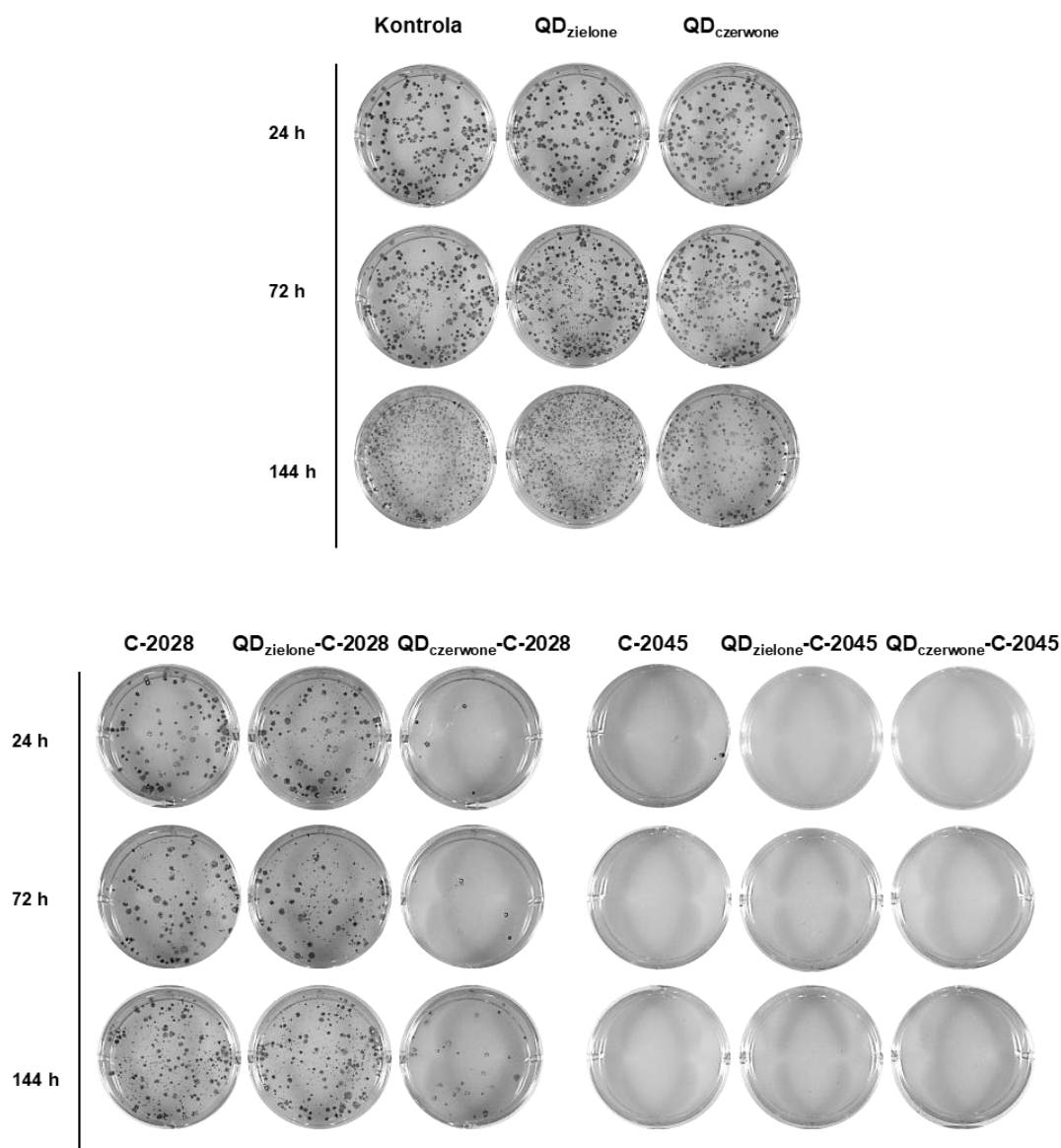
3.8. Badanie zdolności niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z kropkami kwantowymi do nieodwracalnego zahamowania proliferacji w komórkach ludzkich raków i płuc

Zatrzymanie proliferacji komórek, poddanych działaniu chemioterapeutyku może być odwracalne lub nieodwracalne. Testy kolorymetryczne oraz fluorescencyjne np. z wykorzystaniem błękitu trypanu czy jodku propidyny pozwalają na oznaczenie wielkości populacji komórek, które umarły na skutek poddania ich działaniu chemioterapeutyku w danym czasie. Nie pozwalają one jednak na określenie ilości komórek, które umierają bądź też dopiero umrą (Crowley L. C., 2016). Zdolność do trwałego zahamowania wzrostu komórek po zakończeniu chemioterapii jest niezwykle istotne z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej, ze względu na możliwe wznowy choroby jak i proces przerzutowania.

Z poprzednich badań wynikało, że pewna frakcja komórek nowotworowych inkubowanych zarówno z badanymi związkami, jaki ich koniugatami z QDs pozostawała żywa, bądź też się powiększała – zwłaszcza w przypadku komórek linii H460 traktowanych koniugatami QDs-C-2028. Dlatego też, prawdopodobnym wydawało się, że po usunięciu badanych związków jak i ich koniugatów z QDs z podłoża, badane komórki mogą wznović proliferację. W celu weryfikacji tej hipotezy sprawdziłam czy zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych poddanych działaniu UAs, QDs oraz QDs-UAs jest odwracalne. W tym celu przeprowadziłam badanie polegające na określeniu zdolności do tworzenia kolonii (test przeżywalności) komórek

nowotworowych linii H460 oraz HCT116 poddanych działaniu UAs, QDs oraz QDs-UAs przez 24, 72 oraz 144 h w stężeniu IC_{80} , a następnie poddanych 14-dniowej postinkubacji w pożywce niezawierającej badanych związków.

H460



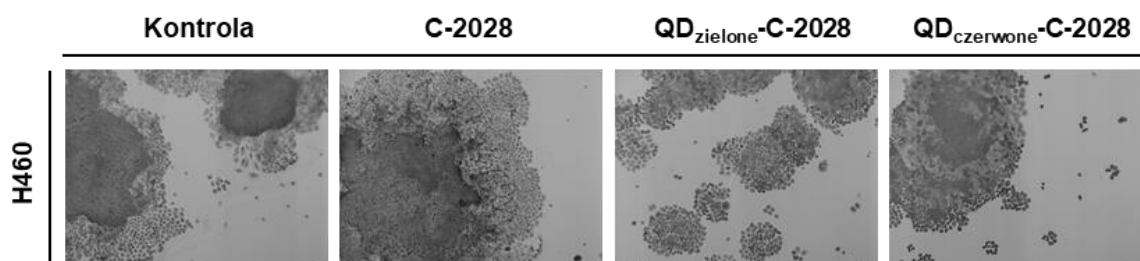
Rysunek 58. Zdolność do tworzenia kolonii przez komórki nowotworowej linii H460 inkubowane z QDs, UAs oraz ich koniugatami z QDs (QDs-UAs) w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} UAs w ich wolnej postaci przez 24, 72 oraz 144 h, a następnie poddane 14-dniowej postinkubacji. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Zdolność do trwałego zahamowania wzrostu komórek nowotworu płuc H460 zależna jest od rodzaju związku (C-2028/C-2045) z jakimi były inkubowane (Rysunek 58., Tabela S14.). Komórki inkubowane ze związkiem C-2028 były zdolne do odtworzenia kolonii po jego usunięciu z medium hodowlanego, a więc posiadały zdolność do powrotu do proliferacji. Ilość kolonii utrzymywała się na podobnym poziomie (około 100 kolonii), niezależnie od czasu inkubacji komórek. W przypadku komórek traktowanych związkiem C-2045 nie obserwovałam powstających kolonii (z wyjątkiem komórek traktowanych C-2045 przez 24 h, gdzie

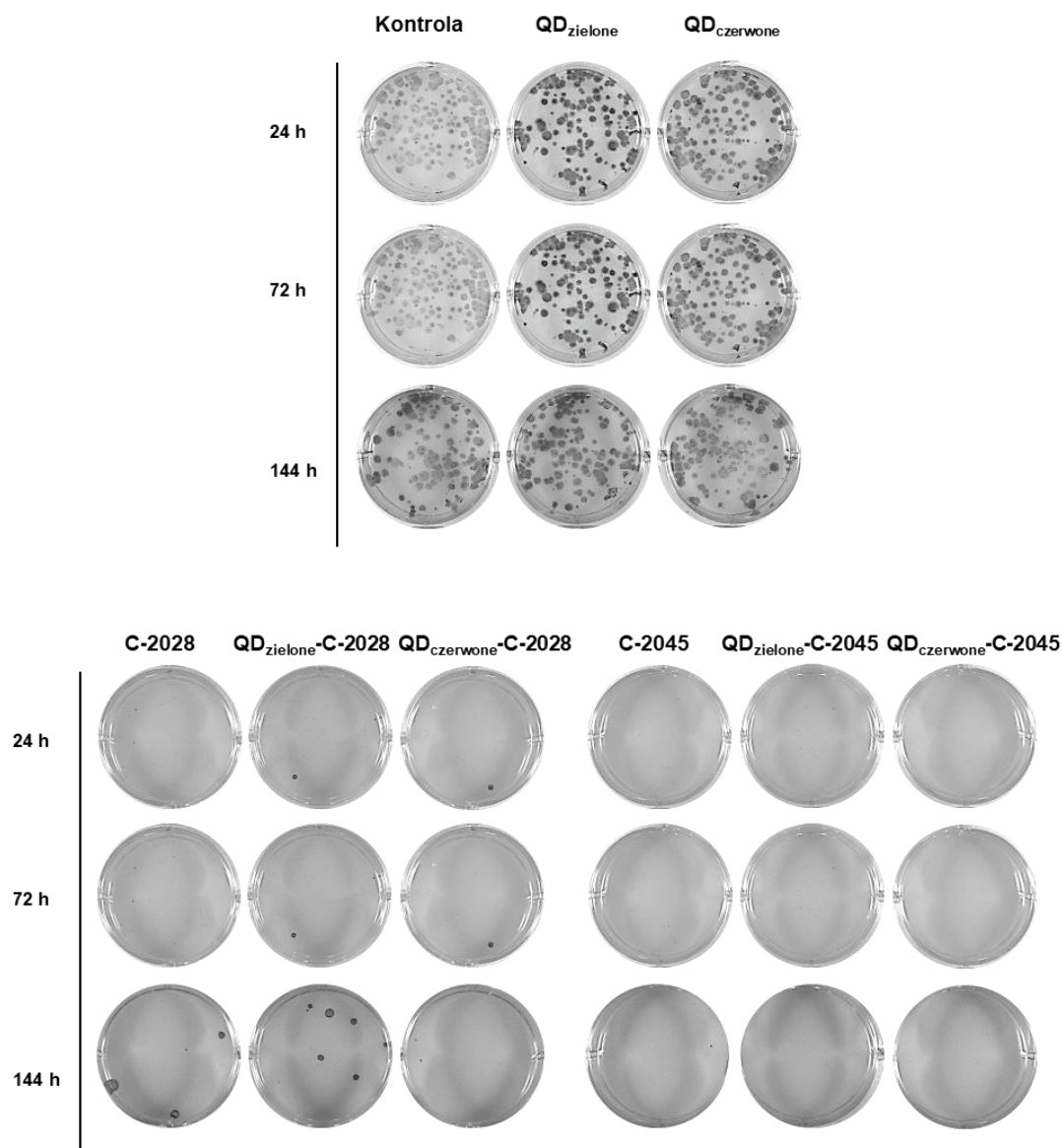
zaobserwowałam pojedynczą kolonię). Świadczy to o tym, że związek ten posiada zdolność do trwałego zahamowania proliferacji komórek. Nieskoniugowane QDs (zielone i czerwone) nie hamowały wzrostu komórek, a ilość powstających kolonii odpowiadała kontroli (komórkom nietraktowanym związkiem).

Skoniugowanie C-2028 z QDs wpłynęło przede wszystkim na wzrost ilości „małych” kolonii, szczególnie w przypadku koniugatu z QD_{zielonymi} (QD_{zielone}-C-2028). W przypadku koniugatu C-2028 z QD_{czerwonymi} (QD_{czerwone}-C-2028), względem C-2028 w jego wolnej postaci, zaobserwowałam wyraźny spadek ilości kolonii. Po 144 h inkubacji zaś, ich liczba wzrastała, jednak wciąż była znacząco niższa niż w przypadku komórek traktowanych nieskoniugowanym C-2028. Koniugaty QDs-C-2045 zaś, niezależnie od czasu inkubacji, trwale zahamowały proliferację komórek linii H460.

W przypadku komórek linii H460 inkubowanych ze związkiem C-2028 obserwowałam obecność małych kolonii, powstałych na skutek odłączania się komórek od większych kolonii tzw. „kolonii satelitarnych” w większej ilości niż w przypadku komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem). Ich ilość rosła, w przypadku komórek traktowanych koniugatem tego związku z QDs, szczególnie dla QD_{zielonych}. Ilość „kolonii satelitarnych” zależała od czasu inkubacji komórek z danym wariantem związku, a ich największą ilość zaobserwowałam po 72 h. Ilość jak i obecność „kolonii satelitarnych” może świadczyć o zwiększonej zdolności do migracji komórek (Page A., 2019), co jest niekorzystne z punktu widzenia terapii nowotworowej, ze względu na możliwy proces przerzutowania. Rysunek 59. przedstawia zdjęcia mikroskopowe kolonii komórek H460, inkubowanych ze związkiem C-2028 w jego wolnej i skoniugowanej z QDs postaci przez 72 h.



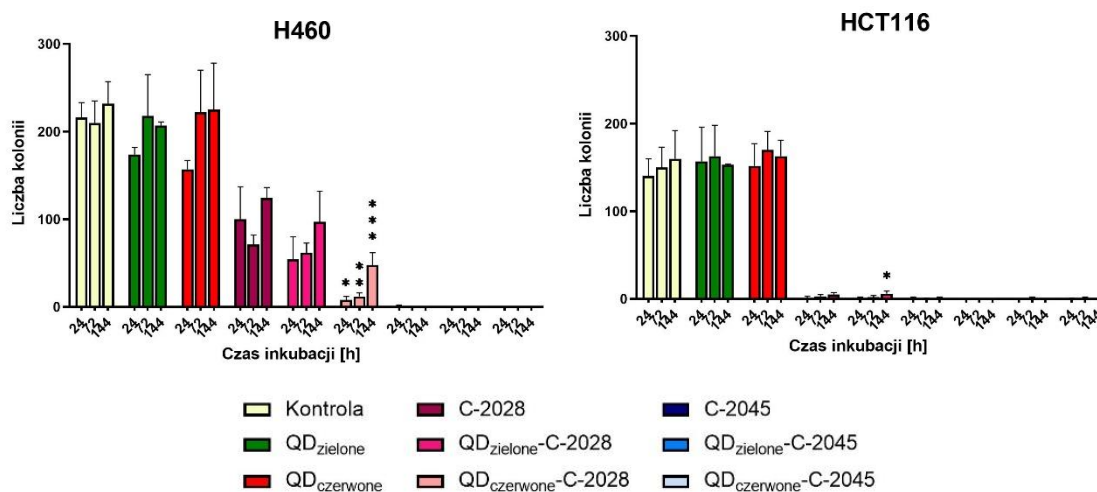
Rysunek 59. Zdolność do tworzenia kolonii przez komórki nowotworowej linii H460 inkubowane z C-2028 oraz jego koniugatami z QDs (QD_{zielone/czerwone}-C-2028) w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ C-2028 w jego wolnej postaci przez 72 h. Małe kolonie tzw. „kolonie satelitarne” powstają na skutek oderwania się komórek od większych kolonii. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń. Skala 100 μ m

HCT116

Rysunek 60. Zdolność do tworzenia kolonii przez komórki nowotworowej linii HCT116 inkubowane z QDs, UAs oraz ich koniugatami z QDs (QDs-UAs) w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} UAs w ich wolnej postaci przez 24, 72 oraz 144 h, a następnie poddane 14-dniowej postinkubacji. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń

Zdolność do trwałego zahamowania wzrostu komórek nowotworu okrężnicy HCT116 zależna jest rodzaju związku (C-2028/C-2045) z jakimi były inkubowane (Tabela S14., Rysunek 60.). W przypadku komórek inkubowanych ze związkiem C-2028 obserwowaliśmy pojedyncze kolonie, których ilość nieznacznie wzrastała wraz z wydłużającym się czasem inkubacji (około 5 kolonii dla 144 h). Związek C-2045 zaś, posiadał zdolność do trwałego zahamowania proliferacji komórek, począwszy od najkrótszego czasu inkubacji (24 h). Nieskoniugowane QDs (zielone i czerwone) nie hamowały proliferacji komórek, a ilość powstających kolonii odpowiadała kontroli (komórkom nietraktowanym związkiem). Skoniugowanie UAs z QDs nie wpłynęło znacząco na ich zdolność do trwałego zahamowania proliferacji komórek (z wyjątkiem QD_{zielonych}-C-2028 inkubowanych przez 144 h).

Podsumowanie



Rysunek 61. Zmiany w zdolności do tworzenia kolonii przez komórki nowotworowych linii H460 oraz HCT116, inkubowanych z QDs, UAs oraz ich koniugatami z QDs (QDs-UAs) w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} UAs w ich wolnej postaci przez 24, 72 oraz 144 h, a następnie poddanych 14-dniowej postinkubacji. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów i nie uwzględniają tzw. „kolonii satelitarnych”. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem związków C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

Zdolność do trwałego zahamowania proliferacji komórek przez UAs zależna jest od linii komórkowej. Badane związki (UAs) wykazują silniejszą tendencję do nieodwracalnego zahamowania proliferacji komórek w przypadku linii HCT116, niż H460 (Rysunek 61.). Nieskoniugowane kropki kwantowe zaś, niezależnie od badanej linii komórkowej, nie hamowały proliferacji komórek, a ilość powstałych kolonii utrzymywała się na tym poziomie, co w przypadku komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem). Skoniugowanie badanych związków z QDs obniżało ilość powstających kolonii w obu liniach komórkowych (bez uwzględniania „kolonii satelitarnych”). W przypadku komórek linii H460 traktowanych koniugatami QDs-C-2028 obserwowałam „kolonie satelitarne”, powstałe na skutek odłączania się pojedynczych komórek od kolonii. Tendencja ta była silniejsza dla koniugatów z QD_{zielonymi}. W przypadku komórek linii HCT116 zaś, nie obserwowałam takiej tendencji. Komórki (linii HCT116), traktowane zarówno UAs w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci, nie posiadały zdolności do powrotu do proliferacji.

3.9. Określenie zdolności niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z kropkami kwantowymi do generowania reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach ludzkich raków płuc i okrężnicy

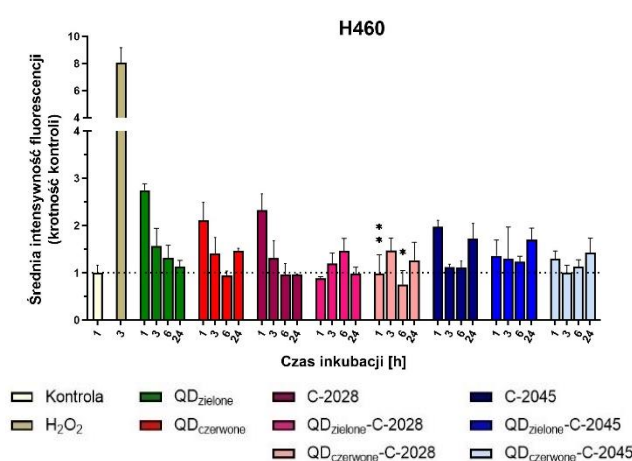
Liczne dane literaturowe wskazują, że większość chemioterapeutyków indukuje powstawanie ROS. Reaktywne formy tlenu, z kolei odgrywają ważną rolę w modulowaniu zarówno przeżycia jak i śmierci komórki (Yang H., 2018). W celu określenia zdolności UAs, QDs oraz koniugatów QDs-UAs do generowania reaktywnych form tlenu w komórkach wykorzystałam ester acetylowy diocjanu 5-(i-6)-chlorometylo-2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (CM-H₂DCFDA).

Niefluoryzujący CM-H₂DCFDA biernie dyfunduje do komórek, gdzie w obecności ROS rozkłada się do pochodnej fluoresceiny o zielonej fluorescencji.

Doświadczenie wykonałam dla komórek poddanych ekspozycji: QD_{zielonych}, QD_{czerwonych}, ze związkami: C-2028 i C-2045, a także koniugatami tych związków z QDs oraz komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem), inkubowanych przez 1, 3, 6 oraz 24 h, w stężeniach odpowiadających wartościom IC₈₀ związków w ich wolnej, nieskoniugowanej postaci. Stężenie i czas inkubacji dla komórek kontrolnych (kontrola pozytywna) traktowanych nadtlenkiem wodoru (H₂O₂) wyznaczyłam eksperymentalnie. Maksymalną intensywność fluorescencji pochodzącą od fluoryzującej pochodnej CM-H₂DCFDA obserwowałam w komórkach kontrolnych (linii H460 oraz HCT116) inkubowanych z 50 µM H₂O₂ przez 3 h. W przypadku komórek HCT116 wzrost ten był niższy – około 2-krotny (względem komórek nietraktowanych związkiem), zaś zwiększenie stężenia lub czasu inkubacji powodowało śmierć tych komórek.

H460

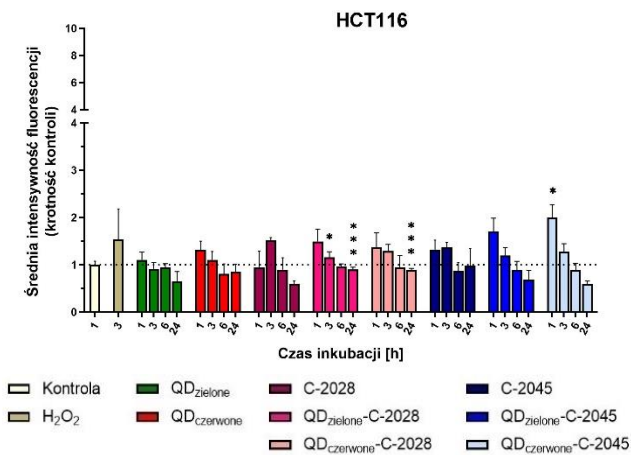
Badane związki (głównie C-2028) generują w niewielkim stopniu ROS – najwyższą intensywność fluorescencji w komórkach linii H460, pochodzącą od fluoryzującej pochodnej CM-H₂DCFDA, obserwowałam po ich 1 h inkubacji z UAs (Rysunek 62.). Ilość generowanych ROS, dla dłuższych czasów inkubacji, utrzymywała się na poziomie odpowiadającym komórkom kontrolnym (nietraktowanym związkiem). Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek z QDs ilość generowanych ROS malała. Skoniugowanie UAs z QDs spowodowało obniżenie ilości powstających ROS, zarówno względem samych UAs jak i QDs (szczególnie w przypadku 1 h inkubacji). W komórkach inkubowanych z QD_{czerwonymi}-C-2028 zaobserwowałam istotny statystycznie spadek ilości generowanego ROS, w porównaniu do C-2028 w wolnej postaci. Wydłużenie czasu inkubacji komórek zarówno z QDs, UAs jak i QDs-UAs (do 72 h) nie wpływało zaś na wzrost ilości generowanych ROS.



Rysunek 62. Średnia intensywność fluorescencji pochodząca od fluoryzującej pochodnej CM-H₂DCFDA, odpowiadająca ilości generowanych ROS, w komórkach nowotworowej linii H460 poddanych ekspozycji: QDs, UAs oraz koniugatów QDs-UAs przez 1, 3, 6 i 24 h w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ (UAs w ich wolnej postaci). Kontrola pozytywna - komórki inkubowane z 50 µM H₂O₂ przez 3 h (wyznaczona eksperymentalnie). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (±) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oznacza statystycznie istotne różnice względem UAs w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

HCT116

Niesymetryczne bisakrydyny (UAs) nie wpływają znacząco na ilość generowanych ROS w komórkach nowotworowej linii HCT116 (Rysunek 63.). Niezależnie od czasu inkubacji komórek z badanymi związkami nie obserwowaliśmy znacznego przyrostu reaktywnych form tlenu, względem komórek kontrolnych (nieotraktowanych związkiem). Co więcej, ich ilość malała wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek (z wyjątkiem C-2028 po 3 h, gdzie obserwowaliśmy nieznaczny wzrost ROS). Poziom ROS dla komórek inkubowanych z nieskoniugowanymi QDs, niezależnie od czasu inkubacji, oscylował na poziomie odpowiadającym komórkom kontrolnym. Skoniugowanie C-2028 z QDs zwiększyło istotnie statystycznie ilość generowanego ROS, szczególnie dla komórek inkubowanych przez 24 h. Wartości te jednak nie przekraczały poziomu ROS odpowiadających komórkom kontrolnym. W przypadku komórek traktowanych koniugatami QDs-C-2045, dla 1 h inkubacji obserwowaliśmy wzrost generowanych ROS, względem C-2045 w jego wolnej postaci. Wraz z jej wydłużeniem, ilość generowanych ROS malała.

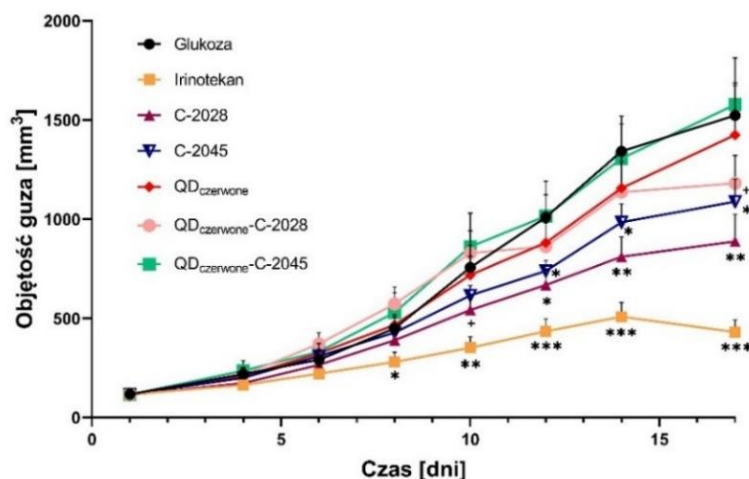


Rysunek 63. Średnia intensywność fluorescencji pochodząca od fluoryzującej pochodnej CM-H₂DCFDA, odpowiadająca ilości generowanych ROS, w komórkach nowotworowej linii HCT116 poddanych ekspozycji: QDs, UAs oraz koniugatów QDs-UAs przez 1, 3, 6 i 24 h w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ (UAs w ich wolnej postaci). Kontrola pozytywna - komórki inkubowane z 50 μM H₂O₂ przez 3 h (wyznaczona eksperymentalnie). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (±) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów **p* < 0,05, ****p* < 0,001 oznacza statystycznie istotne różnice względem UAs w ich wolnej postaci (test t-Studenta)

3.10. Określenie aktywności przeciwnowotworowej UAs, QD_{czerwonych} oraz QD_{czerwonych}-UAs *in vivo*

Ze względu na obiecujące wyniki badań aktywności cytotoksycznej *in vitro* badanych koniugatów wobec komórek nowotworowych i prawidłowych (Rysunek 15.), kolejnym etapem oceny wpływu skoniugowania UAs z QDs (QDs-UAs) było określenie ich aktywności przeciwnowotworowej *in vivo*. Badania te zostały przeprowadzone w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej pod kierunkiem dr Grażyny Peszyńskiej-Sularz zgodnie z protokołem, zatwierdzonym przez Lokalną Komisję Etyczną.

Wcześniejsze badania naszego Zespołu wykazały szybki wzrost guza H460 *in vivo* oraz stosunkowo późne działanie UAs wobec tego nowotworu (Paluszkiewicz E., 2020). Dlatego też, do badań aktywności przeciwnowotworowej badanych koniugatów wybrano komórki linii HCT116.



Rysunek 64. Przebieg wzrostu guzów *in vivo* u nagich myszy Crl:Nu-Foxn1nu z ksenoprzeszczepem guza HCT116 leczonych QD_{czerwonymi}, UAs, QD_{czerwonymi}-UAs oraz irinotekaniem (kontrola pozytywna) w 5% roztworze glukozy. Dane przedstawione jako średnie objętości guza wraz z odchyleniami standardowymi dla każdej grupy zwierząt (wielkość grupy dla zwierząt leczonych wynosiła 11, dla grupy kontrolnej – 16). + $p < 0,1$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice w objętości guza między grupą kontrolną (glukoza) a danym związkiem w danym dniu eksperymentu (test t-Studenta) (Pilch J., 2020)

Rysunek 64. przedstawia przebieg wzrostu guzów *in vivo* u nagich myszy Crl:Nu-Foxn1nu z ksenoprzeszczepem guza HCT116 leczonych UAs, QD_{czerwonymi}, QD_{czerwonymi}-UAs oraz irinotekaniem, jako kontroli pozytywnej. Nieobsadzone kropki kwantowe (QD_{czerwone}) nie wpływały na inhibicję guzów, co jest zgodne z badaniami *in vitro* (Rysunek 8.). Zarówno QD_{czerwone}-C-2028 jak i C-2028, w porównaniu do kontroli (5% roztwór glukozy), hamowały wzrost guza, przy czym tendencja ta była silniejsza dla C-2028. Badany związek jak również jego koniugat, hamowały wzrost guza wolniej niż związek referencyjny – irinotekan, co może wynikać z innej dawki stosowanego leku (2 mg/kg masy ciała dla C-2028 w jego wolnej jak i skoniugowanej z QD_{czerwonymi} postaci, 10 mg/kg masy ciała – dla irinotekanu). W porównaniu do kontroli (5% roztwór glukozy), zarówno QD_{czerwone}-C-2045 jak i sam związek C-2045 nie hamowały wzrostu guza HCT116, szczególnie dla dłuższych czasów inkubacji.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że skoniugowanie UAs z QDs nie poprawiło ich aktywności przeciwnowotworowej. Może być to spowodowane nieodpowiednim dobraniem modelu guza, na co wskazywały wcześniejsze badania (Paluszkiewicz E., 2020), w których komórki linii HCT116 charakteryzowały się szybkim tempem wzrostu (lecz wciąż wolniejszym od komórek linii H460). Uzyskane wyniki badań *in vivo* są jednak kompatybilne z badaniami aktywności cytotoksycznej *in vitro* wobec komórek linii HCT116 (Rysunek 10.) – skoniugowanie UAs z QDs obniżyło ich aktywność cytotoksyczną. Stąd też, wydaje się być prawdopodobnym, że wyniki aktywności cytotoksycznej *in vitro* koniugatów QDs-UAs wobec komórek linii H460, mogą odpowiadać tym *in vivo*. W celu zweryfikowania tej hipotezy, w przyszłości należy więc rozważyć nowe eksperymenty na myszach z ksenoprzeszczepem guza komórek wolniej dzielących się.

4. DYSKUSJA

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej w Zespole Chemii i Biochemii Związków Przeciwnowotworowych od wielu lat prowadzone są badania dotyczące poszukiwania potencjalnych leków przeciwnowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych akrydyny. Najnowszą grupą otrzymanych pochodnych są niesymetryczne bisakrydyny, które wykazują wysoką aktywność cytotoksyczną *in vitro* i przeciwnowotworową *in vivo*, głównie wobec ludzkiego raka trzustki, okrężnicy i płuc (Paluszkiewicz E., 2020). Związki te są chronione patentem w Europie i USA (Konopa J., 2017; Konopa J., 2019).

Liczne dane literaturowe wskazują, że dostarczenie chemioterapeutyków z wykorzystaniem nanocząstek jako platform transportujących pozwala na uzyskanie wysokiego stężenia leku w tkankach nowotworowych zwiększając jego działanie w miejscu docelowym, jednocześnie ograniczając działania niepożądane wobec niezmiętej, prawidłowej tkanki (Vandana M., 2010). Ponadto, wcześniejsze badania członków naszego Zespołu wskazały, że koniugaty doksorubicyny z magnetycznymi nanocząstkami łatwiej penetrują do komórek nowotworowych niż wolna doksorubicyna (Augustin E., 2016). Wyniki te wskazują, że nanocząstki mogą być wykorzystane jako potencjalne platformy transportujące badane chemioterapeutyki do komórek nowotworowych.

W związku z powyższym, **celem moich badań było sprawdzenie czy skoniugowanie niesymetrycznych bisakrydyn (UAs) z nanocząstkami poprawia efekt terapeutyczny badanych związków wobec komórek nowotworu płuc i jelita grubego.** Pierwszym obszarem moich badań było **zbadanie aktywności cytotoksycznej koniugatów wybranych niesymetrycznych bisakrydyn (C-2028 oraz C-2045) z nanocząstkami wobec komórek badanych linii.**

Badania rozpoczęłam od określenia aktywności cytotoksycznej UAs wobec komórek dwóch linii nowotworowych: płuc i okrężnicy (H460 i HCT116) oraz odpowiadającym im prawidłowym liniom (MRC-5 i CCD 841 CoN). Linie nowotworowe zostały wybrane na podstawie szeroko zakrojonego screeningu. Ponadto, nowotwory te wciąż stanowią jedną z najczęstszych przyczyn śmierci w Polsce i na świecie. W kolejnym etapie zbadalam aktywność cytotoksyczną nieobsadzonych kropek kwantowych (QDs: zielonych i czerwonych) oraz ich koniugatów z UAs wobec wszystkich badanych linii komórkowych. Badane związki, C-2028 oraz C-2045, charakteryzują się wysoką cytotoksycznością wobec komórek badanych linii nowotworowych, jednocześnie wywierając ograniczony wpływ na komórki linii prawidłowych. Nieobsadzone związkami czerwone i zielone kropki kwantowe (QD_{zielone} i QD_{czerwone}), niezależnie od badanej linii komórkowej, nie wpływały w sposób znaczący na zahamowanie proliferacji komórek (Rysunek 8.). Mogą one być zatem zastosowane jako potencjalne platformy transportujące badane chemioterapeutyki do komórek nowotworowych.

Skoniugowanie UAs poprzez zaadsorbowanie ich na powierzchni QDs, głównie czerwonych, pozwoliło na znaczne podwyższenie ich aktywności cytotoksycznej wobec komórek

raka płuc (linii H460), w porównaniu do związków w ich wolnej postaci, jednocześnie wykazując działanie ochronne wobec ich prawidłowego odpowiednika – linii MRC-5 (Rysunek 15.). UAs zaadsorbowane zaś na powierzchni kropek kwantowych, stają się mniej aktywne wobec komórek linii HCT116 i potrzebne jest wyższe stężenie, w stosunku do ich wolnej postaci, aby uzyskać daną odpowiedź biologiczną. Może to być związane z np. ograniczonym uwalnianiem UAs z powierzchni koniugatów QDs-UAs, które zależne jest od pH (Wang F., 2011; Pilch J., 2020). Dla komórek CCD 841 CoN, będących prawidłowym odpowiednikiem linii HCT116 zaobserwowałam podobną prawidłowość co dla linii MRC-5. Zaadsorbowanie badanych związków na powierzchni kropek kwantowych pozwoliło na znaczne obniżenie aktywności cytotoksycznej badanych związków. Mimo, iż skoniugowanie UAs na powierzchni QDs obniżyło aktywność związku, względem UAs w ich wolnej postaci (wobec linii HCT116), to efekt ochronny (osłabienie toksyczności związku) wobec jej prawidłowego odpowiednika (linii CCD 841 CoN) wzrósł w znacznym stopniu, głównie w koniugatach QDs-C-2028.

Skoniugowanie UAs z magnetycznymi nanocząstkami ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-RCOOH}$ Np) obniżyło ich aktywność cytotoksyczną wobec nowotworowych linii komórkowych (H460 i HCT116). Co więcej, aktywność cytotoksyczna badanych koniugatów poddanych działaniu pola magnetycznego (magnes neodymowy) dodatkowo słabła, niezależnie od jego czasu działania. Z uwagi na fakt, że skoniugowanie UAs z magnetycznymi nanocząstkami pogarszało ich aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych, nie określałam jej wobec komórek prawidłowych oraz nie wykonywałam również dalszych eksperymentów dla tych koniugatów. Wszystkie dalsze eksperymenty przeprowadziłam dla koniugatów QDs-UAs, ze względu na wzrost potencjału terapeutycznego UAs po ich skoniugowaniu z kropkami kwantowymi (QDs).

Kolejnym obszarem moich badań była weryfikacja hipotezy, że dostarczenie skoniugowanych związków z zastosowaniem nanocząstek jako platform transportujących, może zwiększyć stężenie chemioterapeutyków w komórkach nowotworowych, jednocześnie ograniczając działania niepożądane w komórkach prawidłowych.

Badania dotyczące wnikania badanych bisakrydyn do komórek wskazują, że skoniugowanie UAs z QDs (w szczególności C-2028) znacząco zwiększało ilość związku, dostarczanego do komórek nowotworowej linii H460, w stosunku do komórek traktowanych związkiem w jego wolnej postaci. Co więcej, UAs w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci, wnikały efektywniej do komórek nowotworowej linii H460, w porównaniu do jej prawidłowego odpowiednika – linii MRC-5 (Rysunek 24.). Ilość i intensywność sygnałów, pochodzących od badanych związków (głównie C-2028) skoniugowanych z $\text{QD}_{\text{zielonymi}}$, w komórkach H460 wraz z wydłużającym się czasem inkubacji wzrastała – powodując akumulację związku w komórkach (dla koniugatów UAs z $\text{QD}_{\text{czerwonymi}}$ maksymalną intensywność fluorescencji pochodzącą od koniugatów obserwowałam po 48 h inkubacji, po 72 h – malała). Znaczącą różnicę w intensywności fluorescencji po skoniugowaniu UAs z QDs w komórkach MRC-5 zaobserwowałam jedynie dla $\text{QD}_{\text{zielonych-C-2028}}$ (w porównaniu do C-2028), była ona jednak znacząco niższa niż w komórkach linii H460. Ponadto, najintensywniejsze sygnały

obserwowałam po 24 h - dla dłuższych czasów stopniowo malały. Może to świadczyć o tym, że komórki linii MRC-5 usuwają związek na zewnątrz, bądź też go metabolizują – w przeciwieństwie do nowotworowej linii H460, gdzie następuje jego akumulacja. Dane te korelują z wynikami cytotoksyczności, gdzie skoniugowanie UAs z QDs, w porównaniu do UAs w ich wolnej postaci, pozwoliło z jednej strony na zwiększenie ich cytotoksyczności względem nowotworowej linii H460, a z drugiej na jej obniżenie wobec prawidłowej linii MRC-5, wykazując tym samym efekt ochronny. W przypadku komórek linii HCT116 skoniugowanie UAs z QDs pozwoliło na podniesienie ilości związku dostarczanego do komórek, względem związku w jego wolnej postaci, jedynie dla koniugatu QD_{zielonych}-C-2028 (tylko dla komórek traktowanych przez 24 h, dla pozostałych czasów wartość ta była porównywalna z nieskoniugowanym C-2028). Może to świadczyć o tym, że skoniugowanie kropek kwantowych z UAs (szczególnie C-2028) pozwala początkowo na efektywniejsze dostarczanie związku do komórek, natomiast po dłuższych czasach (>24 h) komórka usuwa go na zewnątrz, bądź też go metabolizuje. W przypadku komórek prawidłowych linii CCD 841 CoN ilość sygnałów pochodzących od związków w wolnej postaci była słaba i utrzymywała się na podobnym poziomie, niezależnie od czasu inkubacji. Nie zaobserwowałam również znaczących zmian w ilości dostarczanego związku do komórek po skoniugowaniu go z QDs.

Ze względu na fakt, że koniugaty QDs-UAs dostarczane są do badanych komórek z różną efektywnością, szczególnie w przypadku komórek linii H460, celem kolejnego eksperymentu było określenie mechanizmu ich wnikania. W tym celu zastosowałam inhibitory różnych rodzajów endocytozy. Uzyskane dane wskazują (Rysunek 25.), że proces wnikania QD_{zielonych}-C-2028 do komórek linii: H460, HCT116 oraz MRC-5 jest silnie zależny od energii oraz nie zależy od polimeryzacji aktyny (z wyjątkiem MRC-5). Badany koniugat wnikał do komórek linii H460 trzema ścieżkami endocytozy: makropinocytozy (MP), endocytozy zależnej od kaweolin (CavME) oraz klatryn (CME). Co więcej, krytycznymi momentami internalizacji QD_{zielonych}-C-2028 do komórek linii H460 na drodze CME, było zarówno tworzenie się pęcherzyka endocytarnego (którego inhibitorem jest Dynasor) jak i kosza klatrynowego (inhibitor – Pitstop 2). Podobny mechanizm internalizacji NPs na drodze endocytozy został zaobserwowany w Zespole N. Nagai (Nagai N., 2018). Naukowcy ci, wykazali, że nanocząstki ketoprofenu (KET-NPs) penetrują przez szczurzą skórę trzema ścieżkami endocytozy: MP, CavME oraz CME. Internalizacja QD_{zielonych}-C-2028 do komórek linii HCT116 była zależna od CME, natomiast do komórek linii MRC-5 od MP, CME oraz CavME (jednak w o wiele niższym stopniu niż w komórkach H460). Pośród wszystkich badanych linii komórkowych Dynasor, który jest inhibitorem CME, zahamowywał internalizację QD_{zielonych}-C-2028 w najniższym stopniu. Wnikanie molekuł do wnętrza komórek na drodze CME jest procesem powszechnie występującym, a zarazem wysoce selektywnym, w którym wymagana jest obecność wyspecjalizowanych receptorów na powierzchni błony komórkowej (Foroozandeh P., 2018). Internalizowane materiały po wniknięciu do komórek na tej drodze, są zazwyczaj dostarczane do lizosomów (oraz ewentualnie w nich degradowane) (Karimi M., 2016). W przypadku komórek linii HCT116 jak i MRC-5, w przeciwieństwie do komórek linii H460, wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek z badanym koniugatem (QD_{zielone}-C-2028), spada

jego ilość. Może to wskazywać, że komórki te „wyrzucają” koniugat na zewnątrz, bądź też go metabolizują. W komórkach tych także, zaobserwowałam spadek cytotoxyczości QDs-UAs, w porównaniu do UAs w ich wolnej postaci. Tak więc zwiększona internalizacja, zachodząca na drodze różnych rodzajów endocytozy, koniugatów QDs-UAs w komórkach H460 może być odpowiedzialna za zwiększenie aktywności cytotoxyczej badanych związków po skoniugowaniu ich z QDs.

W celu sprawdzenia, gdzie w komórce lokalizują się UAs i ich koniugaty z QDs oraz czy indukują zmiany w ilości lizosomów, zarówno w komórkach nowotworowych jak i w prawidłowych, wykonałam przyżyciowe barwienie organelli komórkowych. Wykazałam, że QDs-UAs po ich wnikięciu do komórki, lokalizują się wewnątrz lizosomów (Rysunek 29.). Tendencję tę zaobserwowałam zarówno dla UAs w ich wolnej jak skoniugowanej z QDs postaci dla wszystkich badanych linii komórkowych. Wyniki te potwierdzają, że zarówno UAs jak i QDs-UAs, po ich wnikięciu – głównie na drodze CME, dostarczane są do lizosomów. Podobne obserwacje, dotyczące akumulacji nanocząstek w lizosomach zaobserwowano również dla koniugatów doksorubicyny z chitozanowo-alginianowymi nanocząstkami w komórkach nowotworowej linii A549 (Zhang D. D., 2017). W lizosomach z kolei, panuje odpowiednie pH, do uwalniania UAs z koniugatów QDs-UAs (Rysunek 26.). Największy przyrost ilości i intensywności sygnałów pochodzących od kwaśnych organelli po traktowaniu komórek UAs, względem komórek kontrolnych, zaobserwowałam dla linii H460. Skoniugowanie UAs z QDs wzmocniło ten efekt, w sposób istotny statystycznie, w komórkach nowotworu płuc. W przypadku jego prawidłowego odpowiednika – linii MRC-5, skoniugowanie UAs z QDs nie wpływało znacząco na ilość kwaśnych organelli w komórkach, z wyjątkiem QD_{zielonych}-C-2028, gdzie przeciwnie obserwowałam ich znaczący, istotny statystycznie, spadek. Skoniugowanie UAs z QDs, w porównaniu do UAs w ich wolnej postaci, generalnie nie wpływało istotnie na zmiany w intensywności fluorescencji w komórkach linii HCT116, z wyjątkiem QD_{zielonych}-C-2028 – gdzie zaobserwowałam jej spadek oraz QD_{czerwonych}-C-2045 – niewielki wzrost. Dla prawidłowego odpowiednika nowotworu okrężnicy – linii CCD 841 CoN zaobserwowałam podobną tendencję – skoniugowanie UAs z QDs nie miało znaczącego wpływu na poziom intensywności fluorescencji, z wyjątkiem QD_{czerwonych}-C-2028 i QD_{zielonych}-C-2045, gdzie obserwowałam jej spadek. Zarówno QD_{zielone} jak i QD_{czerwone} nie wpływały znacząco na zmianę fluorescencji, pochodzącej od kwaśnych organelli, w komórkach wszystkich badanych linii.

Zwiększająca się ilość kwaśnych organelli powoduje spadek pH w komórkach, co może być związane z efektywniejszym uwalnianiem się UAs z ich koniugatów z QDs. Dane te są zgodne z badaniami dotyczącymi profilu uwalniania *in vitro* UAs z ich koniugatów z QDs-UAs w systemie bezkomórkowym (Rysunek 26.) (Pilch J., 2020). A mianowicie, badane koniugaty były stabilne w pH 7,4, natomiast w niższym pH (5,5 – endosomy; 4,0 – lizosomy) UAs uwalniały się z QDs-UAs. Lepsze uwalnianie się niesymetrycznych bisakrydyn z ich koniugatów z QDs w kwaśnym pH, może być odpowiedzialne za ich wyższą cytotoxyczość w komórkach nowotworowych niż w prawidłowych. W komórkach prawidłowych bowiem pH jest wyższe niż

w komórkach nowotworowych (Gerweck L. E., 1996; White K. A., 2017), dlatego też, uwalnianie UAs z ich koniugatów z QDs-UAs jest słabsze, co obniża ich efekt cytotoksyczny.

W celu weryfikacji czy wzrost kwaśnych organelli po traktowaniu komórek QDs-UAs, szczególnie w przypadku linii H460, związany był z indukcją autofagii, oznaczyłam poziom białek będących markerami tego procesu – bekliny-1 oraz LC3-II metodą Western blotting. Poziom obu oznaczanych białek w komórkach, traktowanych UAs oraz QDs-UAs, oscylował na poziomie odpowiadającym komórkom kontrolnym (nietraktowanym związkiem), bądź też nieznacznie spadał (Rysunek 34.). Skoniugowanie UAs z QDs w sposób istotny statystycznie zmieniło poziom bekliny-1 jedynie w przypadku QD_{czerwonych}-C-2045 (inkubowanych przez 24-72 h dla komórek linii H460), QD_{zielonych}-C-2045 (24 h dla komórek linii HCT116) oraz QD_{czerwonych}-C-2028 (24 h dla komórek linii MRC-5). Poziom białka LC3-II z kolei, w komórkach wszystkich badanych linii komórkowych nie przekraczał poziomu odpowiadającego komórkom kontrolnym. QDs w ich wolnej postaci nie wpływały na poziom bekliny-1 oraz LC3-II. W związku z powyższym, wzrost ilości kwaśnych organelli w komórkach badanych linii (szczególnie linii H460) traktowanych koniugatami QDs-UAs nie był związany z indukcją autofagii.

Ostatnim obszarem **moich badań było określenie wpływu skoniugowania niesymetrycznych bisakrydyn (C-2028 oraz C-2045) z nanocząstkami na dystrybucję komórek w cyklu życiowym oraz odpowiedź biologiczną indukowaną w komórkach raków płuc i jelita grubego oraz w odpowiadających im komórkach prawidłowych.**

Wiele chemioterapeutyków oddziałuje na komórki indukując zmiany w ich cyklu życiowym (Pfeffer C. M., 2018; Evan G., 2001). UAs oraz ich koniugaty z QDs indukowały wyraźne zmiany w progresji komórek nowotworowych w cyklu życiowym, które to w komórkach prawidłowych przebiegały z mniejszą intensywnością. Nie zaobserwowałam natomiast zmian w cyklu komórkowym, względem komórek kontrolnych, w komórkach wszystkich badanych linii, inkubowanych z nieobsadzonymi związkami QDs. Największe zmiany po skoniugowaniu UAs z QDs, względem UAs w ich wolnej postaci, zaobserwowałam dla dłuższych czasów inkubacji komórek z danym wariantem związku (po 72 i 144 h) (Rysunek 44.). Skoniugowanie niesymetrycznych bisakrydyn z QDs spowodowało istotne zmiany (względem komórek traktowanych C-2028/C-2045) w ilości komórek nowotworowych linii H460 oraz HCT116 w fazie sub-G1. Zmian tych nie zaobserwowałam w przypadku prawidłowych linii komórkowych: MRC-5 oraz CCD 841 CoN. We wszystkich liniach komórkowych obserwowałam natomiast zmiany w procentowej zawartości komórek w fazie G1 – głównie dla koniugatów C-2028 z QDs. Zmiana procentowego udziału komórek, poddanych ekspozycji QDs-UAs, w fazie G2/M natomiast, była istotna statystycznie dla wszystkich badanych linii komórkowych, z wyjątkiem linii HCT116. Skoniugowanie badanych związków pozwoliło na zmianę procentowej zawartości prawidłowych komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego przybliżając je w „stronę” rozkładu poszczególnych faz komórek kontrolnych (nietraktowanych badaniem związkiem). Ze względu na znaczący udział komórek nowotworowych linii H460 oraz HCT116 w fazie sub-G1 (DNA <2n),

charakterystycznej dla komórek apoptotycznych, celem moich kolejnych eksperymentów było zbadanie zdolności badanych związków do indukcji tego procesu.

W pierwszej kolejności zbadalam czy pod wpływem badanych związków następują zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej komórek nowotworowych linii H460 i HCT116, wskazujące na indukcję określonego rodzaju śmierci komórkowej. Analizując zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej można zauważyć, że UAs indukowały wyraźne zmiany w ilości komórek późnoapoptotycznych (A+/PI+), szczególnie w przypadku komórek linii H460 (Rysunek 48.). Nieobsadzone związkami kropki kwantowe (QDs) nie wpływały na wzrost ilości komórek późnoapoptotycznych (A+/PI+), niezależnie od badanej linii komórkowej. Skoniugowanie UAs z QDs spowodowało spadek ilości komórek późnoapoptotycznych w liniach H460 i HCT116. W przypadku linii komórkowej H460, istotny statystycznie spadek ilości komórek późnoapoptotycznych (A+/PI+) obserwovalam już po 24 h inkubacji z QDs-UAs. Dla dłuższych czasów obserwovalam go natomiast, jedynie dla komórek traktowanych z QDs-C-2028, przy czym tendencja ta była wyższa dla koniugatów z QD_{czerwonymi}. Nie obserwovalam natomiast znaczącej różnicy w zmianie ilości komórek A+/PI+ pomiędzy komórkami inkubowanymi przez ≥ 72 h z C-2045 w jego wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci (QDs-C-2045). W przypadku komórek linii HCT116 istotne zmiany w ilości komórek późnoapoptotycznych obserwovalam zarówno dla komórek inkubowanych z QDs-C-2028 (≥ 72 h) jak i QDs-C-2045 (144 h).

Liczne dane literaturowe wskazują, na istotny udział mitochondriów w procesie apoptozy (Sivandzade F., 2019). Jednym z głównych parametrów określających zaburzenie funkcji mitochondriów podczas apoptozy jest spadek potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$) na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. UAs indukowały wyraźne zmiany w ilości komórek z obniżonym mitochondrialnym potencjałem błonowym w obydwu badanych nowotworowych liniach komórkowych (H460 i HCT116) (Rysunek 52.). Nieobsadzone związkami QDs nie wpływały natomiast, na zmianę odsetka komórek z $\Delta\Psi_m$, względem komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem), niezależnie od badanej linii komórkowej. Skoniugowanie C-2028 z QDs wpłynęło, w sposób istotny statystycznie, na spadek odsetka komórek z obniżonym $\Delta\Psi_m$ w komórkach obydwu badanych linii, niezależnie od czasu inkubacji. Tendencja ta była wyższa dla koniugatów badanego związku z QD_{czerwonymi} (z wyjątkiem komórek linii HCT116 inkubowanych przez 72 h). Zmiany w wielkości populacji komórek z $\Delta\Psi_m$, po skoniugowaniu C-2045 z QDs, zależne były od czasu inkubacji. Dla krótszych czasów (do 72 h inkubacji), skoniugowanie badanego związku z QDs albo nie wpływało, albo powodowało niewielkie obniżenie odsetka komórek z obniżonym $\Delta\Psi_m$. Po 144 h natomiast, obserwovalam jego wzrost. Różnice te były jednak o wiele niższe niż dla komórek inkubowanych z koniugatami QDs-C-2028 (względem C-2028 w jego wolnej postaci). Zmiany w wielkości populacji komórek z obniżonym potencjałem błonowym obydwu badanych linii komórkowych, traktowanych UAs po ich skoniugowaniu z QDs, korelują się ze zmianą w ilości komórek późnoapoptotycznych (Rysunek 48.) (z wyjątkiem HCT116 traktowanych QDs-C-2045 przez 144 h). Co ciekawe, mimo znacznego spadku ilości komórek z niskim $\Delta\Psi_m$ oraz komórek późnoapoptotycznych, traktowanych koniugatami QDs-C-2028, obydwu badanych linii, koniugaty te wykazują wyższą aktywność cytotoksyczną niż związek

C-2028 w jego wolnej postaci, ale tylko w przypadku komórek linii H460 (Rysunek 9.). Może to świadczyć o tym, że wzrost aktywności cytotoksycznej badanych koniugatów wobec komórek linii H460, nie jest ściśle związany ze spadkiem ilości komórek z $\Delta\Psi_m$ oraz komórek późnoapoptycznych i może być związany również z innymi mechanizmami śmierci komórkowej.

Ze względu na fakt, że dość znaczna frakcja komórek, traktowanych związkami C-2028 oraz C-2045, zarówno w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci pozostawała żywa, celem kolejnego eksperymentu było sprawdzenie czy ulegają one przyspieszonemu starzeniu komórkowemu. Badane związki (C-2028/C-2045) w ich wolnej jak i skoniugowanej z QDs postaci indukowały proces przyspieszonego starzenia komórkowego nowotworowej linii H460, w przeciwieństwie do linii HCT116. Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek linii H460 z UAs ilość powstającego niebieskiego produktu, powstałego na skutek hydrolizy X-Gal, wzrastała. Skoniugowanie UAs z QDs zaś wzmacniało ten proces, w sposób istotnie statystyczny, w porównaniu do komórek inkubowanych z UAs w ich wolnej postaci (Rysunek 56.). Istnieje niewiele badań dotyczących wpływu skoniugowania NPs z lekami przeciwnowotworowymi na proces przyspieszonego starzenia komórkowego. W przypadku QDs, zgodnie z moją wiedzą, badania opublikowane przez nasz Zespół są jednymi z pierwszych (Pilch J., 2021). Zarówno zielone jak i czerwone kropki kwantowe (QDs), nie indukowały przyspieszonego procesu starzenia w komórkach linii H460 i HCT116. Podobne wyniki badań uzyskano w Zespole A. Lazaro-Carrillo, gdzie wykazano, że magnetyczne NPs (MF66) w wolnej postaci nie indukują przyspieszonego starzenia komórkowego w nowotworowych komórkach MDA-MB-231 (Lazaro-Carrillo A., 2020). Koniugaty tych nanocząstek z doksorubicyną (MF66-DOX) zaś indukowały apoptozę, katastrofę mitotyczną oraz proces przyspieszonego starzenia komórkowego. Wyniki mikroskopowej analizy zdjęć komórek linii H460 poparłam dodatkowo analizą Western blotting poziomu ekspresji białka p21 (Rysunek 57.). Badane związki (UAs) indukują wzrost poziomu białka p21 w komórkach badanej linii, przy czym w znacznie wyższym stopniu w przypadku związku C-2045. Skoniugowanie C-2028 z QDs, w przeciwieństwie do C-2045, zwiększyło poziom białka p21 niezależnie od czasu inkubacji komórek z danym wariantem koniugatu (który był wyższy w przypadku QD_{czerwonych}-C-2028).

Kolejnym krokiem moich badań było sprawdzenie, czy badane związki mają zdolność do trwałego zahamowania proliferacji komórek obu badanych linii. Wykazałam, że UAs nieodwracalnie hamują proliferację komórek w przypadku linii HCT116. Nieskoniugowane kropki kwantowe zaś, niezależnie od badanej linii komórkowej, nie hamowały proliferacji komórek, a ilość powstałych kolonii utrzymywała się na tym samym poziomie, co w przypadku komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem). Skoniugowanie badanych związków z QDs obniżało ilość powstających kolonii w obu liniach komórkowych (bez uwzględniania „kolonii satelitarnych”). W przypadku komórek linii H460 traktowanych koniugatami QDs-C-2028 obserwowałam zaś „kolonie satelitarne”, powstałe na skutek migracji pojedynczych komórek odłączonych od kolonii. Tendencja ta była silniejsza dla koniugatów z QD_{zielonymi}. Obecność „kolonii satelitarnych” może świadczyć o zwiększonej zdolności do migracji komórek, co jest niekorzystne pod kątem możliwego procesu przerzutowania (Page A., 2019).

Dane literaturowe wskazują, że większość chemioterapeutyków indukuje powstawanie ROS. Reaktywne formy tlenu, z kolei odgrywają ważną rolę w modulowaniu zarówno przeżycia jak i śmierci komórki (Yang H., 2018). Stąd też, kolejnym etapem moich badań było sprawdzenie czy badane UAs, QDs oraz QDs-UAs indukują generowanie ROS w komórkach nowotworu płuc i okrężnicy. Zarówno badane związki, QDs jak i QDs-UAs nie indukowały wyraźnego wzrostu generowanych ROS. Najwyższy wzrost intensywności fluorescencji, pochodzącej od barwnika CM-H₂DCFDA, obserwowałam dla obydwu linii komórkowych (H460 oraz HCT116) zazwyczaj dla najkrótszych czasów inkubacji (1-3 h) komórek z danym wariantem związku. Wydłużenie czasu inkubacji nie zmieniało znacząco ilości generowanych ROS, który oscylował na poziomie kontroli ujemnej (komórek nietraktowanych związkiem).

Obiecujące wyniki badań aktywności cytotoksycznej *in vitro* badanych koniugatów wobec komórek nowotworowych i prawidłowych (Rysunek 15.) skłoniły mnie do podjęcia badań dotyczących aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* badanych koniugatów QDs-UAs. Pomimo iż w badaniach *in vitro* skoniugowanie UAs z QDs zwiększyło aktywność cytotoksyczną tych związków w komórkach linii H460, badania *in vivo* przeprowadziłam dla komórek linii HCT116. Wybór tego nowotworu podyktowany był wcześniejszymi wynikami badań naszego Zespołu, które wskazały na zbyt szybki wzrost guza H460 *in vivo* oraz stosunkowo późne działanie UAs wobec tego nowotworu (Paluszkiewicz E., 2020). Uzyskane wyniki badań wskazały, że QD_{czerwone} w ich wolnej postaci nie są toksyczne, a skoniugowanie UAs z QDs nie poprawiło ich aktywności przeciwnowotworowej. UAs w ich wolnej postaci hamowały wzrost guza silniej niż ich koniugaty z QD_{czerwonymi}. Wyniki badań *in vivo* są kompatybilne z badaniami aktywności cytotoksycznej *in vitro* wobec komórek linii HCT116 (Rysunek 10.) – skoniugowanie UAs z QDs obniżyło ich aktywność cytotoksyczną.

Wyniki przedstawionych przeze mnie badań wskazują na wysoki potencjał zastosowania QDs jako platform transportujących leki. Są one nietoksyczne, co potwierdziły badania *in vitro* jak i *in vivo*. Skoniugowanie UAs z QDs pozwala na dostarczenie większej ilości związku do komórek badanych linii oraz może wpływać na rodzaj śmierci komórkowej. Ponadto, chroni komórki prawidłowe przed niepożądanym działaniem UAs. Co ważne, QDs są podatne na modyfikacje fizykochemiczne, dzięki którym można regulować proces ich wnikania do komórek czy transport wewnątrzkomórkowy. Jedną ze strategii zwiększenia selektywności i aktywności cytotoksycznej koniugatów QDs-UAs jest dołączanie ligandów m. in. kwasu foliowego czy transferyny. Badania te realizować będę w ramach grantu Preludium, przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Materiały doświadczalne

5.1.1. Badane związki przeciwnowotworowe

Na podstawie szeroko zakrojonych badań *in vitro* i *in vivo*, przeprowadzonych wcześniej przez członków naszego Zespołu, do dalszych eksperymentów wyselekcjonowano dwie pochodne niesymetrycznych bisakrydyn (UAs): C-2028 i C-2045 (Paluszkiewicz E., 2020). Związki te zostały zsyntezowane w postaci metanosulfonianów przez dr inż. Ewę Paluszkiewicz z Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystywałam roztwory związków: C-2028 oraz C-2045, przygotowane w sterylnej wodzie, o stężeniu wyjściowym 5 mM. Stężenia efektywne badanych związków przygotowywałam bezpośrednio przed ich podaniem. Masa molowa związku C-2028 wynosi 777,869 g·mol⁻¹, C-2045 zaś – 904,001 g·mol⁻¹.

5.1.2. Nanocząstki

Roztwory nanocząstek, w ich nieobsadzonej oraz skoniugowanej postaci, powstały we współpracy z Zespołem prof. Anny Nowickiej z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Stężenia efektywne badanych roztworów przygotowywałam w sterylnej wodzie, bezpośrednio przed ich zastosowaniem.

5.1.2.1. Luminescencyjne kropki kwantowe

Wszystkie wykonane przeze mnie eksperymenty przeprowadziłam dla dwóch rodzajów roztworów luminescencyjnych nanocząstek (Ag-In-Zn-S-MUA) typu kropek kwantowych (QDs): czerwonych (QD_{czerwone}) i zielonych (QD_{zielone}). Stężenie wodnego roztworu wyjściowego nieskoniugowanych z chemioterapeutycznym nanocząstek wynosiło dla obydwu roztworów 1 mg·mL⁻¹. W badaniach wykorzystywałam koniugaty UAs z QDs (wodne roztwory) – powstałe poprzez zaadsorbowanie UAs na powierzchni QDs. Wyjściowe stężenia związków C-2028/C-2045 w koniugatach wynosiły 300 μM, a stężenie QDs – 1 mg·mL⁻¹.

5.1.2.2. Nanocząstki magnetyczne

Eksperymenty przeprowadzałam dla nanocząstek magnetycznych w ich wolnej (Fe₃O₄-RCOOH Np) jak i skoniugowanej z UAs postaci (Fe₂O₃Np-C-2028/C-2045). Koniugaty Fe₂O₃Np-C-2028/C-2045 powstały poprzez zaadsorbowanie UAs na powierzchni nanocząstek (Fe₃O₄-RCOOH Np). Stężenie wyjściowe nieskoniugowanych nanocząstek (Fe₃O₄-RCOOH Np) wynosiło 1 mg·mL⁻¹. Stężenie związków C-2028/C-2045 w koniugatach (roztwory wodne) wynosiło 310 μM, a stężenie nanocząstek – 1 mg·mL⁻¹.

5.1.3. Odczynniki chemiczne

- **Chempur, Polska:** alkohol etylowy ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), alkohol metylowy (CH_3OH),
- **POCH, Polska:** bezwodny wodorofosforan disodu (Na_2HPO_4), dimetylosulfotlenek (DMSO), diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4), lodowaty kwas octowy (CH_3COOH),
- **Sigma-Aldrich, USA:** 5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktopiranozyd (X-Gal), aldehyd glutarowy 25% ($\text{OHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$), amiloryd, azydek sodu (NaN_3), 2-merkaptoetanol, chlorek potasu (KCl), chlorek sodu (NaCl), chlorowoderek tris(hydroksylometylo)aminometanu (Tris-base), chlorowoderek 2-amino-2-(hydroksymetylo)-propano-1,3-diolu (Tris-HCl), cytochalazyna D, dodecylosiarczan sodu (SDS), Dynasor, Filipina III, fluorek fenylometrylosulfonowy (PMSF), fluorek sodu (NaF), formaldehyd 36-38% (CH_2O), heksacyjanożelazian(II) potasu ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$), heksacyjanożelazian(III) potasu ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), irynotekan, monoluarynian polioksyetylenosorbitanu (Tween 20), Pitstop 2, surowicza albumina wołowa (BSA), wersenian disodu ($\text{EDTA}\cdot 2\text{Na}$).

5.1.4. Bufory

- bufor fosforanowy PBS 5 \times stężony: 7 mM KH_2PO_4 (1 g \cdot L $^{-1}$), 40 mM Na_2HPO_4 bezw. (5,73 g \cdot L $^{-1}$), 685 mM NaCl (40 g \cdot L $^{-1}$), 13 mM KCl (1 g \cdot L $^{-1}$) – przygotowywany samodzielnie,
- bufor lizujący RIPA 10x (Abcam, USA),
- izoton (Beckman Coulter™ ISOTON™ II Diluent, USA).

5.1.5. Barwniki

- 7-AAD (7-aminoaktynomycyna; Invitrogen™, USA),
- CM-H₂DCFDA (ester acetylowy dioctanu 5-(i-6)-chlorometylo-2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny; Invitrogen™, USA),
- Giemsa – Sigma (Sigma-Aldrich, USA),
- LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen™, USA),
- MitoTracker Green FM (Invitrogen™, USA),
- MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy; Sigma-Aldrich, USA),
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA).

5.1.6. Enzymy

- Inhibitory proteaz – cComplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Niemcy),
- Inhibitory fosfataz – PhosSTOP™ (Roche, Niemcy).

5.1.7. Zestawy analityczne

- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, (BD Pharmingen, USA) – zestaw do badania zmian w budowie błony plazmatycznej,
- Mitochondrial Membrane Potential Detection JC-1 Kit (BD Pharmingen, USA) – zestaw do badania zmian potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$),
- PI/RNase Staining Kit (BD Pharmingen, USA) – zestaw do analizy zmian w cyklu życiowym.

5.1.8. Roztwory i bufor do elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących

- barwnik do nanoszenia próbek na żel: 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, USA) oraz 2-merkaptoetanol (Sigma, Niemcy), przygotowany według proporcji: 95 μ L Laemmli i 5 μ L 2-merkaptoetanolu,
- bufor blokujący EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad, USA),
- bufor do elektroforezy poliakrylamidowej - bufor Tris-glicyna: 25 mM Tris-Base; 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH = 8,3,
- wzorec wielkości białek PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA). Mieszanina wybarwionych białek o masach: 10, 15, 25, 35, 55, 70, 130 oraz 250 kDa,
- żel poliakrylamidowy do rozdzielania białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) 8–16% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well (Bio-Rad, USA).

5.1.9. Przeciwciała, bufor i inne materiały stosowane do techniki Western blotting

Przeciwciała pierwszorzędowe:

- królicze poliklonalne przeciwciało anti-LC3 (Sigma-Aldrich, USA),
- królicze monoklonalne przeciwciało anti-p21 (Cell Signaling, USA),
- mysie monoklonalne przeciwciało anti- β -aktyna (clone AC-15; Sigma-Aldrich, USA),
- królicze monoklonalne przeciwciało anti-beklina-1 (Cell Signaling, USA).

Przeciwciała drugorzędowe:

- królicze monoklonalne przeciwciało skoniugowane z peroksydazą chrzanową – HRP (ang. Anti-Mouse IgG peroxidase conjugates; Cell Signaling, USA),
- mysie monoklonalne przeciwciało skoniugowane z HRP (Cell Signaling, USA).

Tabela 2. Stosowane rozcieńczenia do przeciwciał

Przeciwciało anty-	Rozcieńczenie	Roztwór (przeciwciało pierwszorzędowe)	Przeciwciało drugorzędowe (rozcieńczenie)
Beklina-1	1:1000	5% BSA w TBST	1:2000
p21	1:2000	5% mleko w TBST	1:1500
LC3	1:500	5% mleko w TBST	1:1500
β -aktyna	1:10000	0,5% mleko w TBST	1:10000

Inne materiały:

- błona nitrocelulozowa, wielkość porów 0,2 μm (Bio-Rad, Niemcy),
- bufor do elektrotransferu białek z żelu poliakrylamidowego na błonę nitrocelulozową: 192 mM glicyna, 25 mM Tris-base, 20% CH_3OH ,
- bufor TBST: 10 mM Tris-Base, 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20, pH = 7,4,
- papier filtracyjny do Western blotting, ekstra gruby (Bio-Rad, USA),
- zestaw do detekcji białek: SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific, USA).

5.1.10. Linie komórkowe

Wszystkie wykonane przeze mnie eksperymenty przeprowadziłam na liniach komórkowych pochodzenia ludzkiego, zakupionych z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ang. The American Type Culture Collection, ATCC):

- nowotworowe linie komórkowe:
 - H460 – linia komórkowa wielkokomórkowego raka płuc wyizolowana przez zespół A. F. Gazdar'a w 1982 r. z płynu opłucnowego (Banks-Schlegel S. P., 1985). Komórki linii H460 dzielą się średnio co 23 h,
 - HCT116 – linia komórkowa wyizolowana z guza raka jelita grubego, wyciętego od dorosłego mężczyzny podczas operacji (Brattain M. G., 1981). Czas podziału komórek wynosi około 16 h.
- prawidłowe linie komórkowe:
 - MRC-5 – linia komórkowa pochodząca z prawidłowej tkanki płucnej 14-tygodniowego męskiego płodu przez J. P. Jacobsa w 1966 r. Komórki zdolne są od 42 do 46 podziałów przed początkiem starzenia się (Jacobs J. P., 1970). Czas podziału komórek wynosi około 34–38 h,
 - CCD 841 CoN – prawidłowa linia komórkowa kolonocytów z 21-tygodniowego płodu (Thompson A. A., 1985). Czas podziału komórek w hodowli *in vitro*: 80–90 h.

5.1.11. Materiały stosowane w hodowli komórkowej

- antybiotyki: streptomycyna ($755 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} = 100 \text{ mg/L}$ pożywki; Sigma-Aldrich, Chiny) oraz penicylina G ($100\,000 \text{ j/L}$ pożywki = $62,3 \text{ mg/L}$ pożywki; Sigma-Aldrich, Izrael),
- bydlęca surowica płodowa (ang. fetal bovine serum, FBS) inaktywowana termicznie w $56 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 30 min (Biowest, USA),
- pożywka EMEM (ang. Minimum Essential Medium Eagle) (Sigma-Aldrich, United Kingdom) – proszek, do samodzielnego przygotowania; niezbędna do hodowli komórek MRC-5 oraz CCD 841 CoN,

- pożywka McCoy's 5A Medium (Sigma-Aldrich, USA) – proszek, do samodzielnego przygotowania; niezbędna do hodowli komórek HCT116,
- pożywka RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, USA) – proszek, do samodzielnego przygotowania; niezbędna do hodowli komórek H460,
- roztwór PBS (przygotowywany samodzielnie),
- roztwór trypsyny – EDTA ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ trypsyny i $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA·4 Na w 0,9% NaCl - $10\times$ stężona; Sigma-Aldrich, USA),
- woda redestylowana (Millipore, USA).

5.1.12. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- aparat do czyszczenia wody Milli-Q® IQ 7005 Water Purification System (Millipore, USA),
- aparat do robienia zdjęć oraz analizowania Western blot Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA),
- aparat do transferu białek Trans Blot SD, SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad, USA),
- cytometr przepływowy Accuri™ C6 (Becton Dickinson, USA),
- czytnik płytek iMark™ (Bio-Rad, USA),
- inkubatory IR Autoflow CO₂ (NuAire, USA),
- licznik komórek Coulter Z1 (Beckman Coulter, USA),
- mikroskop fluorescencyjny OLYMPUS BX60 oraz IX83 (Olympus, Japonia),
- mikroskop konfokalny ZEISS LSM T-PMT (Zeiss, Niemcy),
- wirówka 5810R (Eppendorf, USA),
- wyciągi z przepływem laminarnym (NuAire Biological Safety Cabinets, USA),
- Zestaw do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad, USA).

5.2. Metodyka

5.2.1. Hodowla nowotworowych i prawidłowych komórek

Wszystkie badane przeze mnie linie komórkowe (ludzkiego nowotworu okrężnicy HCT116 i płuc – H460 oraz odpowiadające im prawidłowe linie komórkowe: CCD 841 CoN i MRC-5) rosły w postaci monowarstwy. Hodowlę komórek, znajdującej się w logarytmicznej fazie wzrostu prowadziłam w inkubatorze firmy NuAire, pozwalającym na utrzymanie w mieszaninie gazowej odpowiedniej ilości parametrów takich jak: tlen, 5% CO₂, temperatura 37 °C oraz 95% wilgotność (warunki standardowe).

Hodowlę komórek linii H460 prowadziłam w pożywce RPMI 1640, linii HCT116 – w pożywce McCoy's 5A. Obie pożywki zostały wzbogacone 10% (v/v) płodową

surowicą bydlęcą (FBS ang. fetal bovine serum) z dodatkiem antybiotyków: streptomycyny ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) i penicyliny ($100 \text{ unit}\cdot\text{mL}^{-1}$). Hodowlę komórek linii MRC-5 oraz CCD 841 CoN prowadziłam zaś w pożywce EMEM (ang. Eagle's Minimal Essential Medium) wzbogaconej 10% (v/v) FBS bez dodatku antybiotyków.

5.2.2. Badanie aktywności cytotoksyczności z wykorzystaniem metody MTT

Komórki nowotworowych linii H460 oraz HCT116, znajdujące się w fazie logarytmicznego wzrostu, wysiewałam na płytce 24-dółkowej w ilości po $2\cdot 10^4$ komórek w 1 mL pożywki na studzienkę. Ze względu na dłuższy czas podziału komórek prawidłowych wysiewałam odpowiednio po $4,5\cdot 10^4$ komórek MRC-5 oraz $6\cdot 10^4$ komórek CCD 841 CoN w 1 mL pożywki na dołek. Tak przygotowaną płytkę inkubowałam przez 24 h w temp. 37°C w 5% CO_2 , w celu przyklejenia komórek do podłoża. Kolejny etap różnił się w zależności od tego czy dany związek badałam w jego wolnej czy też skoniugowanej z nanocząstkami postaci.

Po 24 h preinkubacji do każdej studzienki dodałam po 20 μL badanych roztworów nieskoniugowanych związków w 11. różnych stężeniach w dwukrotnym powtórzeniu, zaś do dwóch studzienek kontrolnych - sterylną wodę. Końcowe stężenia związków mieściły się w przedziałach od 10^{-3} do $10^1 \mu\text{M}$. W celu zbadania aktywności cytotoksycznej badanych związków skoniugowanych z nanocząstkami po 24 h preinkubacji wymieniłam pożywkę na świeżą - 1,8 mL. Do każdej ze studzienek dodałam po 200 μL wodnych roztworów badanych koniugatów w 10. różnych stężeniach w dwukrotnych powtórzeniach, zaś do czterech studzienek kontrolnych - po 200 μL sterylnej wody. Stężenia nieskoniugowanych nanocząstek mieściły się w zakresie od $5\cdot 10^6$ do $10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, zaś dla stężenia związków w ich skoniugowanej z nanocząstkami postaci wahały się w zakresie od $1,5\cdot 10^{-5}$ do $3\cdot 10^1 \mu\text{M}$. Następnie komórki poddawałam 72 h inkubacji (warunki standardowe). W przypadku określenia aktywności cytotoksycznej magnetycznych nanocząstek sprawdzałam dodatkowo wpływ obecności magnezu neodymowego (umieszczanego pod płytką na 72 h).

Po 72 h inkubacji z badanymi związkami (warunki standardowe), do każdej studzienki dodałam po 200 μL MTT w stężeniu $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, a następnie płytkę taką inkubowałam około 3 h. W kolejnym etapie odessałam pod próżnią płyn z nad utworzonych kryształów formazanu, dodałam po 1 mL DMSO i mieszałam na kołyszce, celem rozpuszczenia powstałych kryształów. Ostatnim etapem było mierzenie absorbancji przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika płytek. Średnia absorbancja w studzienkach kontrolnych stanowiła 100%. Pozostałe średnie absorbancje w poszczególnych celkach przeliczyłam proporcjonalnie względem kontroli.

5.2.3. Badanie procesu wnikania QDs, UAs oraz QDs-UAs w nowotworowych i prawidłowych liniach komórkowych

Na 60 mm płytkach Petriego, ze sterylnym szkiełkiem nakrywkowym, wysiałam zawiesinę komórek nowotworowych i prawidłowych w różnej ilości (Tabela 3.) w 5 mL pożywki, w zależności

od linii komórkowej oraz czasu inkubacji. Następnie, płytki takie poddałam 24 h preinkubacji (warunki standardowe), celem przyklejenia komórek do podłoża.

Tabela 3. Ilość komórek wysiewanych na płytce Petriego w zależności od linii komórkowej oraz czasu inkubacji komórek z badanym wariantem związku UAs, QDs-UAs, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (UAs w jego wolnej postaci, wyznaczonego względem nowotworowej linii komórkowej)

Linia komórkowa	Związek	Czas inkubacji [h]				
		1	6	24	48	72
		Ilość wysianych komórek				
H460	Kontrola, QDs	10^6	10^6	10^6	$3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$
HCT116	UAs, QDs-UAs	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6
MRC-5	Kontrola, QDs	10^6	-	10^6	$8 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$
CCD 841 CoN	UAs, QDs-UAs	10^6	-	10^6	10^6	10^6

Po 24 h preinkubacji komórek dodawałam do płytek badane roztwory związków, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} , a następnie inkubowałam komórki przez określoną liczbę godzin. Po upływie określonego czasu inkubacji odessałam pożywkę z nad komórek, a następnie przepłukałam je dwukrotnie 5 mL roztworu PBS. Szkiełka nakrywkowe umieszczałam na szkiełkach podstawowych. Tak przygotowane preparaty oglądałam przy użyciu mikroskopu konfokalnego (ZEISS LSM T-PMT; obiektyw 63x). Preparaty oglądałam w świetle przechodzącym oraz trybie fluorescencyjnym z wykorzystaniem filtrów: dla: UAs – Alexa Fluor 532 (wzbudzenie – 528 nm, emisja – 553 nm), QD_{zielonych} – QD545 (wzbudzenie – 300 nm, emisja – 543 nm), QD_{czerwonych} – Alexa Fluor 660 (wzbudzenie – 663 nm, emisja – 691 nm). Fotografie preparatów wykonywałam przy użyciu kamery, z wykorzystaniem oprogramowania ZEN 2.6. Doświadczenie przeprowadziłam w trzech niezależnych powtórzeniach dla wszystkich badanych linii komórkowych. Każdorazowo wykonywałam minimum 3-4 zdjęcia, a intensywność fluorescencji UAs, QDs i QDs-UAs wyznaczałam na ich podstawie z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ.

5.2.4. Określenie mechanizmu wnikania QDs-UAs do komórek nowotworowych i prawidłowych

Zawiesinę komórek nowotworowych (H460 i HCT116), znajdujących się w logarytmicznej fazie wzrostu, wysiewałam na 60 mm płytkach Petriego ze szkiełkiem nakrywkowym w ilości 10^6 komórek w 3 mL pożywki. Po 24 h komórki preinkubowałam z: pożywką bez inhibitora (kontrola), w 4 °C, 5 μ M Cytochalazyny D, 30 μ M Amilorydu, 80 μ M Dynasoru, 25 μ M Pitstop 2, 1,5 μ M Filipiny III przez 30 minut, a następnie dodawałam QD_{zielone}-C-2028, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} i inkubowałam przez kolejne 4 h. Preparaty oglądałam z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (ZEISS LSM T-PMT; obiektyw 63x) w trybie fluorescencyjnym (wzbudzenie i emisja poszczególnych filtrów taka jak w punkcie 5.2.3.) Doświadczenie przeprowadziłam w trzech niezależnych powtórzeniach dla nowotworowych (H460 oraz HCT116) oraz prawidłowych (MRC-5) linii komórkowych. Każdorazowo wykonywałam minimum 3-4 zdjęcia, a intensywność fluorescencji pochodzącej od badanych koniugatów wyznaczałam przy użyciu oprogramowania ImageJ.

5.2.5. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja QDs-UAs

Zawiesinę komórek nowotworowych oraz prawidłowych, w logarytmicznej fazie wzrostu, wysiewałam na 60 mm płytki Petriego ze sterylnym szkiełkiem nakrywkowym w ilości:

- dla komórek nowotworowych (H460/HCT116): kontrola, QDs (10^5 komórek); UAs, QDs-UAs (10^6 komórek),
- dla komórek prawidłowych (MRC-5/CCD 841 CoN): kontrola, QDs ($4 \cdot 10^5$ komórek); UAs, QDs-UAs (10^6 komórek)

w 5 mL pożywki. Po 24 h preinkubacji komórek dodałam roztwory QDs, UAs oraz QDs-UAs, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} , a następnie komórki poddałam 72 h inkubacji. Po upływie tego czasu, celem wybarwienia organelli komórkowych, dodałam barwniki: LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen™, USA; wzbudzenie 578 nm, emisja – 589 nm) oraz MitoTracker Green FM (Invitrogen™, USA; wzbudzenie 490 nm, emisja – 512 nm). Komórki z tymi barwnikami inkubowałam przez 15 min w stężeniu końcowym po 200 nM w inkubatorze (warunki standardowe). Po upływie tego czasu przenosiłam szkiełko nakrywkowe na szkiełko podstawowe i oglądałam przy użyciu mikroskopu konfokalnego (ZEISS LSM T-PMT; obiektyw 63x). Preparaty oglądałam w świetle przechodzącym oraz trybie fluorescencyjnym. Doświadczenie przeprowadziłam w trzech niezależnych powtórzeniach dla wszystkich badanych linii komórkowych. Każdorazowo wykonywałam minimum 3-4 zdjęcia, a intensywność fluorescencji pochodzącej od kwaśnych organelli (LysoTracker® Red DND-99) wyznaczałam na ich podstawie z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ.

5.2.6. Analiza dystrybucji komórek nowotworowych oraz prawidłowych w cyklu życiowym

Badanie dystrybucji komórek w cyklu życiowym przeprowadziłam wobec wszystkich badanych linii komórkowych tj.: H460, HCT116, MRC-5 oraz CCD 841 CoN, w oparciu o analizę zawartości DNA w komórkach wybarwionych jodkiem propidyny. Na 100 mm płytkach Petriego wysiewałam zawiesinę komórek w różnej ilości (Tabela 4.) w 10 mL pożywki, w zależności od linii komórkowej oraz czasu inkubacji. Następnie, płytki takie poddałam 24 h preinkubacji (warunki standardowe), celem przyklejenia komórek do podłoża.

Tabela 4. Ilość komórek wysiewanych na cykl komórkowy w zależności od linii komórkowej oraz czasu inkubacji komórek z badanym wariantem związku UAs, QDs-UAs, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (UAs w jego wolnej postaci, wyznaczonego względem nowotworowej linii komórkowej)

Linia komórkowa	Związek	Czas inkubacji [h]			
		24	48	72	144
Ilość wysianych komórek					
H460	Kontrola, QDs	10^6	$5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$
HCT116	UAs, QDs-UAs	10^6	10^6	10^6	10^6
MRC-5	Kontrola, QDs	-	-	$1,2 \cdot 10^6$	-
CCD 841 CoN	UAs, QDs-UAs	-	-	$1,5 \cdot 10^6$	-

Komórki inkubowałam z QDs (czerwonymi i zielonymi), związkami C-2028 i C-2045 oraz koniugatami tych związków, zaadsorbowanymi na powierzchni QDs w stężeniach odpowiadających wartościom IC_{80} związków C-2028 i C-2045 w ich wolnej postaci,

wyznaczonych wobec danej linii nowotworowej. Stężenia kropek kwantowych (QDs) w jakich były inkubowane badane komórki, odpowiadają zaś wartościom IC_{80} związków C-2028 oraz C-2045 w ich wolnej postaci, które odpowiadają ich stężeniom w koniugatach. Do komórek kontrolnych dodałam sterylną wodę. Komórki inkubowałam przez: 24, 48, 72 i 144 h - dla komórek linii nowotworowych oraz 72 h - dla komórek linii prawidłowych (warunki standardowe).

Po zakończonej inkubacji komórek kontrolnych oraz traktowanych badanym wariantem związku, zlałam pożywkę z nad komórek do probówek typu falcon, komórki przepłukałam 2 mL zimnego roztworu PBS, po czym dodałam 2 mL niesterylnej trypsyny, w celu odklejenia komórek od podłoża. Następnie, za pomocą licznika Coulter Counter, obliczyłam ilość komórek w hodowli. Do badań każdorazowo pobierałam po $2 \cdot 10^6$ komórek. Po wirowaniu (1000 rpm, 5 min, 4 °C) zlałam supernatant, a pelet przepłukałam 5 mL zimnego roztworu PBS i znowu wirowałam w tych samych warunkach. Czynność tę powtórzyłam dwukrotnie. Po ostatnim wirowaniu odessałam supernatant z nad komórek przy użyciu pompki wodnej. Następnie rozpipetowałam pelet i dodałam 3 mL zimnego 80% etanolu, w celu utrwalenia komórek. Tak przygotowane próbki przechowywałam w -20 °C do czasu dalszych analiz przez minimum 12 h.

Po utrwaleniu zawiesinę komórek wirowałam (2000 rpm, 5 min, 4 °C), po czym dwukrotnie płukałam 5 mL zimnego roztworu PBS (1500 rpm, 5 min, 4 °C). Następnie komórki takie wybarwiłam 500 μ L roztworu z zestawu PI/RNase Staining Kit (BD Pharmingen) i inkubowałam przez 15 minut w ciemności. Obecność RNazy A w roztworze barwiącym nie pozwala na łączenie się PI (jodku propidyny) z RNA, co mogłoby zafałszować badania. Jodek propidyny w takich warunkach łączy się więc tylko z DNA. Pomiar intensywności fluorescencji emitowanej przez związany z DNA jodek propidyny prowadziłam z wykorzystaniem cytometru przepływowego z oprogramowaniem BD Accuri™ C6 Software Version 1.0.264.21. Długość fali wzbudzenia dla jodku propidyny wynosi 488 nm, emisji – 617 nm. Każdorazowo analizie poddawałam 10000 komórek.

5.2.7. *Badanie zmian w budowie błony cytoplazmatycznej komórek ludzkich raków płuc i okrężnicy poddanych działaniu: UAs, QDs oraz QDs-UAs*

Badanie zmian w budowie błony cytoplazmatycznej pod wpływem UAs, QDs i QDs-UAs przeprowadziłam dla linii nowotworowych (H460 oraz HCT116) z wykorzystaniem komercyjnego zestawu: FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, USA). Na 60 mm płytkach Petriego wysiewałam zawiesinę komórek, w logarytmicznej fazie wzrostu, w różnej ilości, zależnej od docelowego czasu inkubacji:

- 24 h – kontrola, QDs, UAs, QDs-UAs ($5 \cdot 10^5$ komórek),
- 72 h – kontrola, QDs (10^5 komórek), UAs, QDs-UAs ($5 \cdot 10^5$ komórek),
- 144 h – kontrola, QDs (10^4 komórek), UAs, QDs-UAs ($6 \cdot 10^5$ komórek)

w 5 mL pożywki. Po 24 h preinkubacji komórek do płytek dodawałam badane roztwory związków, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} , a następnie inkubowałam je przez 24, 72 i 144 h. Po upływie określonego czasu inkubacji zlewałam pożywkę z nad komórek, po czym przepłukiwałam je 0,5 mL PBS i odklejałam za pomocą 0,5 mL trypsyny. Do dalszych etapów każdorazowo

pobierałam po 10^6 komórek. Następnie wirowałam dwukrotnie komórki (1000 rpm, 5 min, 4 °C) i płukałam je 5 mL PBS. Po ostatnim wirowaniu, odsysałam supernatant znad komórek przy użyciu pompki wodnej. Komórki zawieszałam w mieszaninie barwiącej (według zaleceń producenta: w 100 μ L 1x buforu wiążącego (Binding Buffer), 5 μ L FITC Annexin V oraz 5 μ L PI i inkubowałam w ciemności przez 15 minut. Po skończonym czasie inkubacji do próbek dodawałam po 400 μ L 1x buforu wiążącego, a następnie poddawałam je analizie cytometrycznej. Pomiar intensywności fluorescencji emitowanej przez FITC Annexin V (długość fali wzbudzenia: 494 nm, emisji – 520 nm) oraz PI (długość fali wzbudzenia: 488 nm, emisji – 617 nm) prowadziłam z wykorzystaniem cytometru przepływowego z oprogramowaniem BD Accuri™ C6 Software Version 1.0.264.21. Każdorazowo analizie poddawałam 10000 komórek.

5.2.8. Oznaczanie zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ w komórkach ludzkich raków płuc i okrężnicy poddanych działaniu: UAs, QDs oraz QDs-UAs

Oznaczanie zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ w nowotworowych komórkach linii H460 oraz HCT116 pod wpływem UAs, QDs i QDs-UAs przeprowadziłam z wykorzystaniem komercyjnego zestawu: Mitochondrial Membrane Potential Detection JC-1 Kit (BD Pharmingen, USA). Ilość komórek, czas inkubacji oraz stosowane stężenia były takie same jak opisane w punkcie 5.2.7. Po skończonym okresie inkubacji przepłukiwałam komórki 0,5 mL PBS, a następnie odklejałam je przy pomocy 0,5 mL trypsyny. Do dalszych etapów każdorazowo pobierałam po 10^6 komórek. Następnie wirowałam komórki (400 g, 5 min, 23 °C), odessałam supernatant, a pelet zawieszałam w 0,5 mL roztworu working solution (według zaleceń producenta: 5 μ L barwnika JC-1 i 0,495 mL 1x buforu) i inkubowałam przez 15 min. w 37 °C w inkubatorze. Następnie ponownie zwirowałam komórki w tych samych warunkach i dwukrotnie płukałam je w 1x buforze (pierwsze płukanie: 2 mL 1x buforu, drugie płukanie w 1 mL). Po ostatnim płukaniu odessałam supernatant, a pelet zawieszałam w 0,450 mL 1x buforu i poddawałam analizie cytometrycznej. Pomiar intensywności fluorescencji emitowanej przez JC-1 (długość fali wzbudzenia: 488 nm, emisji: dla monomerów, obecnych w komórkach apoptotycznych – 527 nm; dla agregatów, obecnych w zdrowych komórkach – 590 nm) prowadziłam z wykorzystaniem cytometru przepływowego z oprogramowaniem BD Accuri™ C6 Software Version 1.0.264.21. Każdorazowo analizie poddawałam 10000 komórek.

5.2.9. Badanie procesu starzenia komórkowego w nowotworowych liniach komórkowych

Badanie indukcji przyspieszonego procesu starzenia komórkowego pod wpływem UAs, ich koniugatów z QDs, a także nieobsadzonych QDs przeprowadziłam dla nowotworowych linii komórkowych (H460, HCT116) z zastosowaniem X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktopiranozyd), będącego substratem enzymu SA- β -galaktozydazy. Na 60 mm płytках Petriego, ze sterylnym szkiełkiem nakrywkowym, wysiewałam różną ilość komórek, zależną od docelowego czasu inkubacji:

- 72 h – kontrola, QDs ($5 \cdot 10^4$ komórek), UAs, QDs-UAs ($5 \cdot 10^5$ komórek),

- 120 h – kontrola, QDs ($3 \cdot 10^4$ komórek), UAs, QDs-UAs ($6 \cdot 10^5$ komórek),
- 144 h – kontrola, QDs ($2 \cdot 10^4$ komórek), UAs, QDs-UAs ($8 \cdot 10^5$ komórek)

w 5 mL pożywki. Po 24 h preinkubacji komórek dodawałam do płytek badane roztwory związków, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} , a następnie inkubowałam komórki przez określoną liczbę godzin. Po upływie określonego czasu inkubacji odsysałam pożywkę z nad komórek, po czym przepłukiwałam je trzykrotnie ciepłym PBS o pH 7,2. Następnie komórki zalewałam 5 mL mieszaniny roztworu utrwalającego (Fixative Solution: 0,5 mL 2% glutaraldehydu, 0,5 mL 20% formaldehydu oraz 4 mL PBS pH 7,2), po czym inkubowałam je przez 5 min w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu odessałam roztwór utrwalający z nad komórek, przepłukałam je dwukrotnie 5 mL ciepłego PBS pH 6,0 i przenieśliam pokryte komórkami szkiełko nakrywkowe na 35 mm płytkę Petriego. Komórki zalałam 2 mL roztworu barwiącego (Staining Solution: 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 40 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl) zawierającego X-Gal o stężeniu końcowym $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (0,2 mL roztworu X-Gal ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) oraz 1,8 mL Staining Solution). Po 12-16 h inkubacji komórek w temperaturze 37°C , w inkubatorze bez dostępu CO_2 , przepłukałam je dwukrotnie 2 mL ciepłego roztworu PBS pH 7,2 i oglądałam przy pomocy mikroskopu (OLYMPUS BX60) przy powiększeniu 200x w świetle przechodzącym. Fotografie preparatów wykonałam dzięki kamerze, stosując oprogramowanie Studio Lite. Doświadczenie przeprowadziłam w trzech niezależnych powtórzeniach. Każdorazowo wykonywałam minimum 3-4 zdjęcia, z których zliczałam wszystkie komórki.

5.2.10. Analiza poziomu białek metodą Western blotting

5.2.10.1. Przygotowanie lizatów komórkowych

Zawiesinę nowotworowych i prawidłowych komórek, znajdujących się w logarytmicznej fazie wzrostu, wysiewałam w 100 mm płytkach Petriego. Ilość komórek, czas inkubacji oraz stosowane stężenia były analogiczne jak w punkcie 5.2.6. (bez punktu czasowego 48 h). Po zakończonej inkubacji zbierałam pożywkę do probówek typu falcon, a komórki zdrapywałam przy pomocy zdrapywacza. Następnie, wirowałam komórki (1000 rpm, 5 min, 4°C) i płukałam je dwukrotnie 5 mL zimnego PBS. Otrzymany osad komórek zawieszałam w 50 μL buforu lizującego, w skład którego wchodził bufor RIPA 1x (Abcam, USA) oraz inhibitory fosfataz i proteaz (Roche, Niemcy). Zawiesinę komórek przenosiłam do eppendorfów umieszczonych na lodzie i inkubowałam je przez 25 minut, mieszając próbki na wortexie co 5 minut. Po zakończonej inkubacji wirowałam lizaty (14 000 rpm, 15 min, 4°C), a otrzymany supernatant przechowywałam do czasu kolejnych badań w temperaturze -80°C . Przed analizą Western blotting oznaczałam stężenie białka w poszczególnych próbkach metodą Bradford, stosując w tym celu Bio-Rad Protein Assay dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA).

5.2.10.2. Elektroforeza SDS-PAGE

Próbki zawierające odpowiednią ilość białka całkowitego (20 µg) mieszałam z równą objętością barwnika do nanoszenia próbek na żel (Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, USA) oraz 2-merkaptoetanolu (Sigma, Niemcy), przygotowanego według proporcji: 19:1). Tak przygotowane próbki denaturowałam w temperaturze 100 °C przez 5 minut, a po ich ostygnięciu - wirowałam (1000 rpm, 1 min, 4 °C). Do czasu dalszych analiz (naniesienia na żel poliakrylamidowy 8–16% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well; Bio-Rad, USA) próbki przechowywałam w temperaturze -80 °C. Elektroforezę prowadziłam przez 15 minut w 90 V, a następnie przez 50 minut w 120 V w buforze do elektroforezy poliakrylamidowej.

5.2.10.3. Immunoblotting (immunobarwienie)

Transfer białek z żelu poliakrylamidowego na błonę nitrocelulozową, przeprowadzałam wykorzystując metodę tzw. elektrotransferu półsuchego. Transfer białek, po uprzednim namoczeniu żelu, błony oraz papieru filtracyjnego w buforze do elektrotransferu białek, prowadziłam przez 40 min przy napięciu wynoszącym 10 V. Następnie blokowałam miejsca, do których mogłyby wiązać się niespecyficznymi przeciwciałami, poprzez umieszczenie błony w buforze blokującym (EveryBlot Blocking Buffer; Bio-Rad, USA) na kołysce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej przez 5 minut. W kolejnym etapie błonę taką płukałam 6-krotnie przez 5 min w buforze TBST, po czym inkubowałam ją z przeciwciałem pierwszorzędowym zawieszonym w buforze TBST z mlekiem w proszku bądź BSA (Tabela 2.) przez noc na kołysce laboratoryjnej w temperaturze 4 °C. Po zakończonej inkubacji błonę nitrocelulozową ponownie płukałam 6-krotnie przez 5 min w buforze TBST, a następnie inkubowałam z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z peroksydazą chrzanową w buforze TBST z dodatkiem 0,5% mleka w proszku w temperaturze pokojowej przez 1,5 h na kołysce. Detekcję białek na błonie przeprowadziłam wykorzystując substrat chemiluminescencyjny dla peroksydazy chrzanowej (zestaw: SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate; ThermoFisher Scientific, USA) z wykorzystaniem Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA). W celu sprawdzenia równomiernego napełnienia studzienek określałam poziom β-aktyny. Relatywny poziom poszczególnych białek określałam z wykorzystaniem oprogramowania Image Lab 6.0.1. (Bio-Rad, USA).

5.2.11. Badanie zdolności niesymetrycznych bisakrydyn skoniugowanych z kropkami kwantowymi do nieodwracalnego zahamowania proliferacji w nowotworowych liniach komórkowych

Zawiesinę komórek nowotworowych linii H460 oraz HCT116 wysiewałam w 6-dołkowej płytce w ilości $1,5 \cdot 10^5$ komórek w 3 mL pożywki (dla komórek kontrolnych oraz poddanych inkubacji z QDs ich ilość zależała od czasu inkubacji: 24 h – $1,5 \cdot 10^5$, 72 h – $5 \cdot 10^4$ oraz 144 h – 10^4). Po 24 h preinkubacji do komórek dodawałam związki w stężeniu końcowym

odpowiadającym wartości IC_{80} i inkubowałam je przez 24, 72 i 144 h. Po zakończonym okresie inkubacji, odklejałam komórki za pomocą trypsyny i wysiewałam po 250 komórek na nowej płytce 6-dółkowej, a następnie poddawałam je 14-dniowej postinkubacji. Następnie odessałam pożywkę z nad komórek, po czym przepłukiwałam komórki 1 mL ciepłego 0,9% roztworu chlorku sodu (NaCl) przez 5 minut, suszyłam oraz utrwalalam komórki w 96% roztworze etanolu przez 10 minut. Po wysuszeniu, komórki barwiłam roztworem Giemsa (rozcieńczonym w wodzie w stosunku 1:20) przez 10 minut, a następnie płukałam je kilkakrotnie wodą redestylowaną. Wysuszone płytki z wybarwionymi koloniami skanowałam, a następnie obliczałam ilość kolonii. Przedstawione dane liczbowe dotyczą „dużych kolonii”, bez tzw. „kolonii satelitarnych”.

5.2.12. Określenie zdolności UAs, QDs oraz koniugatów QDs-UAs do generowania reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach ludzkich raków okrężnicy i płuc

Tworzenie się reaktywnych form tlenu pod wpływem UAs, ich koniugatów z QDs, a także nieobsadzonych QDs przeprowadziłam dla nowotworowych linii komórkowych (H460, HCT116) z zastosowaniem barwnika CM-H₂DCFDA. Zawiesinę komórek, w logarytmicznej fazie wzrostu (w ilości $3 \cdot 10^5$) wysiewałam na 35 mm płytkach Petriego w 2 mL pożywki. Po 24 h preinkubacji komórek dodawałam do płytek badane roztwory związków, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} , a następnie inkubowałam je przez: 1, 3, 6 i 24 h. Po upływie określonego czasu inkubacji wymieniałam pożywkę na świeżą (bez FBS) i dodawałam barwnik CM-H₂DCFDA w stężeniu końcowym wynoszącym 2 μ M, a następnie inkubowałam komórki przez 30 minut w ciemności w inkubatorze. Po upływie tego czasu odsysałam pożywkę z nad komórek i odklejałam je 600 μ L niesterylnej trypsyny. Po odklejeniu komórek zawieszałam je w 400 μ L świeżej pożywki (bez FBS), przenosiłam do probówek cytometrycznych i dodawałam barwnik 7-AAD (w stężeniu końcowym wynoszącym 0,8 μ g·mL⁻¹), w celu znakowania późnych komórek apoptotycznych. Probówki cytometryczne do czasu analizy były umieszczone w lodzie. Eksperymentalnie wyznaczyłam stężenie i czas inkubacji dla komórek kontrolnych (kontrola pozytywna) traktowanych H₂O₂. Dla linii komórkowej H460 oraz HCT116, maksymalną intensywność fluorescencji pochodzącą od CM-H₂DCFDA, obserwowałam dla komórek inkubowanych z 50 μ M H₂O₂ przez 3 h. Pomiar intensywności fluorescencji emitowanej przez barwniki prowadziłam z wykorzystaniem cytometru przepływowego z oprogramowaniem BD Accuri™ C6 Software Version 1.0.264.21. Długość fali wzbudzenia dla CM-H₂DCFDA wynosi 492–495 nm, emisji – 517–527 nm, natomiast dla 7-AAD odpowiednio: 546 i 647 nm. Każdorazowo analizie poddawałam 8000 komórek.

5.2.13. Określenie aktywności przeciwnowotworowej UAs, QD_{czerwonych} oraz QD_{czerwonych}-UAs *in vivo*

Badania na zwierzętach zostały przeprowadzone w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej pod kierunkiem dr Grażyny Peszyńskiej-Sularz zgodnie z protokołem, zatwierdzonym przez Lokalną Komisję Etyczną. Aktywność *in vivo* C-2028,

C-2045, QD_{czerwonych}, QD_{czerwonych-C-2028} oraz QD_{czerwonych-C-2045} oceniano w ksenoprzeszczepach guza HCT116 u nagich myszy Crl:Nu-Foxn1nu. 10⁵ komórek linii HCT116 wstrzyknięto podskórną pod prawą przednią pachę 5-tygodniowych nagich myszy. Kiedy objętość guza osiągała wartość około 100 mm³ myszy zostały losowo podzielone na 7 grup: po 11 na grupę oraz dodatkowo 5 myszy dla grupy kontrolnej. Badane związki w 5% roztworze glukozy były wstrzykiwane przez żyłę ogonową dwa razy w tygodniu w następujących dawkach: UAs (C-2028 oraz C-2045) – 2 mg/kg masy ciała, QD_{czerwone} – 8 mg/kg masy ciała, QD_{czerwone}-UAs (QD_{czerwone}-C-2028 oraz QD_{czerwone}-C-2045) – 2 mg/kg masy ciała, irynotekan (kontrola pozytywna) – 10 mg/kg masy ciała oraz 5% roztwór glukozy (kontrola). Objętość guza i masa ciała myszy były rejestrowane trzy razy w tygodniu przez okres trwania całego eksperymentu. Objętość guza obliczono według wzoru: $V [mm^3] = 0,5 \cdot \text{długość} \cdot \text{szerokość} \cdot \text{szerokość}$.

5.2.14. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie eksperymenty, zaprezentowane w niniejszej pracy, których wyniki przedstawiłam jako średnią wraz z odchyleniem standardowym (SD) zostały wykonane minimum trzykrotnie. Dla oceny różnic pomiędzy dwoma niezależnymi parametrami zastosowałam test t-Studenta, w którym przyjąłam istotną różnicę statystyczną przy wartościach: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

WYKAZ LITERATURY

Adrie C., Bachelet M., Vayssier-Taussat M., Russo-Marie F., Bouchaert I., Adib-Conquy M., Cavaillon J.-M., Pinsky M. R., Dhainaut J.-F., Polla B. S. Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis Peripheral Blood Monocytes in Severe Human Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000, 164, 3.

Albanese A., Chan W. C. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano*. 2011, 5, 7, 5478-5489.

Albanese A., Tang P. S., Chan W. C. W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2012, 14, 1-16.

Ashok B. T., Tadi K., Banerjee D., Konopa J., Iatropoulos M., Tiwari R. K. Pre-clinical toxicology and pathology of 9-(2'-hydroxyethylamino)-4-methyl-1-nitroacridine (C-1748), a novel anti-cancer agent in male Beagle dogs. *Life Sciences*. 2006, 78, 14, 1334-1342.

Assa F., Jafarizadeh-Malmiri H., Ajamein H., Vaghari H., Anarjan N., Ahmadi O., Berenjian A. Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016, 37, 4, 492-509.

Augustin E., Czubek B., Nowicka A. M., Kowalczyk A., Stojek Z., Mazerska Z. Improved cytotoxicity and preserved level of cell death induced in colon cancer cells by doxorubicin after its conjugation with ironoxide magnetic nanoparticles. *Toxicology in vitro*. 2016, 33, 45-53.

Banks-Schlegel S. P., Gazdar A. F., Harris C. C. Intermediate Filament and Cross-Linked Envelope Expression in Human Lung Tumor Cell Lines. *Cancer Research*. 1985, 45, 1187-1197.

Barrera G., Serpe L., Celegato F., Coïsson M., Martina K., Canaparo R., Tiberto P. Surface modification and cellular uptake evaluation of Au-coated Ni₈₀Fe₂₀ nanodiscs for biomedical applications. *Interface Focus*. 2016, 6: 20160052.

Behzadi S., Serpooshan V., Tao W., Hamaly M. A., Alkawareek M. Y., Dreaden E. C., Brown D., Alkilany A. M., Farokhzad O. C., Mahmoudi M. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*. 2017, 46, 14, 4218-4244.

Benmerah A., Lamaze C. Clathrin-coated Pits: Vive La Différence? *Traffic*. 2007, 8, 970-982.

Brattain M. G., Fine W. D., Khaled F. M., Thompson J., Brattain D. E. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Research*. 1981, 41, 201-209.

Buzea C., Pacheco I. I., Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007, 2, 4.

Bwatanglang I. B., Mohammad F., Yusof N. A., Abdullah J., Alitheen N. B., Hussein M. Z., Abu N., Mohammed N. E., Nordin N., Zamberi N. R., Yeap S. K. In vivo tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluororacil loaded, folic acid targeted quantum dot system. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016, 480, 146-158.

Castro Neto A. H., Guinea F., Peres N. M. R., Novoselov K. S., Geim A.K. The electronic properties of graphene. *Reviews of Modern Physics*. 2009, 81, 109-162.

Chan J. M., Valencia P. M., Zhang L., Langer R., Farokhzad O. C. Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Methods in Molecular Biology*. 2010, 624, 162-175.

Chithrani B. D., Chan W. C. W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*. 2007, 6, 1542-1550.

Chithrani B. D., Ghazani A. A., Chan W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters*. 2006, 6, 4, 662-668.

Cho K., Wang X., Nie S., Chen Z. G., Shin D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008, 14, 5, 1310-1316.

Cholody W. M., Horowska B., Paradziej-Łukowicz J., Martelli S., Konopa J. Structure-Activity Relationship for Antineoplastic Imidazoacridinones: Synthesis and Antileukemic Activity in Vivo. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996, 39, 5, 1028-1032.

- Cocucci E., Aguet F., Boulant S., Kirchhausen T. The first 5 seconds in the life of a clathrin coated pit. *Cell*. 2012, 150, 3, 495–507.
- Crowley L. C., Christensen M. E., Waterhouse N. J. *Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2016.
- Daniels T. R., Delgado T., Helguera G., Penichet M. L. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clinical Immunology*. 2006, 121, 2, 159-176.
- Darzynkiewicz Z., Huang, X., Zhao H. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Current protocols in immunology*. 2017, 119, 1, 5.7.1-5.7. 20.
- Dausend J., Musyanovych A., Dass M., Walther P., Schrezenmeier H., Landfester K., Mailänder V. Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in HeLa Cells. *Macromolecular Bioscience*. 2008, 8, 12, 1135-1143.
- Dawson K. A., Salvati A., Lynch I. Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids. *Nature Nanotechnology*. 2009, 4, 2, 84–85.
- Dayem A. A., Hossain M. K., Lee S. B., Kim K., Saha S. K., Yang G-M. , Choi H. Y., Cho S-G. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18, 1.
- Deng J., Gao C. Recent advances in interactions of designed nanoparticles and cells with respect to cellular uptake, intracellular fate, degradation and cytotoxicity. *Nanotechnology*. 2016, 27, 41.
- Deserno M. Elastic deformation of a fluid membrane upon colloid binding. *Physical Review E*. 2004, 69, 3.
- Dey N. S., Rao M. E. B. Quantum Dot: Novel Carrier for Drug Delivery. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2011, 2, 2.
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995, 92, 20, 9363-9367.
- Ding C., Tong L., Feng J., Fu J. Recent Advances in Stimuli-Responsive Release Function Drug Delivery Systems for Tumor Treatment. *Molecules*. 2016, 21, 12, 1715.
- Doherty G. J., McMahon H. T. Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*. 2009, 78, 857-902.
- Engelberg S., Modrejewski J., Walter J. G., Livney Y. D., Assaraf Y. G. Cancer cell-selective, clathrin-mediated endocytosis of aptamer decorated nanoparticles. *Oncotarget*. 2018, 9, 20993–21006.
- Erdem J. S., Skaug V., Bakke P., Gulsvik A., Haugen A., Zienolddiny S. Mutations in TP53 increase the risk of SOX2 copy number alterations and silencing of TP53 reduces SOX2 expression in non-small cell lung cancer. *BMC cancer*. 2016, 16, 1, 16-28.
- Evan G., Vousden K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001, 411, 342–348.
- Fan J., Yin J.-J., Ning B., Wu X., Hu Y., Ferrari M., Anderson G..J., Wei J., Zhao Y., Nie G. Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritin-platinum nanoparticles. *Biomaterials*. 2011, 32, 1611–1618.
- Ferreira A. P. A., Boucrot E. Mechanisms of Carrier Formation during Clathrin-Independent Endocytosis. *Trends in Cell Biology*. 2018, 28, 3, 188-200.
- Foroozandeh P., Aziz A. A. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. 2018, 13, 339.
- Geim A. K., Novoselov K. S. The rise of graphene. *Nature Materials*. 2007, 6, 183–191.
- Gerweck L. E., Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Research*. 1996, 56, 1194-1198.
- Gniazdowski M., Filipski J., Chorąży M. Nitracrine. Hahn F. E. *Mechanism of Action of Antieukaryotic and Antiviral Compounds*. 1979, 5, 2.

- Goodman C. M., McCusker C. D., Yilmaz T., Rotello V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry*. 2004, 15, 4, 897-900.
- Gustafson H. H., Holt-Casper D., Grainger D. W., Ghandehari H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today*. 2015, 10, 4, 487–510.
- Gustavsson B., Carlsson G., Machover D., Petrelli N., Roth A., Schmoll H. J., Tveit K. M., Gibson F. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2015, 14, 1, 1-10.
- Hassinger J. E., Oster G., Drubin D. G., Rangamani P. Design principles for robust vesiculation in clathrin-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, 114, 7, E1118-E1127.
- Hervault A., Dunn A. E., Lim M., Boyer C., Mott D., Maenosono S., Thanh N. T. K. Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications. *Nanoscale*. 2016, 8, 12152-12161.
- Hillaireau H., Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009, 66, 17, 2873–2896.
- Husseini G. A., Pitt W. G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, 60, 1137–1152.
- Hutter E., Boridy S., Labrecque S., Lalancette-Hebert M., Kriz J., Winnik F. M., Maysinger D. Microglial Response to Gold Nanoparticles. *Acs Nano*. 2010, 4, 5, 2595–2606.
- Isambert N., Campone M., Bourbouloux E., Drouin M., Major A., Yin W., Loadman P., Capizzi R., Grieshaber C., Fumoleau P. Evaluation of the safety of C-1311 (SYMADEX) administered in a phase 1 dose escalation trial as a weekly infusion for 3 consecutive weeks in patients with advanced solid tumours. *European Journal of Cancer*. 2010, 46, 4, 729-734.
- Jacobs J. P. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*. 1970, 227, 168-170.
- Karimi M., Ghasem A., Sahandi Zangabad P., Rahighi R., Moosavi Basri S. M., Mirshekari H., Amiri M., Shafaei Pishabad Z., Aslani A., Bozorgomid M., Ghosh D., Beyzavi A., Vaseghi A., Aref A. R., Haghani L., Bahrami S., Hamblin M. R. 2016. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chemical Society Reviews*. 2016, 45, 5, 457-501.
- Kesharwani P., Jain K., Jain N. K. 2014. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Progress in Polymer Science*. 2014, 39, 2, 268–307.
- Kim E. Y., Schulz R., Swantek P., Kunstman K., Malim M. H., Wolinsky S. M. Gold nanoparticle-mediated gene delivery induces widespread changes in the expression of innate immunity genes. *Gene Therapy*. 2012, 9, 3, 347-353.
- Kiss A. L., Botos E. Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009, 13, 7, 1228-1237.
- Kong F.-Y., Zhang J.-W., Li R.-F., Wang Z.-X., Wang W.-J., Wang W. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. *Molecules*. 2017, 22, 9.
- Konopa J., Horowska B., Paluszkiwicz E., Borowa-Mazgaj B., Augustin E., Skwarska A., Mazerska Z. 2017. Asymmetric bis-acridines with antitumor activity and use thereof. *European Patent No. EP 3 070 078 B1, 04.10.2017*. 2017.
- Konopa J., Horowska B., Paluszkiwicz E., Borowa-Mazgaj B., Augustin E., Skwarska A., Mazerska Z. Asymmetric bis-acridines with antitumour activity and their uses. *US Patent No. 10,202,349, B2, February 12, 2019*. 2019.
- Kou L., Sun J., Zhai Y., He Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, 8, 1, 1-10.
- Kowalski S., Hać S., Wyrzykowski D., Zauszkiewicz-Pawlak A, Inkielewicz-Stępniać I. Selective cytotoxicity of vanadium complexes on human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line by

- inducing necroptosis, apoptosis and mitotic catastrophe process. *Oncotarget*. 2017, 8, 36, 60324-60341.
- Kukowska-Latallo J. F., Candido K. A., Cao Z., Nigavekar S. S., Majoros I. J., Thomas T. P., Balogh L. P., Khan M. K., Baker J. R. Nanoparticle Targeting of Anticancer Drug Improves Therapeutic Response in Animal Model of Human Epithelial Cancer. *Cancer Research*. 2005, 65, 12.
- Lazaro-Carrillo A., Calero M., Aires A., Cortajarena A. L., Simões B. M., Latorre A., Somoza Á., Clarke R. B., Miranda R., Villanueva A. Tailored Functionalized Magnetic Nanoparticles to Target Breast Cancer Cells Including Cancer Stem-Like Cells. *Cancers*. 2020, 12, 1397.
- Lee J., Chatterjee D. K., Lee M. H., Krishnan S. 2014. Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. *Cancer Letters*. 2014, 347, 46-53.
- Li Z., Zhang Y., Zhu D., Li S., Yu X., Zhao Y., Ouyang X., Xie Z., Li L. Transporting carriers for intracellular targeting delivery via non-endocytic uptake pathways. *Drug Delivery*. 2017, 24, 2, 45-55.
- Lim J. P., Gleeson P. A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology & Cell Biology*. 2011, 89, 8, 836-843.
- Mao Z., Zhou X., Gao C. Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions. *Biomaterials Science*. 2013, 1, 896, 896-911.
- Matea C. T., Mocan T., Tabaran F., Pop T., Mosteanu O., Puia C., Iancu C., Mocan L. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, 5421–5431.
- Matysiak-Brynda E., Bujak P., Augustin E., Kowalczyk A., Mazerska Z., Pron A., Nowicka A. M. Stable nanoconjugates of transferrin with alloyed quaternary nanocrystals Ag–In–Zn–S as a biological entity for tumor recognition. *Nanoscale*. 2018, 10, 1286.
- Maynard A. D. Don't define nanomaterials. *Nature*. 2011, 475, 7354, 31.
- Mccarthy D. J., Malhotra M., O'Mahony A. M., Cryan J. F., O'Driscoll C. M. Nanoparticles and the Blood-Brain Barrier: Advancing from In-Vitro Models Towards Therapeutic Significance. *Pharmaceutical Research*. 2014, 32, 4.
- Meuwissen R., Linn S. C., Linnoila R. I., Zevenhoven J., Mooi W. J., Berns A. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer cell*. 2003, 4, 3, 181-189.
- Mizushima N., Yoshimori T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*. 2007, 3, 6, 542-545.
- Mosquera J., García I., Liz-Marzán L. M. Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size. *Accounts of Chemical Research*. 2018, 51, 9, 2305-2313.
- Mueller C. F., Laude K., McNally J. S., Harrison D. G. Redox mechanisms in blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005, 25, 274–278.
- Muhamad N., Plengsuriyakarn T., Na-Bangchang K. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *International Journal of Nanomedicine*. 2018, 13, 3921–3935.
- Mukherjee A. A Review on Liposomes and Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles to the Brain. *Molecular Biology & Techniques*. 2019, 1, 102.
- Munasinghe E., Aththapaththu M., Jayarathne L. Magnetic and Quantum Dot Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Systems. *Colloid Science in Pharmaceutical Nanotechnology*. 2019.
- Nagai N., Ogata F., Ishii M., Fukuoka Y., Otake H., Nakazawa Y., Kawasaki N. Involvement of Endocytosis in the Transdermal Penetration Mechanism of Ketoprofen Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19, 2138.
- Nel A. E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M., Somasundaran P. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater*. 2009, 8, 7, 543–557.

- Nishikawa T., Iwakiri N., Kaneko Y., Taguchi A., Fukushima K., Mori H., Morone N., Kadokawa J. Nitric oxide release in human aortic endothelial cells mediated by delivery of amphiphilic polysiloxane nanoparticles to caveolae. *Biomacromolecules*. 2009, 10, 8, 2074-2085.
- Oh N., Park J.-H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2014, 9 (Suppl 1), 51-63.
- Okazaki F., Matsunaga N., Okazaki H., Utoguchi N., Suzuki R., Maruyama K., Koyanagi S., Ohdo S. Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Research*. 2010, 70, 15.
- Oser M. G., Niederst M. J., Sequist L. V., Engelman J. A. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *The Lancet Oncology*. 2015, 16, 4, e165-e172.
- Page A., Ortega A., Alameda J. A., Navarro M., Paramio J. M., Saiz-Pardo M., Almeida E. I., Hernández P., Fernández-Aceñero M. J., García-Fernández R. A., Casanova M. L. IKK α Promotes the Progression and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer Independently of its Subcellular Localization. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2019, 17, 251-262.
- Paluszkiwicz E., Horowska B., Borowa-Mazgaj B., Peszyńska-Sularz G., Paradziej-Łukowicz J., Augustin E., Konopa J., Mazerska Z. Design, synthesis and high antitumor potential of new unsymmetrical bisacridine derivatives towards human solid tumors, specifically pancreatic cancers and their unique ability to stabilize DNA G-quadruplexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, 204, 112599.
- Panariti A., Misericocchi G., Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, Science and Applications*. 2012, 5, 87-100.
- Passegué E., Wagers A. J., Giuriato S., Anderson W. C., Weissman I. L. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *Journal of Experimental Medicine*. 2005, 202, 11, 1599-1611.
- Pearson R. M., Hsu H.J., Bugno J., Hong S. Understanding nano-bio interactions to improve nanocarriers for drug delivery. *Organic Nanoparticles for Drug Delivery and Imaging*. 2014, 39, 3, 227-237.
- Pelkmans L., Kartenbeck J., Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*. 2001, 3, 473-483.
- Peng F., Su Y., Zhong Y., He Y. Subcellular distribution and cellular self-repair ability of fluorescent quantum dots emitting in the visible to near-infrared region. *Nanotechnology*. 2017, 28.
- Pfeffer C. M., Singh A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19, 448.
- Piao M. J., Kang K. A., Lee I. K., Kim H. S., Kim S., Choi J. Y., Choi J., Hyun J. W. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*. 2011, 201, 92-100.
- Pilch J., Kowalik P., Bujak P., Nowicka A. M., Augustin E. Quantum Dots as a Good Carriers of Unsymmetrical Bisacridines for Modulating Cellular Uptake and the Biological Response in Lung and Colon Cancer Cells. *Nanomaterials*. 2021, 11, 462.
- Pilch J., Matysiak-Brynda E., Kowalczyk A., Bujak P., Mazerska Z., Nowicka A. M., Augustin E. New unsymmetrical bisacridine derivatives non-covalently attached to quaternary quantum dots improve cancer therapy via enhancing cytotoxicity towards cancer cells and protecting normal cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020, 12, 15, 17276-17289.
- Piotrowska-Sowińska J. Clinical observations of the Ledakrin effects in treatment of patients with malignant neoplasms. *Materia Medica Polona*. 1976, 8, 3, 266-272.
- Qiu Y., Liu Y., Wang L., Xu L., Bai R., Ji Y., Wu X., Zhao Y., Li Y., Chen C. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*. 2010, 30, 7606-7619.
- Rafiei P., Haddadi A. 2017. Pharmacokinetic Consequences of PLGA Nanoparticles in Docetaxel Drug Delivery. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2017, 5, 1.

- Raja G., Jang Y-K., Suh J-S., Kim H-S., Ahn S. H., Kim T-J. Microcellular Environmental Regulation of Silver Nanoparticles in Cancer Therapy: A Critical Review. *Cancers*. 2020, 12, 664.
- Rivera G. P., Hühn D., Del Mercato L. L., Sasse D., Parak W. J. Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacological Research*. 2010, 62, 2, 115-125.
- Saadat M., Zahednezhad F., Zakeri-Milani P., Heidari H. R., Shahbazi-Mojarrad J., Valizadeh H. Drug Targeting Strategies Based on Charge Dependent Uptake of Nanoparticles into Cancer Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019, 22, 191-220.
- Sahay G., Alakhova D. Y., Kabanov A. V. Endocytosis of Nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. 2010, 145, 3, 182–195.
- Sato A., Itcho N., Ishiguro H., Okamoto D., Kobayashi N., Kawai K., Kasai H., Kurioka D., Uemura H., Kubota Y., Watanabe M. Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, 8, 3151–3160.
- Senapati S., Mahanta A. K., Kumar S., Maiti P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018, 3, 7.
- Shamloo B. Usluer S. p21 in Cancer Research. *Cancers*. 2019, 11, 1178.
- Sharma A. K., Gothwal A., Kesharwani P., Alsaab H., Iyer A. K., Gupta U. Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2017, 22, 2, 314–326.
- Sholl L. M., Aisner D. L., Varella-Garcia M., Berry L. D., Dias-Santagata D., Wistuba I. I., Chen H., Fujimoto J., Kugler K., Franklin W., Iafrate A. J., Ladanyi M., Kris M. G., Johnson B. E., Paul P. A., Minna J. D., Kwiatkowski D. J. Multi-institutional oncogenic driver mutation analysis in lung adenocarcinoma: the lung cancer mutation consortium experience. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015, 10, 5, 768-777.
- Sivandzade F., Bhalerao A., Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio Protocol*. 2019, 9, 1.
- Smith A. M., Duan H., Mohs A. M., Nie S. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60, 2008, 1226–1240.
- Soenen S. J., Rivera-Gil P., Montenegro J-M., Parak W. J., De Smedt S. C. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano today*. 2011, 6, 446-465.
- Szwed M., Marczak A., Rogalska A., Matusiak A., Józwiak Z. Rola przeciwciał monoklonalnych w transporcie leków. *Nowotwory Journal of Oncology*. 2010, 60, 5, 442–450.
- Tae-You K., Dong-Wan K., Jae-Yong C., Sang G. S., Sung-Chul K., Dae Seog H., Noe Kyeong K., Yung-Jue B. Phase I and Pharmacokinetic Study of Genexol-PM, a Cremophor-Free, Polymeric Micelle-Formulated Paclitaxel, in Patients with Advanced Malignancies. *Clinical Cancer Research*. 2004, 10, 11.
- Tan M., Wang Y., Song X., Wu Y. Nanomaterials as Therapeutic/Imaging Agent Delivery Vehicles for Tumor Targeting Theranostics. *World Scientific Pub Co Pte Lt. China*. 2016, 1-42.
- Thompson A. A., Dilworth S., Hay R. J. Isolation and culture of colonic epithelial cells in serum-free medium. *Journal of Tissue Culture Methods*. 1985, 9, 2, 117-122.
- Valente G., Morani F., Nicotra G., Fusco N., Peracchio C., Titone R., Alabiso O., Arisio R., Katsaros D., Benedetto C., Isidoro C. Expression and Clinical Significance of the Autophagy Proteins BECLIN 1 and LC3 in Ovarian Cancer. *BioMed research international*. 2014.
- Vandana M., Sahoo S. K. Long circulation and cytotoxicity of PEGylated gemcitabine and its potential for the treatment of pancreatic cancer. *Biomaterials*. 2010, 35, 9340–9356.
- Verdera H. C., Gitz-Francois J. J., Schiffelers R. M., Vader P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*. 2017, 266, 100-108.

- Wang F., Wang Y. C., Dou S., Xiong M. H., Sun T. M., Wang J. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. *ACS Nano*. 2011, 5, 5, 3679-3692.
- Wang G. Z., Cheng X., Li X. C., Liu Y. Q., Wang X. Q., Shi X., Wang Z.-Y., Guo Y.-Q., Wen Z. S., Huang Y. C., Zhou G. B. Tobacco smoke induces production of chemokine CCL20 to promote lung cancer. *Cancer letters*. 2015, 363, 1, 60-70.
- Wang S.-H., Lee C.-W., Chiou A., Wei P.-K. Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *Journal of Nanobiotechnology* volume. 2010, 8, 33.
- Wang X., Sun X., Lao J., He H., Cheng T., Wang M. Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, 122, 638-644.
- Weissleder R., Kelly K., Sun E. Y., Shtatland T., Josephson L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature Biotechnology*. 2005, 23, 1418-1423.
- White K. A., Grillo-Hill B. K., Barber D. L. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. *Journal of Cell Science*. 2017, 130, 663-669.
- World Health Organization. WHO: World Cancer Report 2014. 2014.
- Wu M., Huang S. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment (Review). *Molecular and Clinical Oncology*. 2017, 7, 738-746.
- Yang H., Villani R. M., Wang H., Simpson M. J., Roberts M. S., Tang M., Liang X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018, 37, 266.
- Zabielska-Koczywa K., Lechowski R. The Use of Liposomes and Nanoparticles as Drug Delivery Systems to Improve Cancer Treatment in Dogs and Cats. *Molecules*. 2017, 22, 12, 2167.
- Zhang D. D., Kong Y. Y., Sun J. H., Huo S. J., Zhou M., Gui Y. L., Mu X., Chen H., Yu S. Q., Xu Q. Co-delivery nanoparticles with characteristics of intracellular precision release drugs for overcoming multidrug resistance. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, 2081-2108.
- Zhang Y., Nayak T. R., Hong H., Cai W. Graphene: a versatile nanoplatform for biomedical applications. *Nanoscale*. 2012, 4, 3833-3842.
- Zhao J., Stenzel M. H. Entry of nanoparticles into cells: the importance of nanoparticle properties. *Polymer Chemistry*. 2018, 9, 259.
- Zhou Q., Zhang L., Yang T., Wu H. Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2018, 12, 2921-2942.
- Zhu J., Shi X. Dendrimer-based nanodevices for targeted drug delivery applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013, 1, 34, 4199.

DOROBEK NAUKOWY

PUBLIKACJE:

1. **Pilch J.**, Kowalik P., Bujak P., Nowicka A. M., Augustin E.: Quantum Dots as a Good Carriers of Unsymmetrical Bisacridines for Modulating Cellular Uptake and the Biological Response in Lung and Colon Cancer Cells. *Nanomaterials*, 2021, 11, 2:462; Q1; IF=4,324.
2. **Pilch J.**, Matysiak-Brynda E., Kowalczyk A., Bujak P., Mazerska Z., Nowicka A. M., Augustin E.: New unsymmetrical bisacridine derivatives noncovalently attached to quaternary quantum dots improve cancer therapy via enhancing cytotoxicity towards cancer cells and protecting normal cells, *ACS Applied Material & Interfaces*, 2020, 12, 15: 17276-17289; Q1; IF=8,758.
3. Mania S., Partyka K., **Pilch J.**, Augustin E., Cieřlik M., Ryl J., Jinn J.-R., Wang Y.-J., Michałowska A., Tylingo R.: Obtaining and Characterization of the PLA/Chitosan Foams with Antimicrobial Properties Achieved by the Emulsification Combined with the Dissolution of Chitosan by CO₂ Saturation, *Molecules*, 2019, 24, 24: 4532; Q2; IF=3,267.
4. Pajor M., **Pilch J.**, Grecka K., Cieřlik B.: Analiza zawartości metali w miodach o różnym pochodzeniu botanicznym, *Analityka: Nauka i Praktyka*, 2018, 2: 68-73.
5. Szweda P., Zalewska M., **Pilch J.**, Kot B., Milewski S.: Essential oils as potential anti-staphylococcal agents, *Acta Veterinaria-Beograd*, 2018, 68, 1: 95-107; Q2; IF=0,693.

MATERIAŁY KONFERENCYJNE:

1. **Pilch J.**, Bujak P., Nowicka A. M., Augustin E.: The conjugation of antitumor unsymmetrical bisacridines with quantum dots enhance cytotoxicity and change the biological response in lung and colon cancer cells. The 45th FEBS Congress. Lublana, Słowenia, 3-8 lipiec 2021.
2. **Pilch J.**, Bujak P., Kowalczyk A., Nowicka A. M., Augustin E.: The impact of pH-dependent quantum dots-unsymmetrical bisacridine nanoconjugates on the lysosomal content and the cytotoxicity in lung and colon cancer cells as well as in normal cells. The 41st EORTC-PAMM Winter Meeting. *Abstract Book 2020*, Sztokholm, Szwecja, 13-15 luty 2020.
3. **Pilch J.**, Pawłowska M., Bujak P., Nowicka A. M., Augustin E.: Quantum dots conjugates with unsymmetrical bisacridines enhance cytotoxicity of these antitumor compounds in lung cancer cells and have protecting effects on normal cells. *European Journal of Cancer. Supplement; 30th EORTC-NCI-AACR Symposium*. Elsevier, *Abstract Book 2018*, s. e60. Dublin, Irlandia, 13-16 listopada 2018.
4. **Pilch J.**, Nowicka A. M., Bujak P., Augustin E.: The influence of quantum dots Ag-In-Zn-S conjugated with unsymmetrical bisacridine derivatives on cytotoxicity and cell cycle distribution in lung and colon cancer cells. *Acta Biochimica Polonica. Supplement, Vol. 65 nr 2* (2018), Gdańsk, Polska, 18-21 wrzesień 2018.
5. **Pilch J.**, Szweda P.: Izolacja mikroorganizmów z gleby syntetyzujących metabolity o właściwościach przeciwwgronkowcowych. IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu - BIOOPEN. *Księga Abstraktów*, Łódź, Polska, 24-25 maja 2018.

PROJEKTY BADAWCZE:

1. Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Grant NCN, PRELUDIUM: *Ocena możliwości zastosowania kwasu foliowego i/lub transferyny jako łączników w koniugatach kropek kwantowych z niesymetrycznymi bisakrydynami w celu zwiększenia ich selektywności i cytotoksyczności wobec komórek nowotworu płuc i prostaty*. Okres realizacji: (14.01.2021 – 13.01.2023). Charakter pracy w projekcie: kierownik projektu.

2. Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Grant NCN, OPUS: *Odpowiedź biologiczna indukowana przez niesymetryczne bisakrydyny o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej w komórkach ludzkiego raka okrężnicy i płuc, wzmocniona przez dostarczenie tych związków w postaci koniugatów z nanocząstkami*. Kierownik projektu: dr hab. Ewa Augustin, prof. uczelni. Okres realizacji: 2.10.2017 – 1.07.2021. Charakter pracy w projekcie: wykonawca.
3. Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Grant NCN, SONATA BIS: *Ocena możliwości wykorzystania produktów pszczelich oraz bakteriocyn syntetyzowanych przez mikroflorę tych produktów jako alternatywę lub uzupełnienie klasycznej antybiotykoterapii*. Kierownik projektu: dr hab. inż. Piotr Szweđa, prof. uczelni. Okres realizacji: 21.04.2016-20.08.2021 (mój udział: 1.07.2016-30.09.2017). Charakter pracy w projekcie: wykonawca.

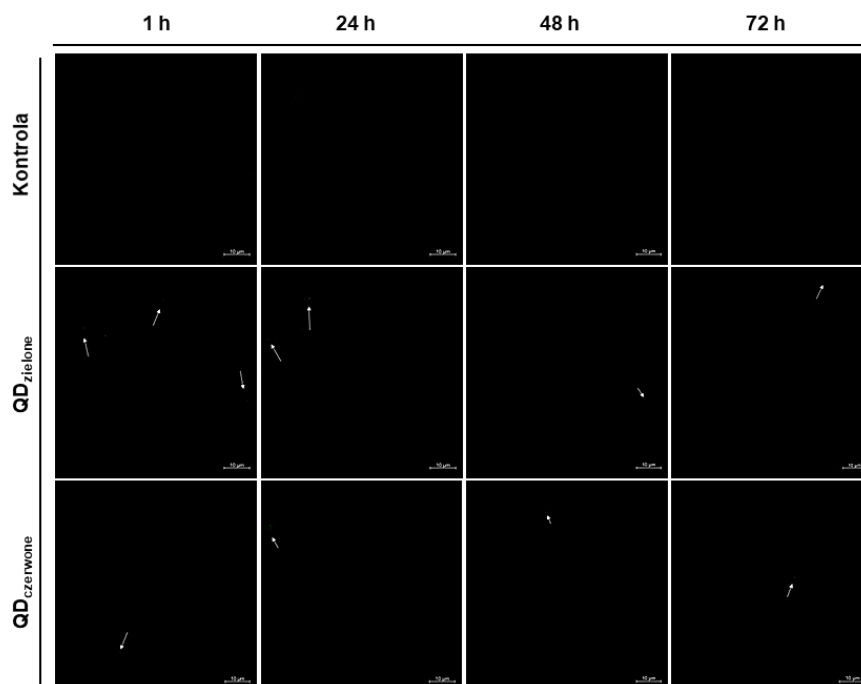
INSTRUKCJE DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH:

1. *Wyznaczanie masy cząsteczkowej białek z wykorzystaniem elektroforezy SDS – PAGE w warunkach denaturujących*. Kierunek: Biotechnologia I stopień, VI semestr: *Biochemia*.
2. *Analiza dystrybucji komórek nowotworowych w cyklu życiowym z wykorzystaniem cytometrii przepływowej*. Kierunek: Biotechnologia II stopień, II semestr: *Biologia komórki nowotworowej*.
3. *Barwienie przyżyciowe organelli komórkowych po traktowaniu związkami przeciwnowotworowymi*. Kierunek: Biotechnologia II stopień, II semestr: *Biologia komórki nowotworowej*.

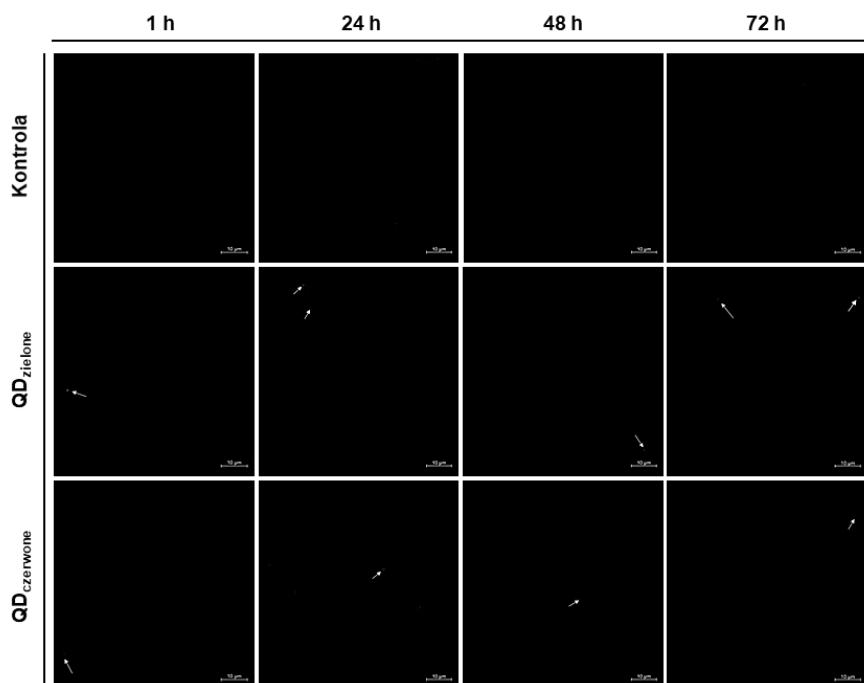
NAGRODY I OSIĄGNIĘCIA:

1. Nominacja do nagrody Naukowiec Przyszłości 2021 w kategorii: Nauka dla lepszego życia w przyszłości za projekt badawczy pn. *Ocena możliwości zastosowania kwasu foliowego i/lub transferyny jako łączników w koniugatach kropek kwantowych z niesymetrycznymi bisakrydynami w celu zwiększenia ich selektywności i cytotoksyczności wobec komórek nowotworu płuc i prostaty* nadany przez Centrum Inteligentnego Rozwoju (2021).
2. Udział w Akademii Efektywnej Współpracy PACTT-Pfizer – Porozumienie Akademickich Centrów Transferu Technologii (PACTT) oraz Pfizer Polska (2021).
3. Wyróżnienie Oddziału Gdańskiego PTChem za najlepszą pracę magisterską obronioną na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w roku akademickim 2015/16. Tytuł pracy: *Wpływ związków przeciwnowotworowych na syntezę i poziom lipidów w komórkach nowotworowych*. Promotor: prof. dr hab. inż. Zofia Mazerska (2016).
4. Złota Odznaka Absolwenta Politechniki Gdańskiej za uzyskanie dyplomu magisterskiego z wyróżnieniem (2016).

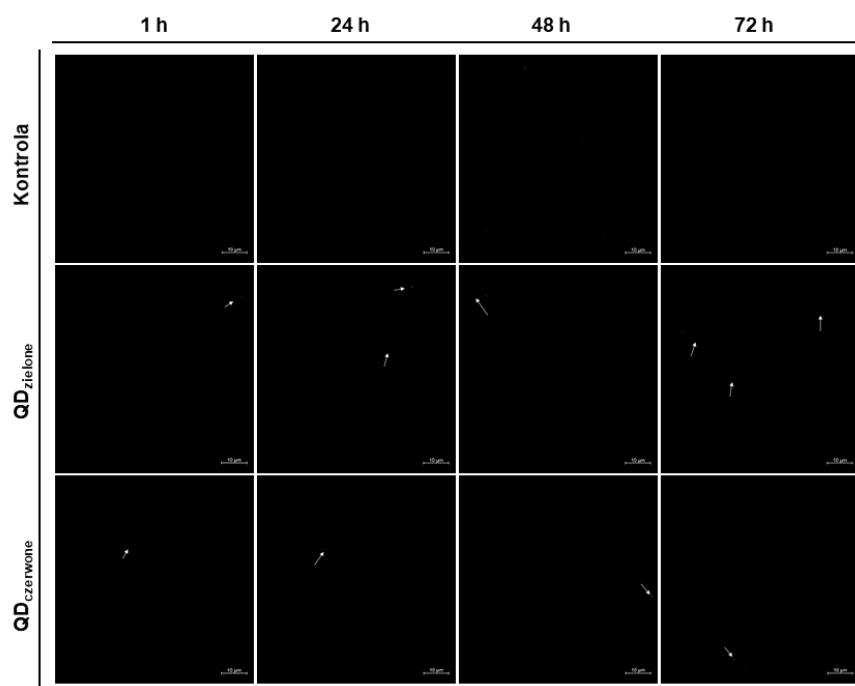
SUPLEMENT



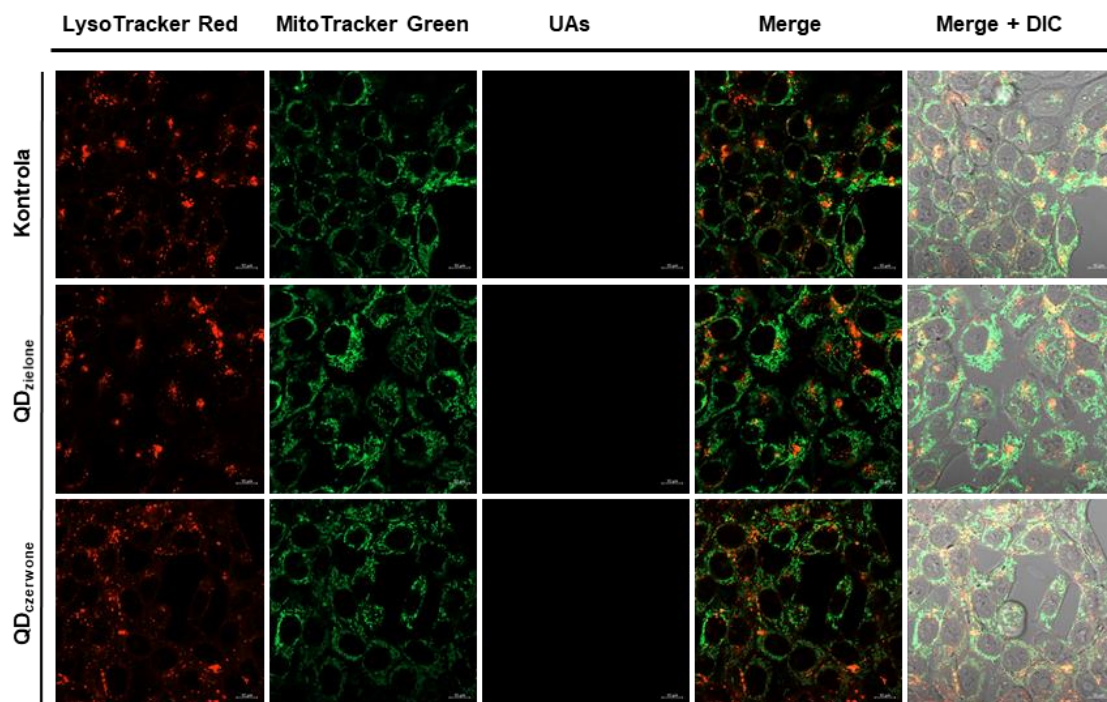
Rysunek S65. Wnikanie QD_{zielonych} i QD_{czerwonych} do komórek nowotworowej linii HCT116 po 1, 24, 48 oraz 72 h, w stężeniu IC₈₀ (stężenie QDs w koniugacie, odpowiadające IC₈₀ UAs w wolnej postaci). Kolor zielony reprezentuje QDs (sygnały zaznaczone strzałkami), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń



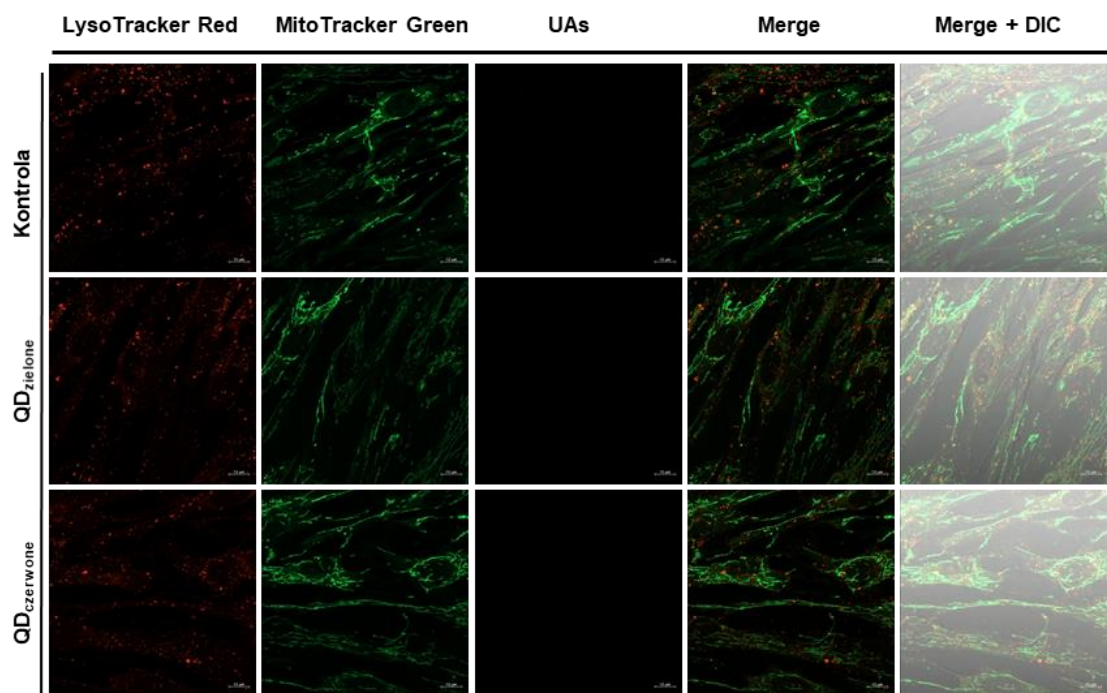
Rysunek S66. Wnikanie QD_{zielonych} i QD_{czerwonych} do komórek prawidłowej linii MRC-5 po 1, 24, 48 oraz 72 h, w stężeniu IC₈₀ (stężenie QDs w koniugacie, odpowiadające IC₈₀ UAs w wolnej postaci). Kolor zielony reprezentuje QDs (sygnały zaznaczone strzałkami), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń



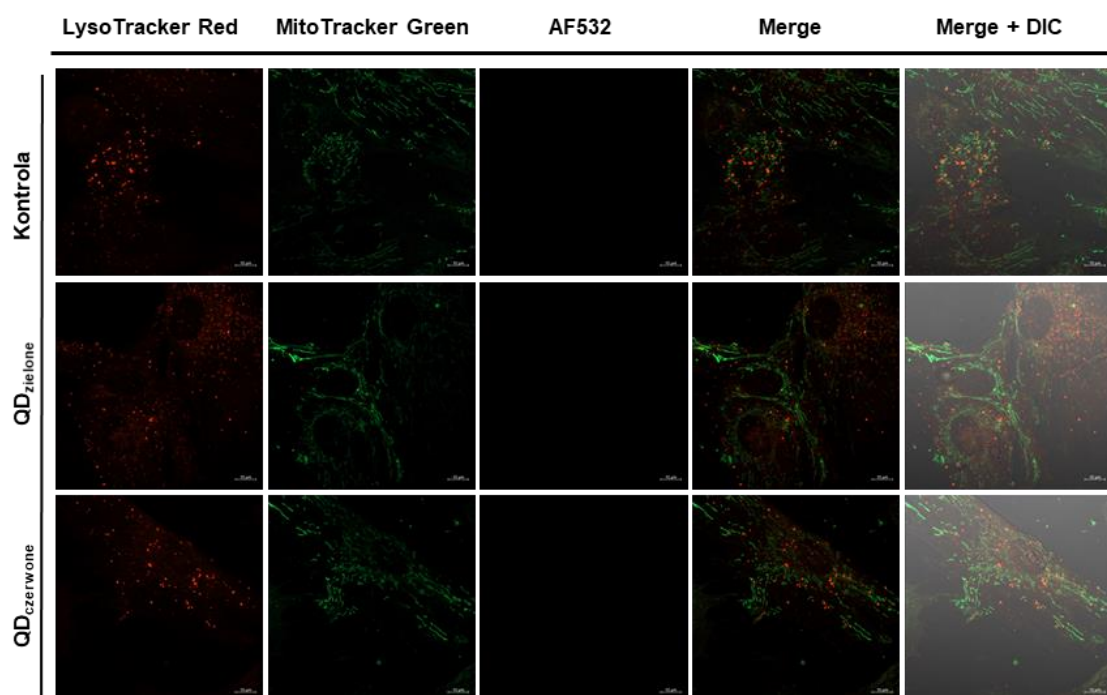
Rysunek S67. Wnikanie QDzielonych i QDczerwonych do komórek prawidłowej linii CCD 841 CoN po 1, 24, 48 oraz 72 h, w stężeniu IC₈₀ (stężenie QDs w koniugacie, odpowiadające IC₈₀ UAs w wolnej postaci). Kolor zielony reprezentuje QDs (sygnały zaznaczone strzałkami), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń



Rysunek S68. Komórki nowotworowej linii HCT116 - kontrolne oraz traktowane QDzielonymi i QDczerwonymi (w stężeniu odpowiadającym IC₈₀ badanych UAs w koniugacie) przez 72 h. Obraz z mikroskopu konfokalnego: lizosomy wybarwione na czerwono (LysoTracker Red DND-99), mitochondria – na zielono (MitoTracker Green FM), UAs – na pomarańczowo (własna fluorescencja), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów



Rysunek S69. Komórki kontrolne (nietraktowane badanym związkami) oraz komórki traktowane QD_{zielonymi} i QD_{czerwonymi} (w stężeniu odpowiadającym IC₈₀ badanych UAs w koniugacie) przez 72 h prawidłowej linii MRC-5. Obraz z mikroskopu konfokalnego: lizosomy wybarwione na czerwono (LysoTracker Red DND-99), mitochondria – na zielono (MitoTracker Green FM), UAs – na pomarańczowo (własna fluorescencja), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów



Rysunek S70. Komórki kontrolne (nietraktowane badanym związkami) oraz komórki traktowane QD_{zielonymi} i QD_{czerwonymi} (w stężeniu odpowiadającym IC₈₀ badanych UAs w koniugacie) przez 72 h prawidłowej linii CCD 841 CoN. Obraz z mikroskopu konfokalnego: lizosomy wybarwione na czerwono (LysoTracker Red DND-99), mitochondria – na zielono (MitoTracker Green FM), UAs – na pomarańczowo (własna fluorescencja), skala 10 µm. Przedstawione fotografie są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów

Tabela S5. Procentowa zawartość komórek linii H460 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48, 72 i 144 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającemu wartości IC₈₀ związków w ich wolnej postaci. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów

Związek	[h]	Fazy cyklu komórkowego									
		sub-G1	\pm	G1	\pm	S	\pm	G2/M	\pm	Poli	\pm
Kontrola	24	1,33	0,93	57,47	0,90	16,5	1,9	21,1	1,1	1,8	1,2
	48	0,67	0,29	65,3	3,3	14,60	0,89	18,3	3,8	1,17	0,59
	72	1,23	0,47	65,5	3,7	15,63	0,75	15,8	2,3	1,8	1,2
	144	3,67	0,46	79,9	2,8	4,37	0,65	5,6	1,1	6,5	1,2
QD _{zielone}	24	0,80	0,17	60,33	0,21	16,2	3,1	20,0	3,0	2,67	0,72
	48	1,70	0,75	66,9	2,3	14,2	1,7	15,5	1,9	1,70	0,36
	72	1,233	0,058	68,8	2,5	11,53	0,29	15,10	0,61	3,4	2,6
	144	2,87	0,76	76,1	8,6	6,0	3,6	10,1	4,6	4,9	3,5
QD _{czerwone}	24	0,80	0,26	59,2	3,8	15,60	0,79	21,4	1,8	2,9	1,2
	48	0,87	0,45	66,2	2,0	13,6	1,9	17,1	1,0	3,57	0,92
	72	1,233	0,058	69,57	0,35	11,97	1,70	14,6	1,7	2,6	1,3
	144	2,83	0,96	76,7	7,2	5,4	3,2	8,7	3,8	5,6	1,0
C-2028	24	3,7	1,6	34,3	5,3	30,33	0,87	29,5	5,1	2,1	2,7
	48	11,7	2,2	48,5	5,2	14,5	1,2	27,2	1,5	2,60	0,75
	72	17,5	4,2	37,0	2,1	13,6	0,6	34,3	5,9	2,9	2,3
	144	21,7	5,0	66,6	4,1	3,5	1,6	4,3	1,2	4,88	2,11
QD _{zielone} -C-2028	24	2,37	0,64	41,9	4,4	19,03	0,60	36,4	3,4	0,30	0,35
	48	4,4	1,2	56,8	1,3	12,63	0,21	24,20	0,70	1,90	0,26
	72	3,27	0,25	69,3	1,3	8,83	0,74	16,4	3,0	2,2	1,4
	144	21,5	3,2	35,3	2,6	7,60	0,85	33,0	1,2	2,6	1,4
QD _{czerwone} -C-2028	24	2,17	0,55	35,4	2,7	26,4	3,9	35,3	1,5	1,8	2,9
	48	7,1	1,6	52,9	6,0	13,5	3,0	23,9	8,5	2,60	0,85
	72	6,1	2,1	48,3	9,0	14,4	1,6	33,7	2,5	2,3	2,0
	144	21,1	4,0	33,2	2,5	9,97	0,81	30,1	2,4	5,6	1,3
C-2045	24	5,90	0,61	39,5	4,9	23,6	2,8	30,6	3,2	0,37	0,46
	48	10,2	2,1	44,6	7,4	14,0	2,0	29,6	8,5	1,6	1,7
	72	13,2	3,8	39,9	4,2	17,6	1,1	30,5	3,3	2,70	0,42
	144	30,1	4,1	24,67	0,61	8,4	1,3	31,7	1,4	5,2	1,1
QD _{zielone} -C-2045	24	2,90	0,40	36,6	6,7	20,1	1,8	39,7	4,2	0,67	0,60
	48	9,43	0,81	52,7	3,0	13,6	1,5	25,6	4,3	1,23	0,96
	72	4,1	1,7	49,1	5,4	14,7	3,3	32,3	5,9	2,1	1,2
	144	15,1	7,9	71,9	7,4	7,3	1,4	4,6	1,9	1,03	0,21
QD _{czerwone} -C-2045	24	4,8	1,6	32,8	2,3	26,2	1,4	35,1	1,6	1,10	0,35
	48	9,6	4,4	41,5	2,3	12,9	1,6	33,9	4,8	2,17	0,85
	72	9,7	1,3	35,2	3,8	13,3	1,8	38,7	1,3	4,55	0,21
	144	23,8	6,5	29,3	6,4	9,8	1,9	31,0	2,4	6,15	0,64

Tabela S6. Procentowa zawartość komórek linii HCT116 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48, 72 i 144 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ związków w ich wolnej postaci. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów

Związek	[h]	Fazy cyklu komórkowego									
		sub-G1	\pm	G1	\pm	S	\pm	G2/M	\pm	Poli	\pm
Kontrola	24	2,00	0,10	46,4	5,0	17,5	1,3	26,2	1,3	10,3	1,6
	48	1,50	0,61	59,9	6,0	12,8	1,5	20,5	2,8	5,3	4,7
	72	3,0	1,0	61,3	3,4	11,9	3,0	17,8	3,9	5,9	3,2
	144	4,1	1,0	63,3	4,0	9,1	2,0	15,9	2,6	7,6	2,3
QDzielone	24	2,30	0,71	48,9	7,5	13,9	2,1	25,6	4,7	11,70	0,71
	48	2,27	0,46	57,6	3,4	11,1	1,7	21,5	3,4	9,2	3,3
	72	2,33	0,67	56,0	3,1	13,23	0,65	20,7	1,1	6,20	0,71
	144	6,9	1,5	58,1	3,8	8,4	1,7	17,1	1,7	9,6	4,1
QDczerwone	24	1,40	0,36	53,5	5,3	15,1	1,3	26,0	5,5	4,8	2,6
	48	3,4	1,3	58,5	3,6	11,03	0,81	19,5	2,6	7,6	1,7
	72	3,5	1,3	56,4	1,4	12,933	0,058	20,1	1,8	7,07	0,84
	144	3,67	0,49	63,4	4,7	9,5	1,0	17,33	0,75	6,1	3,8
C-2028	24	3,07	0,57	33,0	2,5	21,4	2,6	41,53	0,21	1,0	1,4
	48	7,6	3,2	51,1	5,5	6,43	0,90	28,6	2,3	6,3	4,2
	72	29,3	7,2	30,8	2,3	6,83	0,60	24,9	3,0	8,2	4,3
	144	31,1	3,9	34,2	5,9	4,23	0,28	14,3	2,1	16,3	4,5
QDzielone-C-2028	24	2,03	0,75	37,4	1,9	17,1	2,9	39,3	3,5	5,5	2,4
	48	5,40	0,71	50,9	1,1	6,3	1,5	28,0	4,1	5,60	0,70
	72	8,07	0,46	54,2	1,5	5,80	0,87	20,4	1,0	10,2	1,5
	144	32,2	7,2	29,4	8,2	4,1	1,6	15,5	2,3	18,7	7,3
QDczerwone-C-2028	24	1,53	0,35	36,2	4,5	16,3	1,7	43,3	5,6	2,33	0,83
	48	7,1	2,3	54,0	5,6	6,3	1,5	23,4	3,4	5,60	0,70
	72	15,8	3,1	41,7	3,3	6,98	0,78	24,9	1,9	9,13	0,47
	144	37,80	0,10	22,1	1,3	3,23	0,32	17,6	3,1	19,3	2,2
C-2045	24	2,40	0,44	27,7	2,0	12,97	0,67	53,5	2,7	3,5	1,2
	48	11,0	2,6	43,8	7,4	6,37	0,47	32,9	8,8	5,9	1,8
	72	22,4	6,3	29,6	7,7	7,05	0,33	26,1	1,3	15,7	2,2
	144	46,3	6,4	21,6	1,4	4,87	0,85	10,5	1,3	16,8	6,2
QDzielone-C-2045	24	2,70	0,92	34,0	3,7	15,6	2,4	44,4	8,4	4,8	1,4
	48	8,60	0,75	56,5	3,6	7,3	1,2	28,4	4,0	1,2	1,0
	72	7,7	1,3	52,0	6,9	6,47	0,47	23,6	3,6	10,2	3,2
	144	43,2	3,5	26,6	5,9	4,07	0,60	10,83	0,64	15,3	4,2
QDczerwone-C-2045	24	2,23	0,57	37,4	1,9	17,1	2,9	39,3	3,5	3,8	1,2
	48	4,4	2,3	53,1	2,8	9,9	1,9	24,7	5,5	5,2	3,0
	72	9,4	1,9	46,1	3,0	7,0	1,1	23,3	3,6	10,0	1,7
	144	32,3	7,0	30,5	4,2	3,23	0,58	15,1	4,3	18,8	6,9

Tabela S7. Procentowa zawartość komórek linii MRC-5 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 72 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} badanych związków w ich wolnej postaci (wyznaczonych dla nowotworowej linii H460). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów

Związek	Fazy cyklu komórkowego									
	sub-G1	\pm	G1	\pm	S	\pm	G2/M	\pm	Poli	\pm
Kontrola	1,00	0,17	87,1	1,7	1,50	0,52	6,90	0,36	3,6	1,7
QDzielone	0,950	0,071	87,40	0,26	0,67	0,21	7,0	1,4	4,3	2,0
QDczerwone	1,50	0,44	88,6	1,4	1,27	0,25	7,5	1,2	2,07	0,68
C-2028	4,3	1,9	64,3	4,3	3,5	1,1	25,3	2,9	6,7	3,0
QDzielone-C-2028	3,47	0,25	71,8	3,0	1,70	0,56	18,6	2,2	3,80	0,28
QDczerwone-C-2028	2,60	0,32	73,9	5,0	1,45	0,26	19,2	2,7	7,6	5,8
C-2045	3,2	1,1	64,0	5,2	3,3	1,5	24,8	3,7	4,7	1,6
QDzielone-C-2045	2,8	1,8	70,3	3,2	2,00	0,20	21,7	1,5	3,83	0,90
QDczerwone-C-2045	5,2	1,4	66,0	4,6	2,63	0,83	22,3	3,1	5,5	3,4

Tabela S8. Procentowa zawartość komórek linii CCD 841 CoN w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 72 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} badanych związków w ich wolnej postaci (wyznaczonych dla nowotworowej linii HCT116). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów

Związek	Fazy cyklu komórkowego									
	sub-G1	\pm	G1	\pm	S	\pm	G2/M	\pm	Poli	\pm
Kontrola	1,27	0,45	81,0	3,0	1,90	0,20	13,9	3,1	1,97	0,72
QDzielone	0,90	0,44	82,5	5,6	1,40	0,20	13,7	3,4	1,5	1,9
QDczerwone	1,33	0,67	80,5	6,0	1,63	0,25	14,2	3,8	2,3	1,9
C-2028	3,5	1,3	53,5	3,5	3,48	0,95	29,5	2,4	12,8	2,9
QDzielone-C-2028	1,33	0,81	71,4	4,4	1,43	0,31	21,3	1,6	4,5	1,5
QDczerwone-C-2028	2,60	0,46	67,4	2,8	3,77	0,71	22,8	1,9	2,80	0,62
C-2045	3,6	1,5	61,5	6,7	3,1	1,0	25,7	3,2	6,6	2,1
QDzielone-C-2045	1,6	1,0	72,9	3,4	1,80	0,26	19,6	1,3	3,1	1,0
QDczerwone-C-2045	2,4	1,5	72,2	3,4	1,93	0,40	19,9	1,7	3,33	0,64

Tabela S9. Zmiany w asymetrii i przepuszczalności błony komórek linii H460 po 24, 72 i 144 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} w ich wolnej postaci. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. (A-/PI-) - komórki żywe, (A+/PI-) - komórki wczesnoapoptotyczne, (A+/PI+) - komórki późnoapoptotyczne oraz nekroptotyczne, (A-/PI+) - komórki nekrotyczne

Związek	Kwartyl									
	[h]	A-/PI-		A+/PI-		A+/PI+		A-/PI+		
		średnia	\pm	średnia	\pm	średnia	\pm	średnia	\pm	
Kontrola	24	91,1	2,3	1,17	0,57	5,1	1,6	2,6	1,2	
	72	91,60	0,69	3,0	1,0	4,43	0,65	1,0	0,6	
	144	86,2	1,5	3,07	0,21	9,7	1,2	1,0	0,3	
QDzielone	24	93,0	2,3	2,3	1,3	3,7	1,2	1,03	0,67	
	72	91,5	2,2	2,90	0,10	4,7	1,4	0,93	0,65	

Związek	Kwartyl									
	[h]	A-/PI-		A+/PI-		A+/PI+		A-/PI+		
		średnia	±	średnia	±	średnia	±	średnia	±	
QD _{czerwone}	144	88,8	3,1	2,4	1,4	7,5	2,3	1,37	0,51	
	24	92,3	2,7	2,27	0,90	4,0	1,5	1,4	1,3	
	72	88,8	1,2	3,3	1,4	6,3	1,7	1,7	1,0	
C-2028	144	88,3	2,3	2,83	0,64	7,8	1,9	1,00	0,10	
	24	77,9	2,5	9,0	1,6	10,6	3,1	2,5	1,1	
	72	41,3	3,3	4,4	1,0	47,8	3,7	6,6	1,6	
QD _{zielone} -C-2028	144	42,5	8,8	4,3	1,0	44,5	7,2	8,1	2,3	
	24	90,5	2,0	3,2	0,8	4,8	1,6	1,57	0,49	
	72	78,3	3,3	4,4	1,6	14,0	2,6	3,20	0,82	
QD _{czerwone} -C-2028	144	70,70	0,75	3,30	0,46	21,8	1,3	4,23	0,65	
	24	91,6	2,6	2,5	1,4	4,0	1,2	1,9	1,0	
	72	86,9	5,1	3,0	1,6	8,0	3,1	2,13	0,55	
C-2045	144	84,5	1,9	2,63	0,67	10,4	1,5	2,5	1,3	
	24	74,2	4,3	12,1	4,2	10,97	0,90	2,7	1,8	
	72	42,4	6,7	5,4	1,7	45,4	8,5	6,8	2,0	
QD _{zielone} -C-2045	144	45,0	8,5	5,8	4,1	40,7	3,9	8,57	0,65	
	24	77,5	5,3	12,4	4,1	7,7	1,1	2,37	0,91	
	72	38,4	7,0	5,9	1,5	49,4	4,5	6,2	3,8	
QD _{czerwone} -C-2045	144	42,1	5,9	3,9	1,1	45,3	4,8	8,6	2,1	
	24	83,3	3,1	7,5	1,7	6,57	0,47	2,6	1,2	
	72	46,5	3,1	6,1	1,7	41,3	4,2	6,0	2,8	
	144	50,2	1,5	4,10	0,78	38,0	1,3	7,7	1,3	

Tabela S10. Zmiany w asymetrii i przepuszczalności błony komórek linii HCT116 po 24, 72 i 144 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ związków w ich wolnej postaci. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (±) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. (A-/PI-) - komórki żywe, (A+/PI-) - komórki wczesnoapoptotyczne, (A+/PI+) - komórki późnoapoptotyczne oraz nekroptotyczne, (A-/PI+) - komórki nekrotyczne

Związek	Kwartyl									
	[h]	A-/PI-		A+/PI-		A+/PI+		A-/PI+		
		średnia	±	średnia	±	średnia	±	średnia	±	
Kontrola	24	92,00	0,79	2,13	0,21	3,67	0,90	2,27	0,83	
	72	91,03	0,45	2,77	0,40	3,83	0,15	2,37	0,51	
	144	90,7	1,8	2,13	0,72	4,4	1,3	2,77	0,60	
QD _{zielone}	24	93,6	1,2	1,57	0,21	3,3	1,0	1,47	0,31	
	72	92,6	1,3	2,20	0,26	3,67	0,55	1,50	0,50	
	144	89,9	1,2	2,43	0,21	4,10	0,66	3,6	2,1	
QD _{czerwone}	24	91,8	2,2	2,10	0,26	4,5	2,2	1,60	0,35	
	72	91,5	1,7	3,00	0,62	3,8	0,7	1,7	1,0	
	144	90,80	0,61	2,43	0,67	4,2	0,5	2,50	0,56	

Związek	Kwartyl								
	[h]	A-/PI-		A+/PI-		A+/PI+		A-/PI+	
		średnia	±	średnia	±	średnia	±	średnia	±
C-2028	24	84,4	3,8	6,30	0,53	7,4	4,4	1,93	0,76
	72	70,2	5,7	8,1	1,9	17,5	6,3	4,2	1,2
	144	54,1	8,5	14,1	3,3	26,8	7,4	5,07	0,55
QD_{zielone}-C-2028	24	90,5	2,7	2,53	0,40	4,8	2,7	2,13	0,76
	72	82,8	2,1	5,3	1,0	7,5	1,7	4,30	0,66
	144	77,13	0,90	7,5	1,1	10,30	0,46	5,1	1,7
QD_{czerwone}-C-2028	24	91,3	1,0	2,20	0,20	4,4	2,0	2,1	1,1
	72	84,8	4,7	5,0	1,6	7,3	3,2	2,87	0,50
	144	78,9	2,8	8,0	2,4	9,2	1,1	3,67	0,81
C-2045	24	86,9	6,3	4,5	1,8	7,0	4,6	1,53	0,29
	72	74,9	7,4	8,6	4,0	12,8	5,0	3,7	1,5
	144	46,5	7,4	14,9	5,8	33,1	3,0	5,53	0,40
QD_{zielone}-C-2045	24	86,4	4,7	3,97	0,87	8,0	4,8	1,6	1,1
	72	80,6	3,3	6,5	1,6	9,5	1,3	3,40	0,44
	144	73,6	5,4	7,1	2,3	13,5	3,3	5,77	0,21
QD_{czerwone}-C-2045	24	89,2	2,2	3,23	0,29	5,8	2,8	1,80	0,30
	72	80,4	4,9	6,0	1,5	10,0	3,3	3,63	0,38
	144	74,2	3,1	7,9	1,3	12,30	0,85	5,5	1,9

Tabela S11. Odsetek komórek linii H460 z niskim mitochondrialnym potencjałem błonowym po 24, 72 i 144 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC₈₀ związków w ich wolnej postaci. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (±) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów

Związek	24 h		72 h		144 h	
	średnia	±	średnia	±	średnia	±
Kontrola	2,77	0,70	2,1	1,1	8,6	2,4
QD_{zielone}	3,47	0,81	2,5	1,1	11,1	1,9
QD_{czerwone}	2,77	0,50	3,1	1,7	7,6	2,1
C-2028	11,6	2,5	41,0	5,4	45,8	3,3
QD_{zielone}-C-2028	5,6	2,4	29,07	0,93	27,8	3,5
QD_{czerwone}-C-2028	5,1	1,8	20,4	4,7	16,7	2,0
C-2045	15,2	3,0	61,4	3,9	43,4	3,1
QD_{zielone}-C-2045	12,3	2,6	47,5	1,6	54,1	5,0
QD_{czerwone}-C-2045	5,73	0,58	51,53	0,93	46,7	4,0

Tabela S12. Odsetek komórek linii HCT116 z niskim mitochondrialnym potencjałem błonowym po 24, 72 i 144 h inkubacji z QDs, C-2028, C-2045 oraz koniugatami C-2028/C-2045 z QDs w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} związków w ich wolnej postaci. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów

Związek	24 h		72 h		144 h	
	średnia	\pm	średnia	\pm	średnia	\pm
Kontrola	1,63	0,61	3,2	1,2	7,4	1,2
QD_{zielone}	2,07	0,84	2,87	0,80	10,7	2,8
QD_{czerwone}	3,1	1,1	5,6	1,9	9,30	0,70
C-2028	7,27	0,67	40,7	2,4	55,3	2,9
QD_{zielone}-C-2028	4,6	1,8	17,37	0,91	36,2	2,6
QD_{czerwone}-C-2028	4,6	1,5	23,6	4,3	33,4	1,1
C-2045	6,7	2,7	30,7	2,3	39,3	3,5
QD_{zielone}-C-2045	7,4	2,9	30,1	3,4	53,2	2,2
QD_{czerwone}-C-2045	4,93	0,71	23,0	2,0	44,0	5,2

Tabela S13. Zmiany w procentowej ilości starzejących się komórek nowotworowych linii H460 i HCT116 z aktywną SA- β -galaktozydazą: w komórkach kontrolnych (nieotraktowanych związkiem) oraz poddanych ekspozycji: C-2028 i C-2045 i koniugatami tych związków z QDs po 72, 120 i 144 h inkubacji, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (C-2028/C-2045 w ich wolnej postaci). Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. Śred. – średnia

Związek	H460						HCT116					
	72 h		120 h		144 h		72 h		120 h		144 h	
	śred.	\pm	śred.	\pm	śred.	\pm	śred.	\pm	śred.	\pm	śred.	\pm
Kontrola	0,03	0,11	0,11	0,19	0,28	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
QD_{zielone}	-	-	-	-	0,35	0,41	-	-	-	-	0,12	0,22
QD_{czerwone}	-	-	-	-	0,13	0,18	-	-	-	-	0,18	0,44
C-2028	1,23	0,62	19,7	8,7	65,4	5,3	0,10	0,19	1,62	1,33	1,12	1,48
QD_{zielone}-C-2028	2,2	1,1	29,8	2,5	80,2	1,0	0,09	0,24	1,60	0,61	1,07	0,69
QD_{czerwone}-C-2028	1,29	0,60	23,3	4,4	77,4	3,8	0,14	0,22	1,21	0,49	0,86	0,42
C-2045	2,3	1,0	18,8	6,2	59,7	6,7	0,15	0,31	0,52	0,46	0,52	0,38
QD_{zielone}-C-2045	4,1	2,0	24,2	7,2	67,1	6,9	0,00	0,00	1,87	0,50	1,56	0,64
QD_{czerwone}-C-2045	6,4	2,1	30,1	9,4	67,6	5,4	0,15	0,28	1,72	1,00	0,98	0,75

Tabela S14. Ilość tworzonych kolonii w teście przeżywalności. Komórki linii nowotworowych H460 oraz HCT116 inkubowane były z QDs, UAs oraz ich koniugatami z QDs (QDs-UAs) w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} UAs w ich wolnej postaci przez 24, 72 oraz 144 h, a następnie poddane 14-dniowej postinkubacji. Przedstawione wyniki wraz z odchyleniami standardowymi (\pm) są średnią z trzech niezależnych eksperymentów i nie uwzględniają tzw. „kolonii satelitarnych”. Śred. - średnia

Związek	H460						HCT116					
	24 h		72 h		144 h		24 h		72 h		144 h	
	śred.	\pm	śred.	\pm	śred.	\pm	śred.	\pm	śred.	\pm	śred.	\pm
Kontrola	216	17	210	25	232	25	140	20	150	23	160	32
QD_{zielone}	174	8	218	47	207	4	157	39	163	35	153	1
QD_{czerwone}	157	10	222	48	225	53	152	25	170	21	163	18
C-2028	100	37	71	11	124	12	1	2	3	2	5	2
QD_{zielone}-C-2028	54	26	62	11	97	35	1	1	2	2	6	3
QD_{czerwone}-C-2028	8	4	12	4	48	14	1	1	0	1	1	1
C-2045	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QD_{zielone}-C-2045	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
QD_{czerwone}-C-2045	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0