

Badanie internalizacji cząsteczek chemicznych i biologicznych do wnętrza żywych komórek

Aneta Magiera

Rozprawa doktorska zrealizowana pod opieką promotora

prof. dr hab. Roberta Hołysta

oraz promotora pomocniczego

dr inż. Kariny Kwapiszewskiej

w ramach

Warszawskiej Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i BioMedycznych

w

Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk

ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawie



Warszawa, wrzesień 2025

Podziękowania

Niniejsza rozprawa doktorska jest nie tylko efektem mojej pracy, lecz przede wszystkim wspólną drogą, na którą miałam zaszczyt wkroczyć dzięki niezwykłym ludziom. Bez ich obecności, mądrości i wsparcia nie byłabym dziś w tym miejscu.

Na szczególne podziękowania zasługuje **prof. dr hab. Robert Hołyst** – Nauczyciel, Mistrz i Przewodnik. Jego drzwi były zawsze otwarte, a gotowość do dzielenia się wiedzą, cierpliwe wsparcie i trafne wskazówki towarzyszyły mi na każdym etapie tej drogi. Dziękuję za zaufanie, inspirację i nieocenioną obecność.

Z całego serca dziękuję **dr inż. Karinie Kwapiszewskiej** – osobie, na którą zawsze mogłam liczyć. Niezwykle życzliwa, dostępna i wspierająca nie tylko naukowo, ale i na płaszczyźnie ludzkiej – z empatią i troską, które dodawały otuchy w trudnych chwilach.

Wyrazy głębokiej wdzięczności kieruję także do **mgr Patrycji Kuźmy** – nieocenionej towarzyszkii codziennych zmagani. Jej motywacja, serdeczność, gotowość do pomocy i empatia były dla mnie nieustającym źródłem siły.

Dziękuję również **dr inż. Agnieszce Wiśniewskiej** za rozmowy, dobre rady i wsparcie, które wielokrotnie okazywały się bezcenne.

Szczególne miejsce w mojej pamięci zajmuje również **mgr inż. Alicja Zgorzelska** – razem rozpoczęłyśmy tę wyjątkową podróż, jaką były studia doktoranckie. To wspólne doświadczenie na zawsze pozostanie w moim sercu.

Nie sposób nie wspomnieć o całym **Zespole 10** – to właśnie Wy tworzycie tę niezwykłą, inspirującą społeczność, której częścią miałam zaszczyt być. Dziękuję za atmosferę współpracy, wzajemnego zaufania i serdeczności, która uczyniła ten etap mojego życia tak wyjątkowym.

I wreszcie – z najgłębszym wzruszeniem – dziękuję **mojej rodzinie**. To Wy przeżywaliście ze mną tę drogę na co dzień, po pracy, po godzinach. Wspieraliście mnie w ciszy i w zmęczeniu, byliście obok, gdy potrzebowałam równowagi. Wasza obecność była moją siłą. Dziękuję za wszystko.

Niniejsza rozprawa doktorska
została dofinansowana z Projektu
LIDER/10/0033/L-9/17/NCBR/2018
Narodowego Centrum Badań i Rozwoju
(Kierownik Projektu: dr inż. Karina Kwapiszewska)



Wykaz publikacji naukowych

Powiązane z rozprawą doktorską:

1. **Magiera, A.**, Kucharska, K., Kalwarczyk, T., Haniewicz, P., Kwapiszewska, K., & Hołyst, R. Measurement of large ribosomal subunit size in cytoplasm and nucleus of living human cells. *Nanoscale Horizons*, 2025, 10, 388 – 400. <https://doi.org/10.1039/D4NH00214H>
IF (2024) = 8,0
2. Braniewska, A., Sas, Z., Skórzyński, M., Długolecka, M., Marszałek, I., Bühler, M., Strzemecki, D., **Magiera, A.**, Walczak, J., Komorowski, M., Weiss, T., Czystowska-Kuźmich, M., Kwapiszewska, K., Boffi, A., Król M., & Rygiel, T. R. A novel process for transcellular hemoglobin transport from macrophages to cancer cells. *Cell Communication and Signaling*, 2024, 22, 570. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01929-8>
IF (2023) = 8,2
3. **Karpinska, A.**, Magiera, G., Kwapiszewska, K., & Hołyst, R. Cellular Uptake of Bevacizumab in Cervical and Breast Cancer Cells Revealed by Single-Molecule Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2023, 14(5), 1272-1278. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.2c03590>
IF (2022) = 6,888
4. **Karpinska, A.**, Zgorzelska, A., Kwapiszewska, K., & Hołyst, R. Entanglement of polymer chains in hypertonic medium enhances the delivery of DNA and other biomacromolecules into cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, 627, 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.07.040>
IF (2022) = 9,965; praca wyróżniona okładką czasopisma
5. Karpinska, A., Pilz, M., Buczkowska, J., Żuk, P. J., Kucharska, K., Magiera, G., Kwapiszewska, K., & Hołyst, R. Quantitative analysis of biochemical processes in living cells at a single-molecule level: A case of olaparib-PARP1 (DNA repair protein) interactions. *Analyst*, 2021, 146(23), 7131–7143. <https://doi.org/10.1039/d1an01769a>
IF (2021) = 5,227; praca wyróżniona okładką czasopisma
6. Kleczewska, N., Sikorski, P. J., Warminska, Z., Markiewicz, L., Kasprzyk, R., Baran, N., Kwapiszewska, K., Karpinska, A., Michalski, J., Hołyst, R., Kowalska, J., & Jemielity, J. Cellular delivery of dinucleotides by conjugation with small molecules: targeting translation initiation for anticancer applications. *Chemical Science*, 2021, 12(30), 10242–10251. <https://doi.org/10.1039/d1sc02143e>
IF (2021) = 9,969

Pozostałe:

1. Zgorzelska, A., **Magiera, A.**, Pilz, M., Kwapiszewska, K., & Hołyst, R. Changes of nanoviscosity during TRAIL-induced apoptosis of HeLa cells. *Cell Reports Physical Science*, 2025, accepted
IF (2025) = 7,3
2. Wdowiak, M., **Magiera, A.**, Tomczyńska, M., Adamkiewicz, W., Stellacci, F., Paczesny, J. Protecting bacteriophages under UV irradiation with brilliant blue FCF for targeted bacterial control, *Biofilm*, 2025, 9, 100286.
<https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2025.100286>
IF (2025) = 4,9
3. Orzeł-Gajowik, K., Milewski, K., Obara-Michlewska, M., Ellert-Miklaszewska, A., **Magiera, A.**, Kwapiszewska, K., Zielińska, M. Unraveling Ammonia-Induced Brain Endothelial Senescence: Role of miRNA-183-5p, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2025, <https://doi.org/10.1089/ars.2024.0784>
IF (2025) = 6,1
4. Raza, S., Bończak, B., Atamas, N., **Karpińska, A.**, Ratajczyk, T., Łoś, M., Hołyst, R., Paczesny, J. The activity of indigo carmine against bacteriophages: an edible antiphage agent, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2025, 109, 24.
<https://doi.org/10.1007/s00253-025-13414-4>
IF (2025) = 3,9
5. Sitkiewicz, I., Borek, A., Gryko, M., **Karpińska A.**, Kosińska, A., Obszańska, K., Wilemska-Dziaduszycka, J., Walory, J., Bańska, A., Belkiewicz, K., Foryś, M., Gołębiewska, A., Hryniewicz, W., Kadłubowski, M., Kiedrowska, M., Klarowicz, A., Matynia, B., Ronkiewicz, P., Szczypa, K., Waśko, J., Wawszczak, M., Wróbel-Pawelczyk, I., Zieniuk, B. Epidemiology of Streptococcus pyogenes upper respiratory tract infections in Poland (2003–2017), *Journal of Applied Genetics*, 2024, 65(3):635-644. <https://doi.org/10.1007/s13353-024-00875-y>
IF (2023) = 2,0
6. Michalski, J., Kalwarczyk, T., Kwapiszewska, K., Enderlein, J., Poniewierski, A., **Karpińska, A.**, Kucharska, K., & Hołyst, R. Rotational and translational diffusion of biomolecules in complex liquids and HeLa cells. *Soft Matter*, 2024, 20, 5810-5821.
<https://doi.org/10.1039/D4SM00422A>
IF (2023) = 2,9
7. Atamas, N., Raza, S., Paczesny, J., **Karpińska, A.**, Yablochkova, K.S., Lazarenko, M.M. Competition between indigo carmine and water in the formation of dynamics behavior at different temperatures. *Dyes and Pigments*, 2024, 226, 112146.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2024.112146>
IF (2023) = 4,5

8. Yasmeen, N., **Karpinska, A.**, Kalecki, J., Kutner, W., Kwapiszewska, K., & Sharma, P. S. Electrochemically Synthesized Polyacrylamide Gel and Core-Shell Nanoparticles for 3D Cell Culture Formation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(29), 32836–32844. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c04904>
IF (2022) = 10,383

Patenty

Patent Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej Nr 242705 (data zgłoszenia: 17.03.2021)
na wynalazek:

„Roztwór hipertoniczny do wprowadzania do komórek makromolekuł oraz sposób wprowadzania makromolekuł do komórek ssących w hodowli in vitro”

Streszczenie

Wnikanie dowolnej cząsteczki do wnętrza ludzkich komórek, określane mianem internalizacji, zależy od właściwości tej molekuly, jak rozmiar, hydrofobowość, czy ładunek elektryczny. Rozważając cząsteczkę o znaczeniu terapeutycznym, a więc istniejący lub obiecujący lek, jej internalizacja może być procesem pożądanym lub nie. Decyduje o tym jej mechanizm działania – są molekuly, które ulegają związaniu z białkiem znajdującym się wewnątrz komórki. Inne z kolei oddziałują z ligandem występującym zewnątrzkomórkowo. Zatem te dwa przykłady to odpowiednio internalizacja pożądana oraz nie. Proces wnikania leku do komórki jest szczególnie istotny w ujęciu prężnie rozwijanych i testowanych obecnie terapii celowanych. Ich zadaniem jest ograniczenie skutków ubocznych standardowych metod leczenia nowotworów poprzez skierowanie leku precyzyjnie na wybrany element komórki nowotworowej. Zatem określenie, czy i w jakim stopniu cząsteczka o potencjale terapeutycznym wnika do komórek wydaje się etapem początkowym jej testowania w ujęciu klinicznym.

W niniejszej pracy przeprowadzono ocenę internalizacji różnych cząsteczek biologicznych i chemicznych (w tym leków, dinukleotydów, białek i wybranego barwnika) do wnętrza żywych, pojedynczych komórek nowotworowych. Jako podstawową metodę badawczą zastosowano spektroskopię korelacji fluorescencji. Precyzyjna, ilościowa analiza była możliwa poprzez wykorzystanie modelu nanolepkości wnętrza komórek zależnego od skali długości. Jako technikę towarzyszącą, jakościową, stosowano obrazowanie konfokalne/FLIM. Uzyskane wyniki wykazały, że przyjęte podejście badawcze pozwala określić, co dzieje się z wyznakowaną fluorescencyjnie cząsteczką wewnątrzkomórkowo oraz jakim interakcjom ta molekula ulega.

Na przykładzie leku olaparib udowodniono, że stopień wnikania tego związku do komórek nowotworowych zależy od ilości jego celu molekularnego – białka PARP1. Technikę FCS zastosowano także do monitorowania procesu endocytozy leku bewacizumab. Jak wykazano, ten działający zewnątrzkomórkowo związek jest pobierany przez komórki na drodze endocytozy konstytutywnej, ale nie jest uwalniany wewnątrzkomórkowo z endosomów do cytoplazmy. Zbadano także, czy wybrane terapeutyczne dinukleotydy wnikają do komórek i są w nich obecne w formie swobodnie dyfundującej oraz określono, jakie formy oligomeryczne białek ferrytyny i hemoglobiny dominują wewnątrz komórek. Przeprowadzone badania pozwoliły także ustalić, że barwnik YO-PRO-1 selektywnie wybarwia cząsteczki tRNA i rRNA w żywych komórkach. Z kolei na przykładzie białka PRMT1 wykazano użyteczność techniki FCS do oceny dystrybucji związku między kompartmentami komórkowymi.

Na koniec, zbadano zastosowanie różnic ciśnienia osmotycznego do dostarczania do ludzkich komórek związków, które nie są przez nie samodzielnie pobierane. Wykazano, że użycie polimeru w reżimie splątania łańcuchów polimerowych jest parametrem decydującym o powodzeniu całego procesu. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano mechanizm wprowadzania cząsteczek do ludzkich komórek szokiem osmotycznym.

Abstract

The penetration of any molecule into human cells, known as internalization, depends on the properties of that molecule, such as size, hydrophobicity, or electrical charge. When considering a molecule of therapeutic importance, an existing or promising drug, its internalization may or may not be a desirable process. Its mechanism of action determines this - some molecules bind to a protein inside the cell. Others, in turn, interact with a ligand found extracellularly. So, these two examples are desirable internalization and non-internalization, respectively. The phenomenon of drug penetration into the cell is particularly relevant in terms of the vigorously developed and tested targeted therapies. Such approaches are designed to reduce the side effects of standard cancer treatments by targeting the drug precisely to a selected element of the cancer cell. Thus, determining whether and to what extent a molecule with therapeutic potential penetrates cells appears to be the initial step in its testing in clinical applications.

In the present study, the internalization of various biological and chemical molecules (including drugs, dinucleotides, proteins, and a selected dye) into the interior of living, single cancer cells was evaluated. Fluorescence correlation spectroscopy was utilized as the primary research method. Precise, quantitative analysis was possible through the application of a length-scale-dependent nanoviscosity model of the cell interior. As a companion qualitative technique, confocal/FLIM imaging was used. The results showed that the adopted research approach makes it possible to determine what happens to a fluorescently labeled molecule intracellularly and what interactions this molecule undergoes.

Using the olaparib drug as an example, it was shown that the degree of penetration of this compound into cancer cells depends on the amount of its molecular target, the PARP1 protein. The FCS technique was also used to monitor the endocytosis process of the bevacizumab drug. As shown, this extracellularly acting compound is taken up by cells through constitutive endocytosis. However, it is not released intracellularly from endosomes into the cytoplasm. It was also investigated whether selected therapeutic dinucleotides enter cells and are present in cells in a freely diffusing form. In turn, for ferritin and hemoglobin proteins, it was determined which oligomeric forms predominate inside cells. The studies also established that the YO-PRO-1 dye selectively stains tRNA and rRNA molecules in living cells. The example of the PRMT1 protein confirmed the applicability of the FCS technique for evaluating the intracellular distribution of a compound across different cellular compartments

Finally, the application of osmotic pressure changes to deliver various compounds (that are not spontaneously taken up by cells) to human cells was investigated. It was shown that the use of polymer in the regime of entanglement of polymer chains is a parameter that determines the success of the whole process. Based on the obtained results, a mechanism for introducing molecules into human cells by osmotic shock was proposed.

Zastosowane skróty

IARC – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem, z ang. *International Agency for Research on Cancer*

FDA – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków, z ang. *Food and Drug Administration*

HER-2 – receptor ludzkiego czynnika naskórkowego wzrostu 2, z ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*

PARP – polimeraza poli (ADP-rybozy), z ang. *Poly (ADP-Ribose) Polymerase*

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej, z ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*

PD-1/PD-L1 – programowana śmierć-1/ligand programowanej śmierci-1, z ang. *Programmed Death-1/ Programmed Death – Ligand 1*

EGFR – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu, z ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*

ATCC – z ang. *American Type Culture Collection*

FCS – Spektroskopia Korelacji Fluorescencji, z ang. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*

FLIM – obrazowanie czasu życia fluorescencji, z ang. *Fluorescence Lifetime Imaging*

TRITC – izotiocyanian tetrametylorodaminy

Ft-568 – ferrytyna znakowana barwnikiem Alexa Fluor 568

Hb-568 – hemoglobina znakowana barwnikiem Alexa Fluor 568

PBS – roztwór soli fizjologicznej

FBS – płodowa surowica bydlęca, z ang. *Fetal Bovine Serum*

GFP – białko zielonej fluorescencji, z ang. *Green Fluorescent Protein*

EGFP – białko wzmocnionej zielonej fluorescencji, z ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*

DMSO – dimetylosulfotlenek

TRIS – 2-amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diol

DMEM – z ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

SPAD – z ang. *Single-Photon Avalanche Diodes*

MB – jasność molekularna, z ang. *Molecular Brightness*

IC₅₀ – stężenie, przy którym badany związek hamuje określoną reakcję biologiczną lub biochemiczną o połowę

ROI – obszar analizy, z ang. *Region Of Interest*

ER – retikulum endoplazmatyczne, z ang. *Endoplasmatic Reticulum*

ssDNA – jednoniciowe DNA

LSU – duża podjednostka rybosomalna 60S, z ang. *Large SubUnit*

SSU – mała podjednostka rybosomalna 40S, z ang. *Small SubUnit*

Spis treści

Wykaz publikacji naukowych	7
Patenty	9
Streszczenie	11
Abstract	13
Zastosowane skróty	15
1. Wstęp literaturowy	20
1.1. Przeciwnowotworowe terapie celowane.....	20
1.2. Nowotwory piersi i celowane metody ich leczenia	21
<i>Rak piersi jako najczęstszy nowotwór u kobiet</i>	21
<i>Potrójnie ujemny nowotwór piersi</i>	21
<i>Terapie celowane stosowane w leczeniu raka piersi</i>	22
<i>Olaparib – inhibitor PARP1</i>	23
1.3. Celowane terapie leczenia nowotworu szyjki macicy	25
<i>Problematyka nowotworu szyjki macicy</i>	25
<i>Celowane leczenie raka szyjki macicy</i>	26
<i>Bewacizumab – inhibitor VEGF</i>	26
<i>Inhibitory EGFR</i>	27
1.4. Znaczenie procesu internalizacji leków celowanych.....	28
1.5. Standardowe metody badania wnikania cząsteczek do wnętrza komórek	29
<i>Obrazowanie fluorescencyjne</i>	29
<i>Cytometria przepływowa</i>	31
1.6. Spektroskopia Korelacji Fluorescencji	33
<i>Zjawisko fluorescencji</i>	33
<i>Zjawisko dyfuzji</i>	34
<i>Układ optyczny FCS</i>	35
<i>Zasada działania FCS</i>	36
<i>FCS we wnętrzu żywych komórek</i>	37
<i>Nanolepkość komórek jako parameter krytyczny w ilościowej analizie wyników FCS</i>	39
1.7. Metody dostarczania cząsteczek do komórek	42
<i>Dostarczanie wewnątrzkomórkowe z zastosowaniem różnic ciśnienia osmotycznego</i>	45
1.8. Podsumowanie wstępu literaturowego	46
2. Materiały i metody	48
<i>Odczynniki</i>	48

<i>Materiał biologiczny</i>	50
<i>Aparatura badawcza</i>	51
<i>Procedury przeprowadzone w buforach (in vitro)</i>	52
<i>Procedury przeprowadzone na żywych komórkach (in vivo)</i>	55
<i>Analiza danych</i>	57
3. Wyniki, ich dyskusje i podsumowania	61
3.1. Nanolepkość cytoplazmy komórek linii potrójnie ujemnego raka piersi MDA-MB-231	61
<i>Próbkowanie cytoplazmy komórek MDA-MB-231</i>	62
<i>Podsumowanie</i>	64
3.2. Interakcje wewnątrzkomórkowe leku o nazwie olaparib z białkiem PARP1 we wnętrzu żywych komórek nowotworowych	64
<i>Olaparib wnika do wnętrza żywych komórek nowotworowych</i>	65
<i>Współczynnik podziału jako miara efektywności wnikania olaparibu</i>	67
<i>Cytotoksyczność fluorescencyjnego olaparibu</i>	69
<i>Ilościowe pomiary FCS jako narzędzie do określenia losów olaparibu wewnątrz komórek</i>	71
<i>Podsumowanie badań nad wnikaniem olaparibu do wnętrza komórek nowotworowych</i>	79
3.3. Wnikanie na drodze endocytozy na przykładzie leku o nazwie bewacizumab	81
<i>Jakościowa ocena internalizacji bewacizumabu do żywych komórek</i>	82
<i>Współczynnik podziału dla internalizacji bewacizumabu do komórek nowotworowych</i>	85
<i>Znakowany bewacizumab wykazuje cytotoksyczność względem komórek HeLa</i>	87
<i>Wielkość bewacizumabu oraz jego wiązanie z VEGF – warunki in vitro</i>	89
<i>Pomiary FCS bezpośrednio wewnątrz żywych komórek jako ilościowa metoda charakterystyki internalizacji bewacizumabu</i>	91
<i>Podsumowanie badań nad internalizacją bewacizumabu do wnętrza komórek nowotworowych</i>	97
3.4. Wnikanie terapeutycznych dinukleotydów do komórek nowotworowych	98
<i>Terapeutyczne dinukleotydy wnikają do komórek potrójnie ujemnego raka piersi</i>	99
<i>Ilościowe pomiary FCS w warunkach in vitro i in vivo</i>	100
<i>Podsumowanie wnikania terapeutycznych dinukleotydów do komórek nowotworowych</i>	102
3.5. Wnikanie białek terapeutycznych i ich stopień oligomeryzacji: ferrytyna i hemoglobina	103
<i>Forma oligomeryczna ferrytyny dominująca w komórkach nowotworowych</i>	104
<i>Forma oligomeryczna hemoglobiny dominująca w komórkach nowotworowych</i>	107

<i>Podsumowanie oligomeryzacji ferrytyny i hemoglobiny po transferze z makrofagów do komórek nowotworowych.....</i>	111
3.6. Inne przykłady zastosowania techniki FCS do badania losów cząsteczek lub/i ich wnikania do ludzkich, żywych, komórek: barwnik YO-PRO-1 i białko PRMT1.....	112
<i>Barwnik YO-PRO-1 wnika do żywych komórek nowotworowych</i>	114
<i>Ilościowe badania FCS wnikania YO-PRO-1 do komórek nowotworowych.....</i>	115
<i>Zwiększona frakcja tRNA w komórkach poddanych działaniu rapamycyny</i>	117
<i>Podsumowanie badań wnikania barwnika YO-PRO-1</i>	118
<i>Obrazowanie konfokalne komórek zawierających białko PRMT1</i>	119
<i>Przewidywana mobilność oligomerów PRMT1</i>	120
<i>Ilościowe pomiary FCS białka PRMT1 we wnętrzu żywych komórek</i>	121
<i>Dystrybucja PRMT1 między jądrem komórkowym a cytoplazmą.....</i>	121
<i>Podsumowanie ilościowych pomiarów białka PRMT1.....</i>	122
3.7. Reżim splątania łańcuchów polimeru jako kluczowy parametr powodzenia dostarczania wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem szoku osmotycznego	123
<i>Nieskuteczne połączenie PEG 1 kDa z sacharozą – wariant 1.....</i>	123
<i>Zamiana PEG 1 kDa na dekstran 70 kDa – wariant 2.</i>	124
<i>Sacharoza nie decyduje o powodzeniu dostarczania wewnątrzkomórkowego – wariant 3. i 4.</i>	125
<i>Reżim splątania łańcuchów polimerowych jako parametr krytyczny dla dostarczania wewnątrzkomórkowego</i>	126
<i>Sugerowany mechanizm wnikania cząsteczek do ludzkich komórek szokiem osmotycznym</i>	130
<i>Podsumowanie dostarczania wewnątrzkomórkowego szokiem osmotycznym.....</i>	131
4. Końcowe wnioski.....	132
5. Podsumowanie	134
6. Bibliografia	136

1. Wstęp literaturowy

Choroby nowotworowe to druga najczęstsza przyczyna śmierci na całym świecie. Chemioterapia, polegająca na podawaniu leków cytostatycznych, wciąż pozostaje najczęściej stosowaną metodą ich leczenia. Ze względu na ogólnoustrojowe działanie tych leków, jedną z najpoważniejszych wad tego podejścia terapeutycznego jest szeroki zakres skutków ubocznych. Jako bezpieczniejsza alternatywa chemioterapii, prężnie rozwijane są terapie celowane, skierowane na konkretny cel molekularny/szlak sygnałowy komórki nowotworowej. W reżimie terapii celowanych parametrem kluczowym jest internalizacja – wnikanie cząsteczki o potencjale terapeutycznym do wnętrza ludzkich komórek. W zależności od typu molekuly, internalizacja może być pożądana lub nie. Określenie stopnia internalizacji lub jej braku na etapie badań laboratoryjnych jest kluczowe w celu wczesnego określenia potencjału terapeutycznego badanego leku. Istnieją różne techniki pozwalające monitorować wnikanie cząsteczek do ludzkich komórek. Jedną z nich jest Spektroskopia Korelacji Fluorescencji (FCS), stanowiąca podstawową metodykę badawczą niniejszej rozprawy. W tym rozdziale szczegółowo omówiono problematykę nowotworów kobiecych, skupiając się na obiecujących terapiach celowanych skierowanych przeciwko dwóm typom chorób: potrójnie ujemnym raku piersi i raku szyjki macicy. Opisano także wybrane techniki badawcze stosowane do oceny wnikania związków do wnętrza ludzkich komórek. Na koniec omówiono zastosowanie szoku osmotycznego jako jeden ze sposobów wprowadzenia do komórek cząsteczek, które nie są przez nie samodzielnie pobierane.

1.1. Przeciwnowotworowe terapie celowane

Tylko w 2022 roku odnotowano niemal 20 milionów nowych przypadków nowotworów, w tym około połowa to przypadki śmiertelne.¹ Szacuje się, że, zarówno wśród kobiet jak i mężczyzn, jedna osoba na pięć zachoruje na raka w ciągu życia. Co więcej, średnio jeden na dziewięciu mężczyzn i jedna na dwanaście kobiet z tego powodu umiera.¹ Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IACR), pomiędzy latami 2012 i 2022 liczba nowych zachorowań na nowotwory wzrosła o 50%, a liczba zgonów o około 18%.

Schematy postępowania w leczeniu nowotworów są bardzo zróżnicowane i zależą między innymi od typu choroby, indywidualnej sytuacji pacjenta czy zaawansowania nowotworu. Jednak wciąż jedną z najczęściej stosowanych metod jest chemioterapia, często w połączeniu z chirurgią czy radioterapią. Najpoważniejszą wadą tego podejścia jest brak selektywności. Leki cytostatyczne podawane pacjentom ogólnoustrojowo niszczą nie tylko komórki nowotworowe, ale także zdrowe. To z kolei powoduje szereg działań niepożądanych, od nudności i wymiotów, po zaburzenia neurologiczne, kończąc na trwałych uszkodzeniach narządów takich jak wątroba, serce czy nerki. Zatem chemioterapia wywołuje w różnym stopniu pogorszenie jakości życia pacjenta, a jej skutki uboczne bywają niekiedy przyczyną rezygnacji z tego rozwiązania.

W perspektywie szeregu wag chemioterapii, coraz prężniej rozwijane i badane są terapie celowane. Ich zasada działania polega na zastosowaniu leku, cząsteczki terapeutycznej,

skierowanej na konkretny cel molekularny w komórce nowotworowej, jak białka, receptory czy szlaki sygnałowe. Takie rozwiązanie pozwala osiągnąć zamierzone efekty leczenia przy jednoczesnym zminimalizowaniu skutków ubocznych i negatywnego wpływu leku na zdrowe komórki. W poniższych rozdziałach szczegółowo omówiono konkretne, wybrane przykłady terapii celowanych stosowane do leczenia badanych w niniejszej pracy doktorskiej typów nowotworów.

1.2. Nowotwory piersi i celowane metody ich leczenia

Zarówno w ujęciu zachorowań jak i zgonów, w 2022 roku najczęstszym nowotworem u kobiet był rak piersi, stanowiąc 6,9% wszystkich zgonów wywołanych przez nowotwory.¹ Warto podkreślić, że blisko połowa sierot na całym świecie jest wynikiem śmierci matki z powodu dwóch nowotworów: raka piersi lub raka szyjki macicy.² Wśród najpopularniejszych i najbardziej obiecujących terapii celowanych skierowanych przeciwko nowotworom piersi znajdują się inhibitory polimerazy poli (ADP-rybozy) (PARP), przeciwciała anti-Trop-2 oraz inhibitory programowanej śmierci-1 oraz liganda programowanej śmierci-1 (PD-1/PD-L1). Poniżej szczegółowo przedstawiono charakterystykę nowotworu piersi oraz stosowane terapie celowane.

Rak piersi jako najczęstszy nowotwór u kobiet

Według Światowej Organizacji Zdrowia (13 marca 2024), w 2022 roku globalnie odnotowano 2,3 miliona zachorowań na raka piersi, w tym 670 tysięcy osób z powodu tej jednostki chorobowej zmarło. 99% przypadków nowotworu piersi dotyczy kobiet. Najczęściej rozpoczyna się on w przewodach mlekowych lub zrazikach piersi. Jeśli komórki nowotworowe występują tylko w tych obszarach i nie naciekają błony podstawnej, mówimy wtedy o raku przewodowym lub zrazikowym *in situ* (nieinwazyjnym). Jeśli natomiast zmiany nowotworowe obejmują węzły chłonne i inne tkanki rak jest rakiem przerzutowym. Jak podaje IARC oraz Komisja Europejska, czynnikami ryzyka nowotworu piersi są między innymi wiek (ryzyko wzrasta po 40. roku życia), wywiad rodzinny, mutacje genetyczne (jak BRCA-1, BRCA-2), czy nadużywanie alkoholu. Warto podkreślić oraz pamiętać, że wczesne etapy raka piersi przebiegają często bezobjawowo, dlatego do rozpoznania i wczesnego wykrycia tego nowotworu kluczowe są badania przesiewowe.

Potrójnie ujemny nowotwór piersi

Jednym z typów nowotworów piersi, stanowiącym duże wyzwanie onkologiczne z uwagi na agresywną charakterystykę, ograniczone możliwości terapeutyczne i gorsze, w porównaniu z innymi rodzajami tego nowotworu, rokowania, jest potrójnie ujemny rak piersi. Określenie „potrójnie ujemny” wynika z braku ekspresji trzech receptorów: estrogenowego, progesteronowego oraz ludzkiego czynnika naskórkowego wzrostu 2 (HER-2).^{3,4} Brak obecności tych receptorów w komórkach nowotworowych implikuje brak odpowiedzi tego typu nowotworu na powszechnie stosowane terapie hormonalne. Potrójnie ujemny rak piersi stanowi około 15-20% wszystkich diagnozowanych chorób nowotworowych piersi.⁵ Rak ten stanowi heterogeniczną grupę guzów o różnych cechach molekularnych oraz zachowaniach

klinicznych, ze specyficznymi mechanizmami ucieczki immunologicznej.⁶ Warto zaznaczyć, że jego częstość występowania jest większa wśród młodych kobiet, Afroamerykanek oraz kobiet posiadających mutację BRCA-1.^{7,8} Inwazyjność tego nowotworu cechuje większe prawdopodobieństwo przerzutów do dalekich organów. To z kolei znajduje przełożenie na gorsze rokowania.⁹ Co więcej, jednym z wyznań dotyczących opisywanego raka jest jego odróżnienie od innych typów nowotworów piersi.¹⁰

Stosowana w niniejszej rozprawie doktorskiej, dostępna komercyjnie, linia komórkowa MDA-MB-231 została wyizolowana z płynu opłucnowego pacjentki z przerzutowym gruczolakorakiem piersi (American Type Culture Collection, ATCC). To komórki adherentne, wrzecionowate, epitelialne, z cechami przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, co implikuje ich wysoką inwazyjność. Ta linia komórkowa jest szeroko stosowana w badaniach nad migracją komórek nowotworowych do innych tkanek, czy testowaniu nowych terapii leczenia potrójnie ujemnego raka piersi, w tym oceny skuteczności podejść terapeutycznych w modelach 2D oraz 3D.

Terapie celowane stosowane w leczeniu raka piersi

Schemat leczenia raka piersi zmienił się w ostatnich latach z uwagi na lepsze zrozumienie złożonych podłoży molekularnych i genetycznych tej choroby.¹¹ Terapie celowane stały się potężnym narzędziem w walce z tym nowotworem, kreując medycynę precyzyjną i gwarantując lepsze wyniki leczenia pacjentów. Stosowane terapie celowane różnią się w zależności od typu tego nowotworu. Obecnie wyróżnia się trzy duże kategorie oparte na profilu guza: rak piersi z dodatnim receptorem hormonalnym (estrogenowym, progesteronowym), rak piersi z dodatnim receptorem HER-2; potrójnie ujemny rak piersi.^{12,13} W niniejszej rozprawie szczegółowej analizie poddano potrójnie ujemny rak piersi. Z uwagi na brak ekspresji każdego z trzech receptorów (HER-2, estrogenowego i progesteronowego), leki, które zmieniły medycynę nowotworów piersi, jak tamoksifen, inhibitory aromatazy czy trastuzumab, nie znajdują zastosowania w potrójnie ujemnym raku piersi.¹⁴ Obecnie, wśród najbardziej obiecujących terapii celowanych względem tego typu nowotworu należy wymienić inhibitory PARP, inhibitory PD-1/PD-L1, a także przeciwciała anti-Trop-2.

Trop-2 jest glikoproteiną transbłonową ulegającą nadekspresji w większości guzów litych.¹⁵ Po aktywacji tego białka, następuje proliferacja komórek, ich migracja, samoodnowa i inwazja. Z uwagi na częstość występowania, Trop-2 stał się tematem leczenia celowanego nie tylko względem potrójnie ujemnego raka piersi, ale także w wielu innych nowotworach, takich jak drobnokomórkowy rak płuc czy rak trzustki.¹⁶ W 2023 roku FDA zatwierdziła lek o nazwie sacituzumab govitecan-hziy, bazujący na inhibicji Trop-2, w połączeniu z inhibitorem topoizomerazy, do leczenia zaawansowanego lub nieoperacyjnego potrójnie ujemnego raka piersi u pacjentów, którzy wcześniej zostali poddawani przynajmniej dwóm lub więcej terapiom systemowym. Sacituzumab govitecan-hziy to przeciwciało anti-Trop2. W połączeniu z inhibitorem topoizomerazy, nie tylko blokuje aktywność glikoproteiny Trop-2, ale także niszczy nici DNA, prowadząc do śmierci komórek nowotworowych.¹⁴

Omawiając obiecujące terapie celowane względem potrójnie ujemnego raka piersi należy także zwrócić uwagę na szlak hamujący PD-1/PD-L1. Podobnie, jak w przypadku Trop-2, wzrost

ekspresji ligandu PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych zwiększa ich inwazyjność. Wiadomo, że aktywacja szlaku PD-1/PD-L1 prowadzi do zmniejszenia aktywności limfocytów T, ich lizy, obniżenia uwalniania cytokin i wzrostu tolerancji względem antygenów.¹⁷ Zatem ucieczka immunologiczna propagowana przez PD-L1 prowadzi do większych rozmiarów guza, jego szybkiego wzrostu, zwiększonej proliferacji komórek nowotworowych i wyższego stopnia zaawansowania nowotworu.¹⁸ Chociaż nadekspresja PD-L1 jest bardziej powszechna w raku piersi z ekspresją receptora estrogenowego oraz HER-2, szacuje się, że występuje ona aż w 20% przypadkach potrójnie ujemnego nowotworu piersi.¹⁴ Ta statystyka sprawiła, że przeciwciała anty-PD-1 i anty-PD-L1, a więc odpowiednio pembrolizumab i atezolizumab, zostały zatwierdzone do leczenia tej choroby.¹³ Niestety, pembrolizumab w stopniu znaczącym zwiększył częstość poważnych skutków ubocznych. Aż 23% pacjentów przerwało terapię z tego powodu.¹⁹

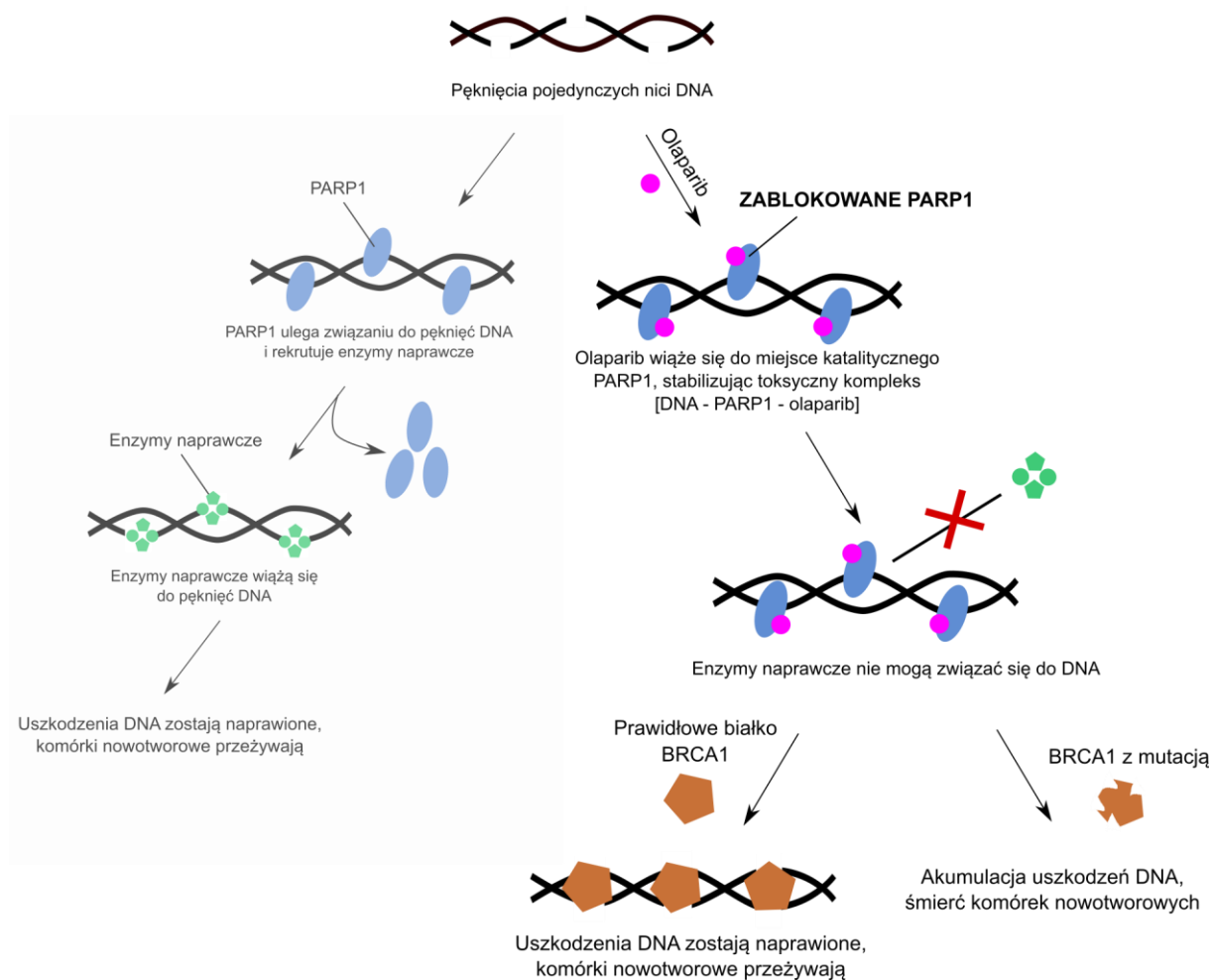
W ujęciu terapii celowanych skierowanych na potrójnie ujemny nowotwór piersi, warto także wspomnieć o inhibitorach czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF). Zastosowanie tego typu związków skutkowało pewnym wzrostem czasu życia pacjentów, ale nie wykazało istotnej różnicy w ogólnym przeżyciu i/lub wynikach długoterminowych.²⁰ Przyczyny odnotowanej, słabej, skuteczności inhibitorów VEGF, pomimo wysokiej ekspresji tego czynnika w komórkach potrójnie ujemnego raka piersi nie są jasne. Ten typ terapii celowanej został szczegółowo opisany w rozdziale dotyczącym leczenia raka szyjki macicy.

Olaparib – inhibitor PARP1

W trakcie omawiania terapii celowanych względem nowotworów piersi należy zwrócić szczególną uwagę na mutacje BRCA-1 i BRCA-2 oraz związane z nimi leczenie inhibitorami PARP. W warunkach fizjologicznych, celem białek BRCA jest naprawa uszkodzonego DNA. Mutacje w obrębie genów BRCA powodują produkcję „wadliwego” białka, niezdolnego do pełnienia swojej funkcji - DNA pozostaje wówczas uszkodzone, ale naprawy w stopniu częściowym są nadal zapewniane przez inne czynniki. To z kolei prowadzi do replikacji uszkodzonego materiału genetycznego, a w konsekwencji do proliferacji komórek nieprawidłowych, nowotworowych. Jednym z takich czynników naprawiających uszkodzenia pojedynczych nici DNA jest białko PARP1. W 2018 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zatwierdziła lek o nazwie olaparib (Lynparza®) do leczenia pacjentów z przerzutowym rakiem piersi z mutacjami BRCA-1/2. Był to przełomowy moment, bowiem olaparib stał się pierwszym inhibitorem PARP dopuszczonym do leczenia raka piersi z mutacjami BRCA. Decyzja FDA została podjęta w oparciu o wyniki badania klinicznego fazy III OlympiAD. Co więcej, w 2022 roku, FDA zatwierdziła ten sam lek jako leczenie uzupełniające dla pacjentek z wysokim ryzykiem wczesnego raka piersi bez ekspresji ludzkiego czynnika naskórkowego i z mutacjami BRCA, które wcześniej przyjęły chemioterapię.

Przechodząc do mechanizmu działania olaparibu (Rysunek 1.1), jego celem molekularnym jest białko PARP1, obecne wewnątrz komórek. Zatem, aby ten lek przyniósł zakładany efekt terapeutyczny, olaparib musi do komórki wnikać. Zasada działania olaparibu polega na hamowaniu naprawy uszkodzonego DNA. Wiadomo, że materiał genetyczny ulega systematycznym uszkodzeniom, w liczbie od 10 000 do 1 000 000 defektów na komórkę każdego dnia.²¹ Nagromadzenie nieprawidłowości w DNA prowadzi z kolei do trwałych

mutacji genetycznych, a także śmierci komórek, co jest zjawiskiem pożądanym w przypadku komórek nowotworowych. Uszkodzenia pojedynczych nici DNA są jednak eliminowane przez wyspecjalizowane mechanizmy naprawcze, w tym białko PARP1. To pierwsza linia odpowiedzi na powstałe uszkodzenia materiału genetycznego, ułatwiająca wybór ścieżki naprawy.²² Działanie PARP1 polega na wiązaniu z nicią DNA poprzez domenę zlokalizowaną na N-końcu łańcucha polipeptydowego. Naprawa pęknięć DNA przez białko PARP1 opiera się na polimerach PAR, które ulegają związaniu z DNA w miejscach powstałych pęknięć. Z uwagi na ujemny ładunek polimerów PAR,²³ białko PARP1 oddysocjuje od nici DNA, rekrutując enzymy naprawcze. Częsteczki, takie jak olaparib, konkurując z NAD⁺ o miejsce wiązania w domenie katalitycznej PARP1, hamują tworzenie PAR,²⁴ prowadząc do „uwięzienia” PARP1 w miejscu uszkodzenia DNA. Blokuje to dostęp do uszkodzenia DNA dla białek naprawczych. W konsekwencji braku naprawy, nagromadzenie jednoniciowych pęknięć prowadzi do pęknięć dwuniciowych. Możliwe są wówczas dwie ścieżki naprawcze, w zależności od tego, czy komórka ma mutację BRCA-1, czy nie. Jeśli białko BRCA-1 jest prawidłowe, podwójne pęknięcia DNA są naprawiane przez homologiczną rekombinację, a komórka przeżywa. Proces ten przebiega inaczej w przypadku komórek z mutacją BRCA. W tym przypadku uszkodzenia DNA nie są skutecznie naprawiane, co z kolei wywołuje aktywację szlaków sygnałowych prowadzących do śmierci komórki. Warto podkreślić, że cząsteczki będące inhibitorami białka PARP1 zwiększają aktywność leków przeciwnowotworowych opartych na cisplatynie i radioterapii - metod powszechnie stosowane w leczeniu potrójnie ujemnego raka piersi. Najważniejsze badania dotyczące olaparibu, OlympiAD, podkreślają możliwość wydłużenia przeżycia pacjentek, gdy ten lek jest stosowany jako leczenie pierwszego rzutu.²⁵



Rysunek 1.1. Schemat zasady działania leku o nazwie olaparib. Białko PARP1 ulega związaniu z pęknięciami pojedynczych nici DNA, po czym rekrutuje enzymy naprawcze a sam oddysocjuje. W obecności olaparibu, ulegającego związaniu z domeną katalityczną białka, PARP1 jest zablokowane, co prowadzi do stabilizacji toksycznych kompleksów [DNA – PARP1 – olaparib]. Nagromadzenie pojedynczych pęknięć nici DNA prowadzi do pęknięć dwuniciowych, które mogą być naprawiane przez białko BRCA-1. W rezultacie komórka nowotworowa przeżywa. Jeśli jednak białko BRCA-1 posiada mutację, a tym samym jest niefunkcjonalne, uszkodzenia DNA nie mogą być skutecznie naprawione. W konsekwencji komórka nowotworowa umiera.

1.3. Celowane terapie leczenia nowotworu szyjki macicy

Według badań GLOBOCAN rak szyjki macicy w 2022 roku dominował w 25. ze 185. krajów na całym świecie, obejmując głównie obszar Afryki Subsaharyjskiej. Podobnie jak w przypadku nowotworów piersi, terapie celowane stanowią obiecującą i wdrażaną alternatywę dla standardowych metod leczenia raka szyjki macicy. Przykładem zatwierdzonego (zarówno przez FDA jak i Europejską Komisję Leków) celowanego podejścia terapeutycznego względem tego typu nowotworu jest inhibitor VEGF – lek o nazwie bewacizumab. Szeroko badane i rokujące są także inhibitory receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), PARP1, czy szlaku PD-1/PD-1. Nowotwór szyjki macicy i jego leczenie celowane zostały opisane poniżej.

Problematyka nowotworu szyjki macicy

Zgodnie z informacjami podanymi przez IARC, nowotwór szyjki macicy zajmuje czwarte miejsce pod względem liczby zgonów wywołanych z powodu choroby nowotworowej u kobiet

na całym świecie. Czynnikiem etiologicznym tego nowotworu jest wirus brodawczaka ludzkiego. Mimo badań przesiewowych i dostępnych szczepionek skierowanych przeciwko temu wirusowi, w ciągu ostatnich 20. lat wskaźnik umieralności na ten nowotwór zmniejszył się o mniej niż 1%.²⁶ Taka liczba wynika z kilku kwestii: 1) problemu dostępności do szczepionek i braku właściwej edukacji, 2) późnej diagnostyki, a co za tym idzie zaawansowanymi stadiami choroby, 3) metodami leczenia tego nowotworu, które uległy niewielkim zmianom w ciągu ostatnich kilku dekad. Wszystkie te aspekty przekładają się na ogólny wskaźnik przeżycia dla tego raka niższy niż 17. miesięcy.²⁷ Wyłania się zatem silne i naglące zapotrzebowanie na innowacyjne i skuteczne terapie.

Jako modelową linię komórkową raka szyjki macicy w niniejszej pracy doktorskiej zastosowano linię komórkową HeLa (ATCC), najczęściej stosowaną do badań w obszernej dziedzinie ludzkiej biologii komórkowej i molekularnej. Komórki te zostały wyizolowane w 1951 roku i stanowiły pierwszą ludzką linię komórkową zdolną do nieograniczonego podziału *in vitro*. To komórki adherentne, epitelialne.

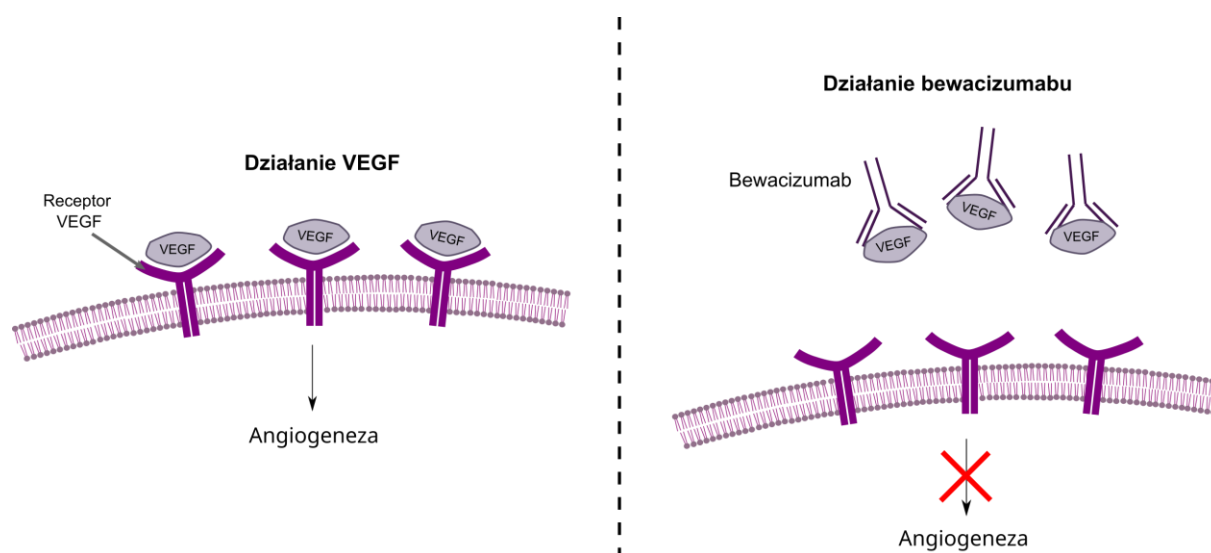
Celowane leczenie raka szyjki macicy

Obecnie standardowym podejściem leczenia raka szyjki macicy jest połączenie radioterapii z chemioterapią opartą na cisplatynie.²⁸ Jednak odnotowana oporność na tę substancję i szerokie skutki uboczne wpływają na ograniczenie jej stosowalności. Rozważając z kolei potencjalne terapie celowane, podobnie jak w przypadku potrójnie ujemnego raka piersi, alternatywną wydają się być inhibitory PARP1, białka biorącego udział w naprawie DNA, zwiększające odpowiedź komórek nowotworowych na cisplatynę.²⁸ W ujęciu tego typu nowotworu, wyłania się także konieczność lepszego zrozumienia interakcji między chorobą a układem odpornościowym. Tym samym to immunoterapia staje się dziedziną szybko rozwijającą o znaczących osiągnięciach.

Bewacizumab – inhibitor VEGF

Analizę terapii celowanych stosowanych w tej chorobie rozpoczęto od inhibitorów VEGF i leku o nazwie bewacizumab. W 2014 roku FDA oraz Europejska Agencja Leków zatwierdziła preparat handlowy Avastin® do leczenia pacjentek z przewlekłym, nawrotowym lub przerzutowym rakiem szyjki macicy. Warto jednak podkreślić, że bewacizumab jest podawany w skojarzeniu z terapią systematyczną - chemioterapią. Bewacizumab to przeciwciało wiążące czynnik VEGF. Cel molekularny, VEGF, indukuje tworzenie nowych naczyń krwionośnych, a więc proces określany mianem angiogenezy. Angiogeneza prowadzi z kolei do wzmożonej proliferacji komórek nowotworowych. Bewacizumab, wiążąc VEGF, hamuje ten proces, a tym samym rozprzestrzenianie się guza. Co istotne, potencjał terapeutyczny tego leku zaowocował tego zatwierdzeniem do leczenia aż ośmiu różnych typów nowotworów. Dodatkowo, obecnie prowadzonych jest kilkaset aktywnych badań klinicznych dotyczących bewacizumabu, w trakcie których naukowcy weryfikują zastosowanie tej substancji w ponad piętnastu różnych nowotworach, w tym nowotworze płuc, piersi czy właśnie szyjki macicy. Schemat przedstawiający mechanizm działania bewacizumabu został zamieszczony na Rysunku 1.2.

W przypadku raka szyjki macicy należy także podkreślić znaczenie terapii celowanej opartej na pembrolizumabie – inhibitorze receptora PD-1. Ten typ terapii celowanej został już wspomniany przy opisie potrójnie ujemnego raka piersi. Mechanizm działania pembrolizumabu jest oparty na zahamowaniu reakcji między PD-1 a PD-L1. Ta inhibicja prowadzi do aktywacji limfocytów T, które wykrywają komórki nowotworowe, prowadząc do ich śmierci. Receptor PD-1 jest obecny na limfocytach T.²⁹ Z kolei receptor PD-L1 to receptor komórek nowotworowych. W 2018 roku pembrolizumab został zatwierdzony przez FDA do leczenia nawrotowego lub przerzutowego raka szyjki macicy z progresją choroby w trakcie lub po chemioterapii, który wykazuje ekspresję receptora PD-L1. Jak wykazało badanie kliniczne KEYNOTE-158, pembrolizumab cechował się trwałą aktywnością przeciwnowotworową i bezpieczeństwem stosowania u pacjentek z PD-L1-dodatnim nowotworem.³⁰ Warto w tym miejscu wspomnieć, że 3. lata później, FDA zatwierdziła to przeciwciało w leczeniu przewlekłego, nawrotowego lub przerzutowego PD-L1-dodatniego raka szyjki macicy, ale w skojarzeniu z chemioterapią, z lub bez bewacizumabu. Badania kliniczne stanowiące podstawę tej decyzji to KEYNOTE-826, wykazujące, że dodanie pembrolizumabu do chemioterapii znacząco wydłużyło całkowity czas przeżycia i czas przeżycia bez progresji choroby w porównaniu z zastosowaniem samej chemioterapii.



Rysunek 1.2. Schematyczny mechanizm działania bewacizumabu. Celem molekularnym tego leku jest czynnik VEGF, wiążący się do specyficznego dla niego receptora, inicjując tworzenie naczyń krwionośnych, a więc proces angiogenezy. W obecności bewacizumabu, wiązanie między VEGF a jego receptorem jest zahamowane - bewacizumab wiąże się z VEGF, hamując jego dalsze wiązanie do receptora. Ty samym, proces angiogenezy nie zachodzi, a proliferacja komórek nowotworowych jest zahamowana.

Inhibitory EGFR

Szeroko badanymi terapiami celowanymi w leczeniu nowotworu szyjki macicy, oprócz zatwierdzonych przez FDA bewacizumabu i pembrolizumabu, są także inhibitory EGFR, takie jak gefitynib, erlotynib, czy nimotuzumab. EGFR to receptor błonowy o aktywności kinazy tyrozynowej. Po związaniu ligandu, na przykład EGF, receptor ten ulega dimeryzacji, co, poprzez autofosforylację domeny kinazy tyrozynowej, prowadzi do aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Te szlaki sygnałowe promują wzrost, podziały komórek oraz ich przeżycie. Inhibitory EGFR blokują aktywację tych szlaków, promując tym

samym apoptozę komórek nowotworowych. Inhibitory te można podzielić na dwie grupy. Pierwsza kategoria to małe cząsteczki, jak gefitynib, które wiążą się do domeny kinazy tyrozynowej, blokując aktywację EGFR. Druga grupa to z kolei przeciwciała, jak nimotuzumab, wiążące się zewnątrzkomórkowo do receptora EGFR, umożliwiając mu wiązanie ligandów. Niezależnie jednak od miejsca wiązania, inhibitory te działają na tej samej zasadzie. Gefitynib wykazał obiecujący potencjał terapeutyczny u pacjentek z zaawansowanym rakiem szyjki macicy.³¹ Z kolei badania kliniczne fazy II nad erlotynibem były prowadzone w zakresie jego połączenia ze standardową chemioterapią. Konieczne są jednak dalsze badania, celem określenia schematów potencjalnego leczenia i dodatkowego potwierdzenia korzyści klinicznych tego leku.³² W zakresie tego rodzaju terapii celowanej największą skuteczność wykazuje jednak nimotuzumab w połączeniu z chemioterapią, głównie względem nowotworu zaawansowanego miejscowo. W badaniu klinicznym ESMO 2023 wskaźnik odpowiedzi zwiększył się dla tego przeciwciała (w połączeniu z chemioterapią) do 86%, w odniesieniu do 76% dla samej chemioterapii. Zatem podsumowując, obecne badania potwierdzają potencjał terapeutyczny inhibitorów EGFR w leczeniu nowotworu szyjki macicy. Potrzebne są jednak szersze badania w celu optymalizacji wykorzystania tej grupy leków. Co ciekawe, inhibitory EGFR wydają się szczególnie istotne także w ujęciu agresywnego, potrójnie ujemnego nowotworu piersi.

1.4. Znaczenie procesu internalizacji leków celowanych

Aby uzyskać odpowiedź kliniczną, w terapiach celowanych lek musi wiązać się ze swoim celem molekularnym. Zatem miejsce działania leku jest zależne od miejsca występowania jego celu. Na przykład, miejscem działania olaparibu będzie wewnątrz komórki, z uwagi na występowanie białka PARP1 wewnątrzkomórkowo. Z kolei bewacizumab działa zewnątrzkomórkowo, bo czynnik VEGF jest obecny na zewnątrz komórki. Zatem proces internalizacji, inaczej wnikania cząsteczki, może być zjawiskiem pożądanym lub nie. W ujęciu ogólnym ten parametr wpływa bezpośrednio na skuteczność leku. Dla przykładu, internalizacja bewacizumabu do wnętrza komórek może wręcz prowadzić do niespecyficznego wiązania leku z receptorem VEGF, obecnym na błonie komórkowej lub wiązania między receptorem a VEGF uprzednio związanym z lekiem. W takim wypadku szanse na skuteczną terapię mogą być obniżone przez właściwości internalizacji.

Wylania się zatem potrzeba weryfikacji parametru internalizacji potencjalnych cząsteczek terapeutycznych jeszcze na etapie badań laboratoryjnych. Bowiem, jeśli na przykład kandydat do leku pokroju olaparibu nie będzie wnikał do komórek nowotworowych i ulegał w nich akumulacji, rozpoczęcie badań klinicznych nad taką cząsteczką nie wydaje się być zasadne. Weryfikacja tego etapu w laboratorium pozwoli zaoszczędzić czas i pieniądze wydawane na badania kliniczne. Wiadomo bowiem, że tego typu eksperymenty trwają około 8. lat³³ i kosztują niemal 3 miliardy dolarów dla pojedynczej cząsteczki.³⁴

W niniejszej rozprawie doktorskiej, wykorzystując nowatorskie podejście zastosowania FCS wewnątrz żywych ludzkich komórek, badano proces internalizacji różnych cząsteczek biologicznych i chemicznych.

1.5. Standardowe metody badania wnikania cząsteczek do wnętrza komórek

Określenie, czy cząsteczka o potencjale terapeutycznym wnika do komórek to kluczowy etap, stanowiący wstęp do badań nad tym konkretnym związkiem. Istnieje wiele technik pozwalających na ocenę internalizacji lub jej braku badanej molekuly do wnętrza ludzkich komórek.

Obrazowanie fluorescencyjne

Jednym z podstawowych podejść eksperymentalnych jest zastosowanie mikroskopii konfokalnej. Technika ta generuje jednak trudności w rozróżnianiu struktur wewnątrzkomórkowych, co jest spowodowane rozdzielczością tej metody.³⁵ Dla przykładu, rozwiązanie to nie jest w stanie dostarczyć informacji na temat dynamiki kompleksów białkowych. Przeciętna podjednostka białkowa ma bowiem około 2 nm w wymiarze XY. Dla mikroskopii konfokalnej granica dyfrakcji – najmniejsza możliwa odległość między dwoma punktami, które można jeszcze rozróżnić jako oddzielne – wynosi 200 nm. Zatem nawet rozpatrując większy obiekt, na przykład kompleks białkowy o wielkości 50 nm, taka granica dyfrakcji prowadzi do rozmycia sygnału punktowego, które przekracza średnią średnicę kompleksu białkowego niemal czterokrotnie. W odpowiedzi na ten problem, powstała mikroskopia superrozdzielcza czy mikroskopia ze strukturalnym oświetleniem (SIM). Zdecydowana większość rozwiązań superrozdzielczego obrazowania wykorzystuje funkcje matematyczne do zwiększenia rozdzielczości. Dla przykładu, technika mikroskopii lokalizacyjnej z wykorzystaniem fotoaktywowanej mikroskopii lokalizacyjnej PALM zapewnia rozdzielczość do 20 nm w wymiarze XY i 50 nm w wymiarze Z.³⁶ Celem tych rozwiązań jest umożliwienie dostarczenia informacji o lokalizacji wewnątrzkomórkowej cząsteczek wprowadzanych do komórek i ich interakcjach.³⁵ Mimo stałego rozwoju, niewątpliwie wciąż obrazowanie jest podejściem bardziej jakościowym niż ilościowym w badaniach wnikania cząsteczek do komórek. Mikroskopia fluorescencyjna jest powszechnie stosowana do oceny, czy badany związek wnika do komórek oraz jeśli tak, jak jest rozmieszczony w ich wnętrzu. Naukowcy wykorzystują też metody bazujące na obrazowaniu fluorescencyjnym, aby uzyskać informacje na temat mechanizmu transportu cząsteczki do komórek, czy celem określenia interakcji między potencjalnym lekiem a jego nośnikiem, jak na przykład liposomy.^{37–39} Dla przykładu, Torchilin i inni opisują badania nad specyficznym kierowaniem nośników leków zmodyfikowanych przeciwciałami do komórek nowotworowych. W tym przypadku to właśnie badania obrazowe dowiodły, że immunoliposomy połączone z lekiem są lepiej ukierunkowane na przeciwciała, co skutkuje zwiększonym zabijaniem komórek nowotworowych.⁴⁰ Inne przykłady eksperymentów, w których technika obrazowania mikroskopowego odegrała kluczową rolę to między innymi badania określające mechanizm transportu nanokryształów leku paklitaksel⁴¹, wnikania nanocząstek polimerowych zawierających leki kardiologiczne do komórek fibroblastów,⁴² czy eksperymenty nad dostarczaniem leków do komórek poprzez zastosowanie liposomów z przyłączonym kowalencyjnie peptydem TAT.⁴³ Zatem konwencjonalne metody badawcze, jak mikroskopia konfokalna, mikroskopia wielofotonowa, czy obrazowanie 3D stanowią jedne z najbardziej popularnych metod określania wnikania cząsteczek do komórek, głównie na poziomie jakościowym.

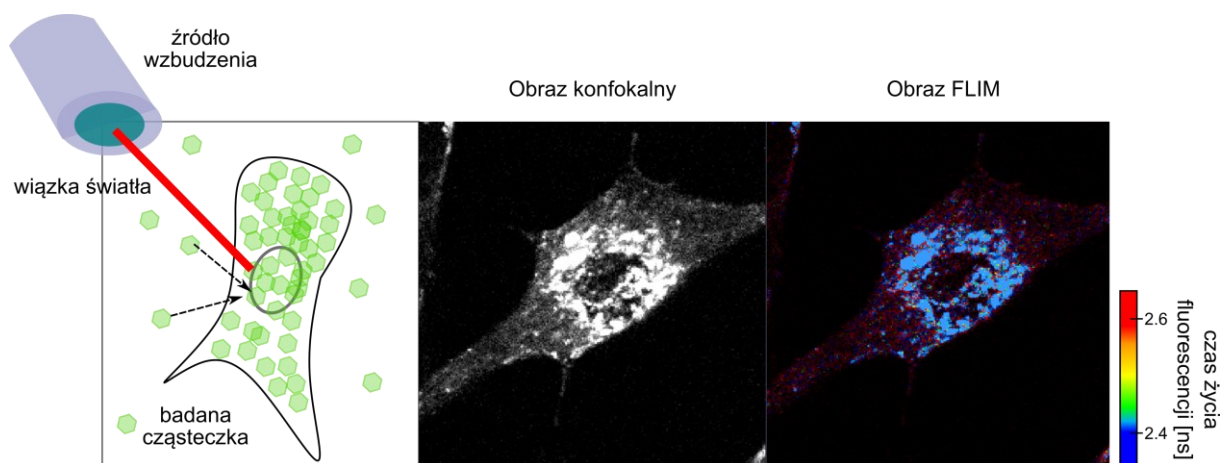
Analizując podstawowe wady i zalety mikroskopii fluorescencyjnej, jedną z jej niewątpliwych

korzyści jest brak destrukcyjnego wpływu na materiał, co umożliwia obserwację żywych komórek. Warto jednak zaznaczyć, że dotyczy to sytuacji, w której moc źródła wzbudzenia została odpowiednio dostosowana do rodzaju próbki oraz użytego fluoroforu. Technika ta pozwala również na uzyskiwanie obrazów wielowidmowych o wysokiej rozdzielczości w zakresie światła widzialnego. Umożliwia to analizę kolokalizacji, czyli ocenę, czy dwie lub więcej cząsteczek znajduje się w tej samej lokalizacji w obrębie analizowanego obiektu biologicznego. Wśród zalet, warto także wymienić znaczenie nadmienionego już obrazowania w warunkach 3D, czy możliwość analizy stężeń wewnątrzkomórkowych na podstawie uzyskanych obrazów.⁴⁴ Istotny jest także fakt, że obrazowanie fluorescencyjne może dostarczać informacji w czasie rzeczywistym poprzez wizualizację żywych komórek.

Jednak jak każda metoda badawcza, obrazowanie zawiera także szereg ograniczeń. W przypadku tego podejścia eksperymentalnego na uzyskane wyniki istotny wpływ ma doświadczenie laboranta. Dla przykładu, im wyższa rozdzielczość, tym dłuższy jest czas skanowania i tym dłużej fluorofor emitujący badaną fluorescencję jest nastawiony na działanie lasera. Często jednak, zwiększenie rozdzielczości nie skutkuje dostarczeniem większej ilości użytecznych informacji o próbce. Dużym i powszechnym problemem mikroskopii fluorescencyjnej jest także fotowypalanie, a więc zanik sygnału fluorescencyjnego, czy fotouszkodzenie badanego materiału spowodowane niewłaściwie dobraną mocą źródła wzbudzenia, na przykład lasera. Problemem tej techniki nadal pozostaje także brak możliwości analizy pojedynczych cząsteczek fluorescencyjnych, a więc ograniczenia rozdzielczości. Na koniec warto pamiętać o czasochłonności tego rozwiązania.⁴⁴

Oprócz mikroskopii fluorescencyjnej, warto także omówić inne techniki obrazowania stosowane do oceny efektywności wnikania potencjalnych leków do komórek, jak obrazowanie czasu życia fluorescencji (FLIM) oraz spektroskopia Ramana. FLIM jest coraz szerzej stosowany do badania zarówno endo- jak i egzogennych cząsteczek, procesów wewnątrzkomórkowych oraz zachodzących między komórkami. To rozwiązanie wykorzystywane jest także do analizy mikrośrodków fizykochemicznych. Tego typu zastosowania są możliwe między 5-wymiarowej akwizycji danych FLIM, a więc wymiary x, y, z, czas oraz czas życia fluorescencji. W porównaniu z obrazowaniem fluorescencyjnym, opartym na intensywności fluorescencji, podatnej na fotowypalanie, FLIM dostarcza większej ilości informacji, w tym wiedzę na temat statusu leku – czy występuje w komórkach w formie wolnej, związanej, jest metabolizowany lub nie, enkapsulowany czy uwolniony. Jako zaletę tej techniki, należy także wskazać jej integralność z innymi metodami obrazowania optycznego, w tym z mikroskopią konfokalną i wielofotonową, czy mikroskopią Ramana. Warto zaznaczyć, że rozwiązanie FLIM cieszy się coraz większą popularnością w diagnostyce chorób i monitorowaniu leczenia.⁴⁵ Podobnie jak w przypadku obrazowania fluorescencyjnego/konfokalnego, w przypadku analizy FLIM największą wadą tej techniki jest wpływ doświadczenia eksperymentatora na otrzymywane wyniki. Aby zminimalizować błędną interpretację, należy zatem zwrócić szczególną uwagę na akwizycję danych, algorytmy obliczania czasów życia fluorescencji czy dokładne zbadanie mechanizmów leżących u podstaw zmian tego czasu. Warto jednocześnie pamiętać, że analizowany we FLIM czas życia fluorescencji jest parametrem zależnym między innymi od pH, temperatury czy obecności jonów. Co więcej, koszt aparatury FLIM jest większy w odniesieniu do standardowego

obrazowania konfokalnego, a fakt, że nie wszystkie barwniki fluorescencyjne nadają się do analizy FLIM ogranicza zakres stosowalności tej techniki. Schematyczne porównanie obrazowania konfokalnego z obrazowaniem FLIM przedstawiono na Rysunku 1.3.



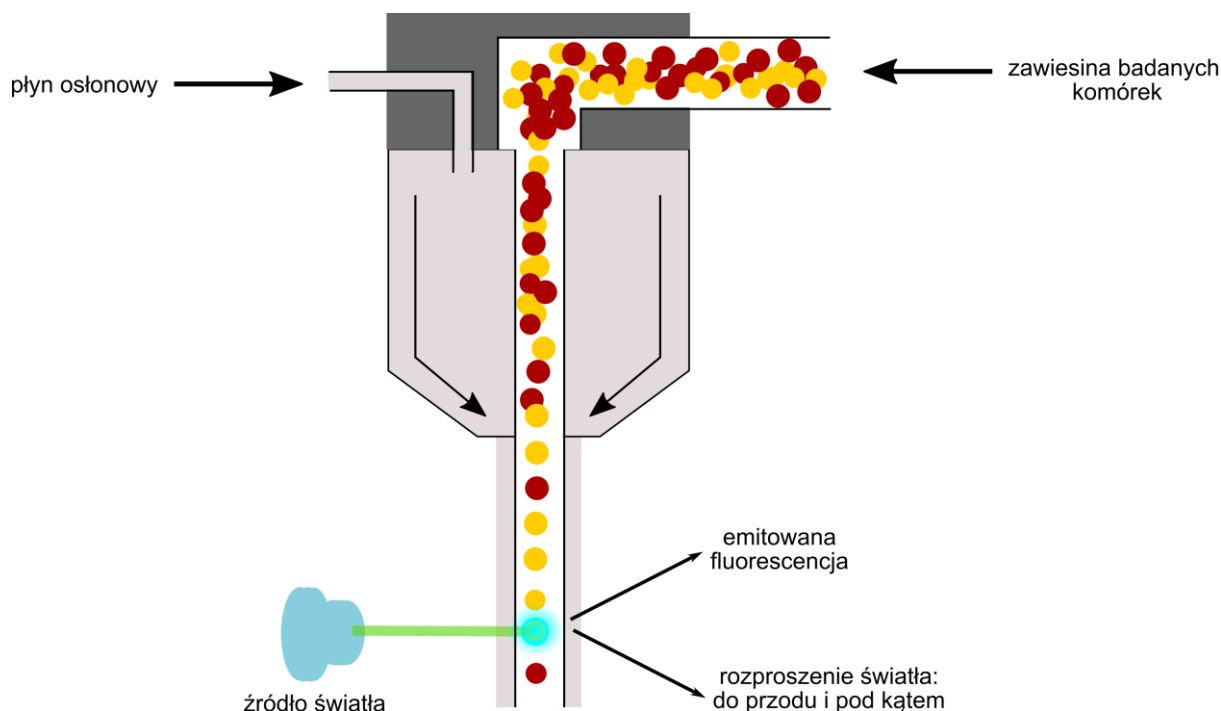
Rysunek 1.3. Schematyczne porównanie obrazów uzyskanych mikroskopią konfokalną i obrazowaniem FLIM. Badana cząsteczka fluorescencyjna wnika do ludzkiej komórki. Poprzez umieszczenie komórki w układzie optycznym i wzbudzenie wiązką światła o odpowiedniej długości, komórka emituje fluorescencję. Obraz konfokalny został przedstawiony w skali szarości: czarny – brak sygnału, biały – maksymalna fluorescencja. Względem obrazu FLIM zostało zastosowane filtrowanie po czasie życia fluorescencji: sygnał niebieski odpowiada czasowi życia fluorescencji poniżej 2,4 ns, kolor czerwony powyżej 2,6 ns.

Przechodząc do spektroskopii Ramana, niewątpliwą zaletą tego podejścia jest brak konieczności znakowania fluorescencyjnego badanych cząsteczek,⁴⁶ a także możliwość śledzenia procesów dynamicznych.⁴⁷ Technika ta wymaga jednak zaawansowanej analizy danych, a sygnał autofluorescencji komórek może całkowicie maskować sygnał Ramana. Co więcej, sygnał Ramana cechuje się niską intensywnością, a rozdzielczość tej techniki jest ograniczona.^{48,49} Z powodzeniem jednak modyfikacja tej techniki, powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana (SERS), została na przykład zastosowana do śledzenia uwalniania w komórkach dokсорubicyny z tlenku grafenu.⁴⁷ W połączeniu z obrazowaniem konfokalnym spektroskopia Ramana umożliwiła także śledzenie interakcji dokсорubicyny w komórkach raka płuc.⁵⁰

Cytometria przepływowa

Omawiając techniki stosowane do badania internalizacji cząsteczek do wnętrza ludzkich komórek, szczególną uwagę należy zwrócić na cytometrię przepływową. Ta popularna w laboratoriach molekularnych i biologicznych metoda jest uważana za „złoty standard” w dostarczaniu informacji z dużej ilości komórek w krótkim czasie.⁵¹ W cytometrii przepływowej komórki są ustawiane w wąski strumień dzięki otaczającej je cieczy osłonowej. Takie rozwiązanie umożliwia analizę pojedynczych obiektów. Powstały strumień komórek przechodzi przez wiązki laserowe, a rozproszenie światła następuje w dwóch kierunkach: do przodu i pod kątem. Z rozproszenia do przodu zyskujemy informacje o wielkości analizowanych komórek, a z rozproszenia światła pod kątem - o ich ziarnistości i strukturze wewnętrznej. Z zastosowaniem cytometrii przepływowej najczęściej badane są komórki lub cząstki wyznakowane fluorescencyjnie, zatem detektory rejestrują także emisję fluorescencji, dostarczającej informacji na przykład o obecności związków w komórkach lub na ich

powierzchni, czy ekspresji białek.⁵² Zasadę działania cytometru przepływowego schematycznie przedstawiono na Rysunku 1.4.



Rysunek 1.4. Schemat cytometru przepływowego.

Z zastosowaniem tej metody możliwe jest zbadanie tysięcy komórek w ciągu kilku sekund, co czyni tę technikę wysokoprzepustowym rozwiązaniem.⁵¹ Między innymi z tego względu, cytometr przepływowy jest wykorzystywany zarówno w firmach farmaceutycznych, jak i biotechnologicznych w trakcie opracowywania nowych leków.⁵³ Do najpopularniejszych typów badań wykonywanych z użyciem tego sprzętu należą sortowanie komórek, badanie interakcji receptor-ligand, immunofenotypowanie, profilowanie odpowiedzi komórkowej w funkcji stężenia leku, ocena toksyczności badanego związku,^{53,54} analiza proliferacji czy apoptozy komórek.⁵² Obok niewątpliwych zalet cytometrii przepływowej, jak wspomniana wysokoprzepustowość, a tym samym szybkość analizy, możliwość badania różnych parametrów poprzez zastosowanie różnych fluofoarów, czy funkcja sortowania oraz analiza pojedynczych komórek, ta technika posiada także swoje wady. Najważniejszym, obok konieczności posiadania komórek do analizy w zawieszynie, ograniczeniem tej metodyki badawczej jest brak rozróżnienia sygnału pochodzącego z różnych kompartmentów komórki.⁵⁵ Zatem z pomocą tej metody otrzymamy informację o sygnale pochodzącym z całej objętości analizowanej komórki. Mimo to, ta technika oraz jej modyfikacje to wciąż najlepsze dostępne rozwiązanie stosowane w badaniach internalizacji cząsteczek do wnętrza komórek. Z jej użyciem z powodzeniem określane jest wnikanie do komórek nanocząstek jako nośników leków⁵⁶ czy lipoprotein,⁵⁷ pobieranie egzosomów przez komórki odpornościowe,⁵⁸ wyznaczanie mechanizmów internalizacji nanocząstek,⁵⁹ czy pobieranie przez komórki immunotoksyn.⁶⁰

Zatem podsumowując, cytometria przepływowa jest niewątpliwie techniką z wyboru w ujęciu dostarczenia dużej ilości informacji z całej populacji analizowanych komórek. Metoda ta

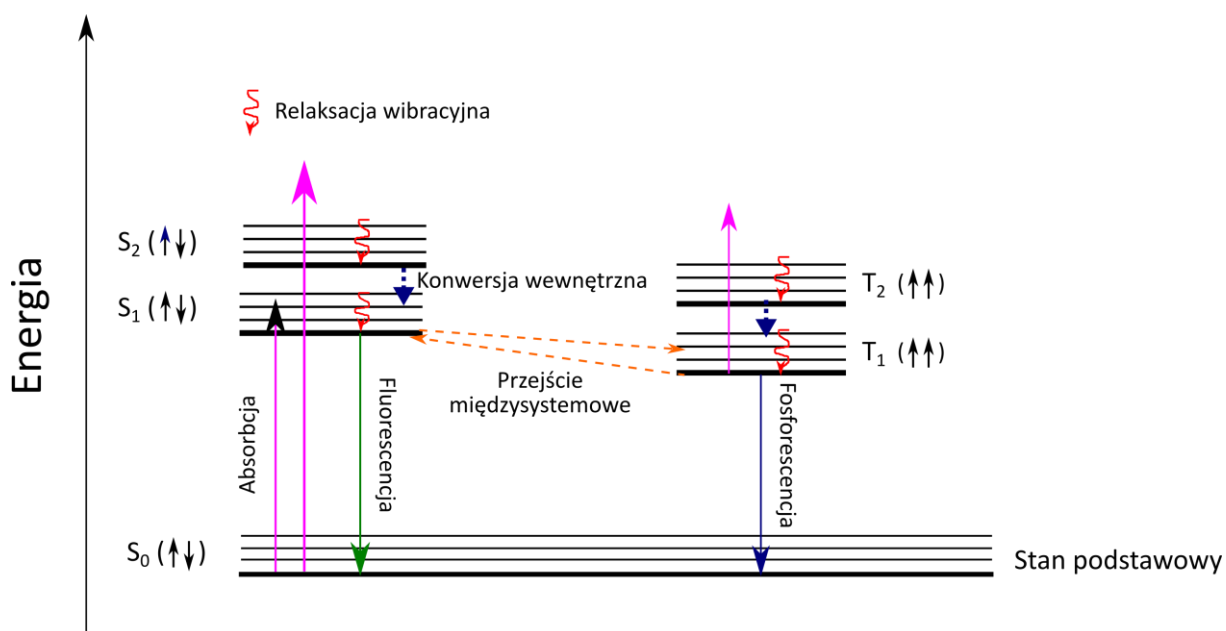
umożliwia ich sortowanie, wyodrębnienie subpopulacji, ustalenie procentowanego udziału komórek o określonych cechach względem całej populacji, przy jednoczesnym zaoszczędzeniu czasu. Mimo to cytometria przepływowa nie pozwala na uzyskanie ilościowych danych dotyczących na przykład mechanizmu wnikania cząsteczki, jej lokalizacji, interakcji wewnątrzkomórkowych a tym samym mechanizmu działania.

1.6. Spektroskopia Korelacji Fluorescencji

W niniejszej rozprawie doktorskiej jako podstawową i ilościową metodę charakterystyki wnikania cząsteczek do wnętrza żywych, ludzkich, komórek zastosowano technikę FCS. Dwa zjawiska, kluczowe przy pomiarach tą techniką to fluorescencja oraz dyfuzja.

Zjawisko fluorescencji

Każda cząsteczka organiczna charakteryzuje się określonymi stanami elektronowymi. Te stany opisują rozkład energii elektronów tej cząsteczki. Elektrony mogą znajdować się w stanie podstawowym lub w wyniku pochłonięcia energii, najczęściej w postaci światła – fotonu, mogą przejść do stanów wzbudzonych. W zależności od spinów elektronów występują dwa główne typy stanów wzbudzonych: stany singletowe, oznaczane literą S, w których wszystkie elektrony są sparowane pod względem spinu oraz stany trypletowe, oznaczane literą T, występujące, gdy jeden z elektronów zmieni swój spin. Przejścia w obrębie stanów singletowych są spinowo dozwolone i zachodzą bardzo szybko. Z kolei przejścia ze stanów singletowych do trypletowych są spinowo zakazane i znacznie wolniejsze. Graficzne przedstawienie stanów energetycznych oraz możliwych przejść między nimi prezentuje Diagram Jabłońskiego (Rysunek 1.5.).



Rysunek 1.5. Diagram Jabłońskiego jako uproszczony schemat rozmieszczenia poziomów energii elektronowej cząsteczki.

Rozważmy sytuację, w której cząsteczka absorbuje foton, przechodząc tym samym do wzbudzonego stanu singletowego, oznaczonego jako S_1 na Rysunek 1.5. Podczas powrotu do stanu podstawowego S_0 , zachodzącego bardzo szybko (rzędu nanosekund), cząsteczka ta emituje światło w formie fotonu o długości fali dłuższej niż światło użyte do jej wzbudzenia. Ta emisja światła określana jest mianem fluorescencji – spinowo dozwolonego przejścia radiacyjnego. Zjawisko to jest podstawą detekcji sygnału FCS.

Zjawisko dyfuzji

Dyfuzja jest określana jako spontaniczny ruch, na przykład cząsteczek, z obszaru o stężeniu wyższym do obszaru o stężeniu niższym, trwający aż do osiągnięcia stanu równowagi. Cechą charakterystyczną dyfuzji jest jej zależność od losowego przemieszczania się cząsteczek. Warto w tym miejscu wspomnieć o ruchach Browna, a więc przypadkowych ruchach cząsteczek zawieszonych w płynie, wywołanych zderzeniami z cząsteczkami rozpuszczalnika. Związek między dyfuzją a ruchami Browna jest taki, że to ruchy Browna stwarzają mechanizm dyfuzji - losowy ruch cząstek ostatecznie prowadzi do ich rozmieszczenia.

Jedną z podstawowych właściwości wszystkich cząsteczek obecnych w roztworze jest dyfuzja translacyjna, dla której współczynnik dyfuzji definiuje Równanie Stokesa-Sutherlanda-Einsteina:

$$D_{trans} = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R}$$

Równanie (1.1.)

gdzie D_{trans} jest współczynnikiem dyfuzji translacyjnej, k stałą Boltzmanna, T temperaturą bezwzględną, η odpowiada lepkości roztworu, a R promieniowi hydrodynamicznemu cząsteczki.

Zatem każda zmiana promienia cząsteczki powoduje zmianę odpowiadającego jej współczynnika dyfuzji. Takie zmiany występują w przypadku większości biomolekuł, jak kwasy nukleinowe czy białka, podczas interakcji z otoczeniem (jak wiązanie jonów), pełnienia funkcji biologicznych (jak reakcja enzymatyczna) lub zmian parametrów środowiskowych, jak pH czy temperatura (na przykład denaturacja białek). Zatem możliwość precyzyjnego, ilościowego pomiaru współczynników dyfuzji, zarówno w roztworze, jak i żywych komórkach stwarza bardzo szeroki zakres potencjalnych zastosowań.

W ujęciu pomiarów FCS, to, jak szybko cząsteczka dyfunduje przez ognisko detekcji, o rozmiarze wyznaczonym podczas kalibracji sprzętu, jest opisane równaniem poniżej:

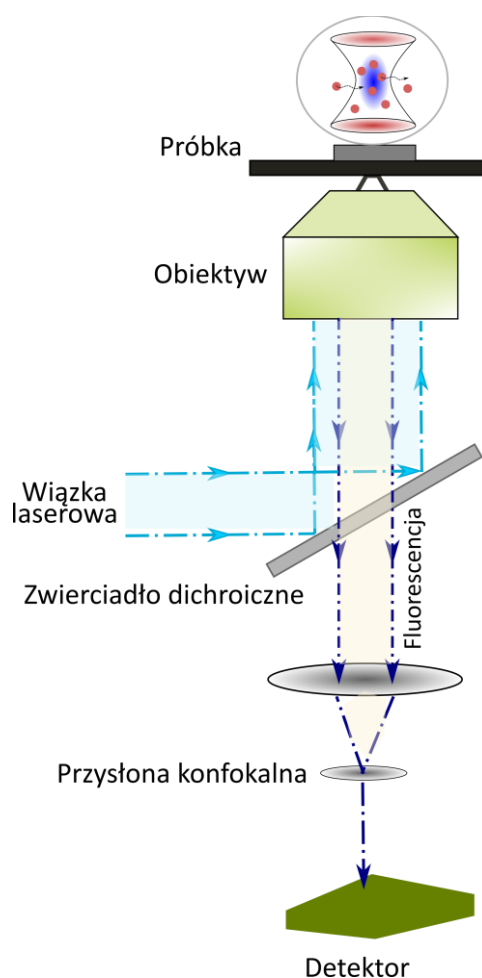
$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_D}$$

Równanie (1.2.)

gdzie ω_{xy} jest promieniem obszaru detencji, natomiast τ_D - czasem dyfuzji cząsteczki.

Układ optyczny FCS

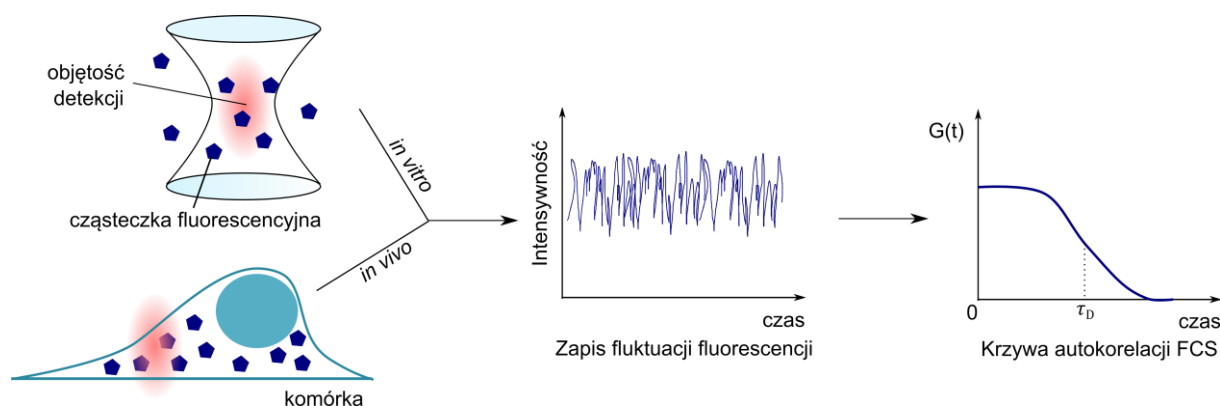
Typowy układ optyczny FCS przedstawiono na Rysunku 1.6. Cząsteczki fluorescencyjne zawieszone w roztworze wodnym są umieszczane na szalce pomiarowej, a ta nad obiektywem. Wiązka lasera jest kierowana przez zwierciadło dichroiczne do obiektywu o wysokiej aperturze numerycznej, który ogniskuje światło w próbce. Sygnał fluorescencji próbki jest zbierany przez ten sam obiektyw, przechodzi przez zwierciadło dichroiczne (odbijające światło lasera, ale przepuszczające fluorescencję) i jest ogniskowane na okrągłą przysłonę konfokalną. Za tą przysłoną światło jest skupiane na bardzo czułym detektorze - diodzie lawinowej jednofotonowej (SPAD). Przysłona konfokalna efektywnie eliminuje światło pochodzące spoza płaszczyzny ogniskowania. Zatem, ogniskowanie światła wzbudzającego oraz konfokalna detekcja emisji fluorescencji tworzą efektywną objętość detekcji o średnicy rzędu 500 nm w płaszczyźnie ogniskowania i kilku mikrometrów wzdłuż osi optycznej. Dokładny kształt i rozmiar tej objętości wpływa bezpośrednio na kształt i szybkość zaniku $G(t)$. Im mniejszy jest obszar detekcji, tym szybciej cząsteczki go opuszczają, co prowadzi do szybszego zaniku funkcji autokorelacji FCS.⁶¹



Rysunek 1.6. Schemat układu optycznego FCS.

Zasada działania FCS

Zasada działania metody FCS polega na pomiarze, a następnie analizie statystycznej fluktuacji intensywności fluorescencji, emitowanej przez wyznakowane cząsteczki o niewielkim stężeniu (rzędu nanomolarnego), znajdujące się w niewielkim obszarze detekcji – ognisku detekcji. Każde zjawisko determinujące zmianę intensywności fluorescencji tych cząsteczek (jak położenie, zmiany konformacyjne, właściwości fotofizyczne, reakcje chemiczne) implikuje czasową zmianę intensywności rejestrowanego sygnału. Cząsteczki, które swobodnie dyfundują do i z ogniska detekcji, będą generować zmieniający się zapis intensywności fluorescencji. Co ważne, charakter tych fluktuacji wpływa bezpośrednio na wielkość parametrów fizycznych, jak opisany Równaniem (1.1.) współczynnik dyfuzji, wyznaczanych tą techniką. Schematyczny rysunek dla pomiarów FCS prowadzonych w buforze (*in vitro*) lub we wnętrzu komórek (*in vivo*) przedstawiono na Rysunku 1.7.



Rysunek 1.7. Schemat pomiarów FCS w buforze (*in vitro*) oraz we wnętrzu żywych komórek (*in vivo*). Badana cząsteczka, dyfundując przez ognisko detekcji, którego wielkość została określona w trakcie kalibracji, emituje fluorescencję, której zapis intensywności w czasie jest procedowany matematycznie, celem uzyskania krzywej autokorelacji FCS.

Zatem wzbudzenie laserem analizowanych cząsteczek oraz wykrywanie emitowanej przez nie fluorescencji dotyczy ogniska detekcji, którego wielkość określana jest przed każdym pomiarem w trakcie kalibracji. Jeżeli stężenie wyznakowanych cząsteczek w roztworze jest wystarczająco niskie (rzędu nM), wówczas mierzony sygnał fluorescencji wykazuje znaczne fluktuacje, będące efektem przemieszczania się pojedynczych cząsteczek przez ognisko detekcji.

Następnie, sygnał w postaci intensywności fluorescencji wykrytej w czasie t jest korelowany z intensywnością fluorescencji przesuniętą w czasie, dla różnych wartości opóźnienia czasowego τ . Jako rezultat eksperymentator uzyskuje tzw. funkcję/krzywą autokorelacji, obliczaną przez zastosowane oprogramowanie według wzoru:

$$G(t) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

Równanie (1.3.)

Gdzie $G(t)$ to funkcja autokorelacji, $I(t)$ – intensywność fluorescencji w czasie t .

Funkcja autokorelacji FCS jest proporcjonalna do prawdopodobieństwa wykrycia fotonu w czasie τ , o ile wcześniej (w czasie zerowym) wykryty został inny foton. Jeśli cząsteczka znajduje się w centralnej części ogniska detekcji, będzie istniało duże prawdopodobieństwo wykrycia znacznej ilości kolejnych fotonów od tej cząsteczki. Wówczas, sygnał fluorescencji będzie wysoce skorelowany w czasie. Jeśli natomiast cząsteczka, w wyniku dyfuzji, zacznie opuszczać ognisko detekcji, ta zależność będzie stopniowo malała. Zatem prawdopodobieństwo wykrycia kolejnych fotonów fluorescencyjnych będzie zmniejszać się z czasem, aż cząsteczka całkowicie zniknie, a tym samym korelacja zniknie. Warto zaznaczyć, że czasowe zanikanie tej korelacji, wraz ze wzrastającym opóźnieniem czasowym τ , będzie proporcjonalne do szybkości dyfuzji cząsteczki. Bowiem im większy współczynnik dyfuzji, tym szybciej zanika korelacja.⁶²

Cechą charakterystyczną funkcji autokorelacji FCS jest także jej zależność od liczby cząsteczek emitujących fluorescencję. Fluktuacje intensywności fluorescencji będą większe dla mniejszej liczby cząsteczek w obszarze detekcji. Jeśli bowiem w objętości detekcyjnej będzie tylko jedna cząsteczka, to przemieszczanie się tej cząsteczki z tego obszaru lub dyfuzja innej cząsteczki do objętości detekcji spowoduje dużą zmianę mierzonej intensywności. Istnieje zatem bezpośredni związek między odwrotnością stężenia cząsteczek fluorescencyjnych a amplitudą funkcji autokorelacji. Tę możliwość pomiarową FCS wykorzystano w niniejszej rozprawie doktorskiej, wyznaczając stężenia cząsteczek obecnych wewnątrz żywych, ludzkich, komórek. Szczegółowy opis metodyki określania stężeń zamieszczono w Rozdziale 3.4.

O kształcie funkcji autokorelacji w skali czasowej decydują różne właściwości wyznakowanych cząsteczek. W zakresie mikrosekund funkcja $G(t)$ jest zdominowana przez stany trypletowe, przejścia między stanami konformacyjnymi cząsteczki lub szybkie wewnątrzcząsteczkowe procesy strukturalne. Z kolei na poziomie milisekund do sekund krzywa autokorelacji FCS wykazuje typowe zbieganie do zera, spowodowane boczną dyfuzją cząsteczek poza obszar detekcji.⁶² Warto także podkreślić, że punkt przegięcia funkcji autokorelacji FCS odpowiada czasowi dyfuzji τ_D z Równania (1.2.) analizowanej cząsteczki (Rysunek 1.7.).

FCS we wnętrzu żywych komórek

Podstawa FCS, a więc fluktuacje intensywności fluorescencji to cecha specyficzna każdej badanej próbki. Naukowcy od lat aplikują tę technikę do pomiarów we wnętrzu żywych komórek, stosując w tym celu stężenia fizjologiczne badanych związków.⁶³ Technika FCS zapewnia wysoką czułość na poziomie pojedynczej cząsteczki i pojedynczych komórek, pomiary w czasie rzeczywistych oraz wysoką rozdzielczość czasową poniżej mikrosekund. Jednak z uwagi na złożoność cytoplazmy/jądra komórkowego, wykrycie i właściwa interpretacja ruchu/mobilności cząsteczek wewnątrz żywej komórki to duże wyzwanie. Także w przypadku metody FCS istnieje ryzyko artefaktów eksperymentalnych i błędnej analizy otrzymanych wyników. Z tego powodu powstają publikacje naukowe, jak artykuł autorstwa Kim i innych,⁶⁴ stanowiące instrukcje zastosowania FCS do żywych komórek obejmujące między innymi optymalizację warunków pomiarowych oraz analizę wartości parametrów w

ujęciu złożonych warunków panujących w żywej komórce. Przykładami najczęstszych problemów eksperymentalnych są: 1) poruszanie komórki, powodujące przesunięcia objętości detekcji, 2) niewłaściwe ustawienie analizowanej objętości wewnątrz żywych komórek (wykrywany sygnał może wówczas pochodzić z obszaru poza komórką), 3) autofluorescencja komórek wpływająca na analizowany sygnał, 4) wypalanie sygnału fluorescencji i jego wpływ na kształt krzywych autokorelacji FCS, 5) zbyt niskie lub zbyt wysokie stężenie analizowanego związku generujące szумы i błędy statystyczne.

Obecnie najczęściej aparatura FCS jest oparta na mikroskopii konfokalnej. Takie rozwiązanie umożliwia uzyskanie przestrzennej rozdzielczości rzędu femtolitrów w objętości detekcyjnej, a to z kolei sprzyja adaptacji tej techniki do zastosowań komórkowych. Potencjał FCS do pomiarów wewnątrz żywych komórek (*in vivo*) został szeroko dowiedziony w artykule Schille i innych.⁶³ Autorzy tej pracy potwierdzają, że to metoda nieinwazyjna, z zastosowaniem której można śledzić zarówno dynamikę wewnątrzcząsteczkową, jak i interakcje zachodzące między różnymi typami cząsteczek, bez potrzeby ich wcześniejszego izolowania i rozdzielania. Niewątpliwie technika FCS umożliwia uzyskanie informacji o wielu różnych parametrach fizycznych, jak stężenie, rozmiar, mobilność czy udział poszczególnych składników, w przedziale czasowym od nanosekund do kilkuset milisekund. Od momentu intensywnego rozwoju FCS i przezwyciężenia ograniczeń technicznych (jak brak odpowiednio czułych detektorów) technika ta została zastosowana do pomiarów szerokiego zakresu próbek biologicznych: od bakterii, drożdży, komórek aż po żywe organizmy. Rozwiązanie to zostało wykorzystane do charakterystyki zdecydowanej większości obszaru wnętrza komórki, od jądra przez cytoplazmę i organelle do błony komórkowej.⁶⁵ Przykładami badań *in vivo* przeprowadzonych z zastosowaniem FCS są eksperymenty nad organizacją błon,^{66,67} strukturą chromatyny,^{68,69} interakcjami białko – białko,^{70,71} powinowactwem wiązania białek i kwasów nukleinowych,^{72,73} wiązaniami ligandów do receptorów błonowych,^{74,75} oligomeryzacją,^{76,77} czy wewnątrzkomórkowym transportem cząsteczek.⁷⁸

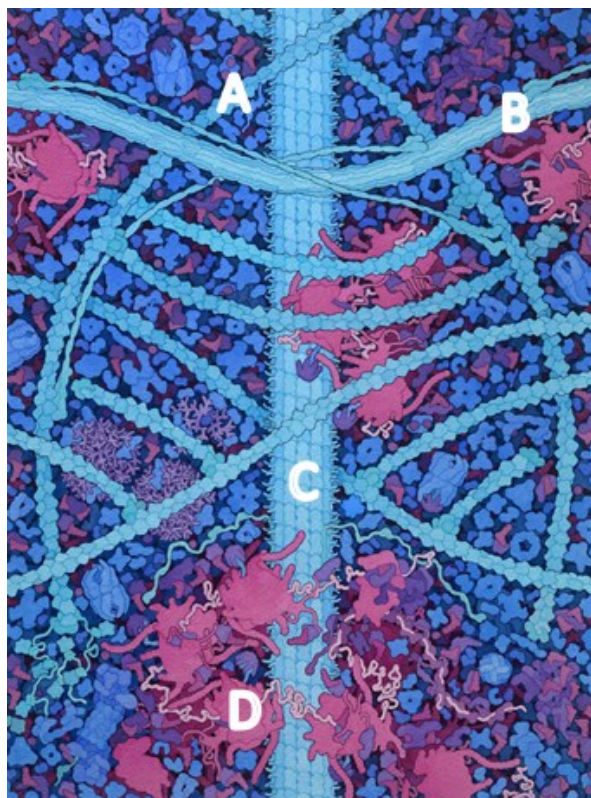
Podsumowując, FCS znajduje coraz szersze zastosowanie w różnych obszarach biologii, stwarzając szeroką gamę możliwości badań interakcji molekularnych we wnętrzu żywych komórek. Co istotne, pomiary FCS są prowadzone na poziomie fizjologicznych stężeń, pojedynczych cząsteczek i komórek, w czasie rzeczywistym.

Dla wszystkich badanych w ramach niniejszej pracy cząsteczek schemat postępowania przy interpretacji wyników FCS uzyskiwanych z wnętrza ludzkich komórek był taki sam i obejmował następujące etapy: a) wyznaczenie współczynnika dyfuzji/rozmiaru badanej molekuly w buforze z zastosowaniem techniki FCS (Równania (1.1.) i (1.2.)); b) obliczenie, na podstawie modelu nanolepkości cytoplazmy lub jądra komórkowego zależnego od skali długości (szczegóły w rozdziale poniżej), oczekiwanego współczynnika dyfuzji w komórkach dla swobodnie dyfundującej cząsteczki badanej; 3) Porównanie oczekiwanego współczynnika dyfuzji ze współczynnikiem otrzymanym eksperymentalnie wewnątrz komórek poprzez dopasowanie odpowiedniego modelu matematycznego do funkcji autokorelacji FCS.

Nanolepkość komórek jako parameter krytyczny w ilościowej analizie wyników FCS

Jako opisano wyżej, FCS bazuje na pomiarze szybkości przemieszczania się cząsteczek, którą można wyrazić w formie współczynnika dyfuzji. Wartość tego parametru w sposób bezpośredni zależy od lepkości roztworu, w którym badana cząsteczka się porusza. Im większa lepkość, tym mniejsza szybkość poruszania się molekuly (niższy współczynnik dyfuzji), zgodnie z Równaniem (1.1.). Wyobraźmy sobie zatem sytuację, w której prowadzimy pomiary FCS we wnętrzu komórek ssaczych, względem których wcześniej nastąpiła internalizacja pewnej fluorescencyjnej molekuly. Jako wynik pomiarów FCS uzyskujemy funkcję autokorelacji, którą, chcąc zinterpretować, następnie opisujemy odpowiednim modelem matematycznym. Dopasowanie najodpowiedniejszego modelu do danych eksperymentalnych pozwala nam uzyskać wartości parametrów fizycznych, jak współczynnik dyfuzji, promień hydrodynamiczny czy stężenie. Aby jednak precyzyjnie i w sposób całkowicie ilościowy określić, jakiej cząsteczce czy zespołowi cząsteczek odpowiada konkretna, uzyskana wartość określonego parametru fizycznego, musimy znać rozmiar wolnej, niezwiązanej cząsteczki, która została przez komórki pobrana lub do nich wprowadzona. Co więcej, oprócz wielkości badanej molekuly, musimy dysponować informacją na temat lepkości wnętrza komórek. Bowiem jak już podkreślono, mobilność a więc szybkość poruszania się cząsteczki zależy od lepkości płynu, w którym ten ruch zachodzi.

Wiadomo, że wnętrze ludzkich komórek to płyn złożony o dużym stopniu zatłoczenia i złożoności.^{79,80} O jego lepkości decydują między innymi obszar, którego dotyczy – inna jest lepkość w skali nanometrów dla cytoplazmy, a inna dla jądra komórkowego,^{81,82} obecność struktur wewnątrzkomórkowych, jak cytoszkielet, stopień zatłoczenia molekularnego, lokalne interakcje cząsteczek, czy zjawiska takie jak stres komórkowy. Na Rysunku 1.8. przedstawiono koncepcyjny obraz cytoplazmy ludzkiej komórki z zaznaczeniem cytoszkieletu i rybosomów. Intuicyjnie, lepkość, zarówno cytoplazmy jak i jądra komórkowego, ludzkich komórek jest większa od lepkości wody. Kwestia lepkości wnętrza komórek ssaczych, w różnych skalach długości, jest od lat zgłębianą przez naukowców.^{83–87} Jedną z grup badawczych prowadzących badania w tym zakresie jest zespół prowadzony przez prof. dr hab. Roberta Hołysta.^{81,82,88} Członkowie tej grupy dotychczas wykazali między innymi, że lepkość cytoplazmy różnych typów ludzkich komórek (nabłonkowe/mezenchymalne, nowotworowe/prawidłowe, młode/dorośle) jest zachowana, a dla skali nanoskopowej poniżej 100 nm wnętrza komórek ssaczych przypomina ciecz.⁸¹ Dopiero powyżej 100 nm cytoplazma komórek przyjmuje strukturę żelu.



Rysunek 1.8. Schematyczny obraz wnętrza ludzkiej komórki: A) aktyna, B) filament pośredni, C) mikrotubule, D) struktury rybosomów. Ilustracja stworzona przez David S. Goodsell, RCSB Protein Data Bank.

Działając w ramach zespołu prof. Hołysta, w 2011 roku Kalwalczyk wraz z innymi,⁸⁹ przeanalizował dane literaturowe, pozyskiwane różnymi technikami i w różnych warunkach, dotyczące lepkości płynów złożonych (w tym cytoplazmy komórek ssaczych) w nanoskali. Jako konsekwencję tej analizy, autorzy zaproponowali teoretyczny model lepkości cytoplazmy komórek ssaczych w skali nanoskopowej w funkcji rozmiaru próbnika wprowadzonego do komórki. W celu wyznaczenia tego modelu, naukowcy analizowali różnego typu cząsteczki - od białek, polimerów, po DNA, na podstawie zebranych danych literaturowych z wnętrza komórek linii HeLa oraz Swiss 3T3. W ten sposób, dla każdego próbnika wyznali zależność opisaną równaniem poniżej:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{D_0}{D}$$

Równanie (1.4.)

gdzie η to lepkość odczuwana przez próbnik w cytoplazmie komórek ssaczych, η_0 to lepkość wody, D - współczynnik dyfuzji wolnego związku w cytoplazmie, natomiast D_0 odpowiada współczynnikowi dyfuzji tego próbnika w wodzie.

Zaproponowany przez Kalwalczyka model matematyczny bazuje na dwóch skalach długości: długości korelacji, oznaczonej ξ , oraz długości wyznaczającej granicę między nano- a makrolepkością. Równanie matematyczne opisujące ten model jest następujące:

$$\ln\left(\frac{\eta}{\eta_0}\right) = \ln(A) + \left(\frac{\xi^2}{R_H^2} + \frac{\xi^2}{r_p^2}\right)^{-a/2}$$

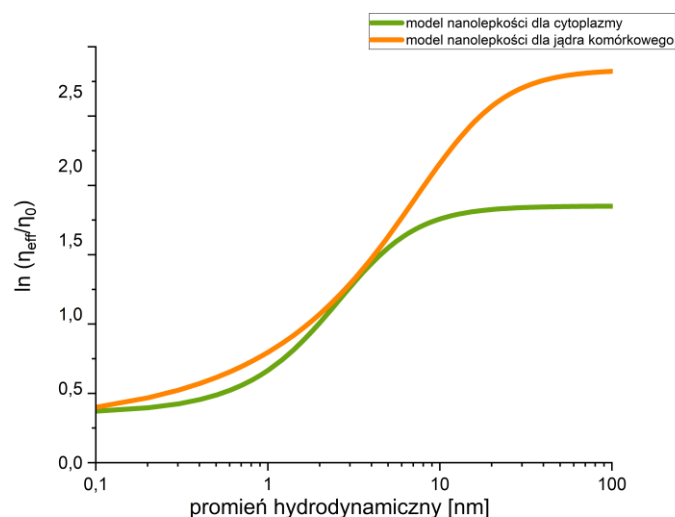
Równanie (1.5.)⁸⁹

gdzie A jest wykładnikiem rzędu jedności, ξ i R_H odnoszą się do charakterystycznej skali długości, a to wykładnik opisujący strukturę medium. Wykładnik a jest mniejszy od 1 dla roztworów zbliżonych do sztywnych kuli.⁹⁰ Z kolei r_p reprezentuje promień hydrodynamiczny danego próbника wprowadzonego do komórek.

W niniejszej rozprawie doktorskiej to właśnie model lepkości dla skali nanoskopowej, opisany Równaniem (1.5.) został wykorzystany do precyzyjnej, w pełni ilościowej, analizy interakcji wewnątrzkomórkowych i losów cząsteczek obecnych zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórek różnych typów nowotworów.

Warto w tym miejscu podkreślić, że poprawność teoretycznego modelu opisanego Równaniem (1.5.) względem cytoplazmy ludzkich komórek została eksperymentalnie potwierdzona przez Kwapiszewską i innych w trakcie badań dotyczących oligomeryzacji białka Drp1.⁹¹ Praca ta stanowi jednocześnie pierwszy przykład zastosowania modelu nanolepkości zależnej od skali długości do ilościowej interpretacji wyników FCS bezpośrednio z wnętrza żywych komórek. Z kolei poprawność modelu Kalwarczyka i innych względem jądra komórkowego została zweryfikowana eksperymentalnie przez Bubaka i innych w 2021 roku.⁸²

Równanie 1.5. opisuje funkcję wykładniczą - wraz z rozmiarem cząsteczki obecnej w komórkach (cytoplazmie lub jądrze komórkowym) odczuwany przez poruszającą się molekułę opór hydrodynamiczny wzrasta. Dla małych próbników, na przykład o promieniu hydrodynamicznym równym 0.5 nm, lepkość cytoplazmy komórek HeLa odpowiada prawie 2-krotności lepkości wody. Z kolei dla molekulu o średnicy 10 nm ta wartość to już prawie 5-krotność lepkości wody, a dla próbника o wielkości 100 nm (średnic) – niemal 14-krotność. Zatem małe cząsteczki odczuwają zatłoczenie w stopniu umiarkowanym – z uwagi na swój rozmiar nadal mogą się swobodnie przemieszczać między komponentami komórkowymi. Sytuacja zmienia się jednak dla cząsteczek większych. W miarę zwiększania skali długości, cytoplazmę czy jądro komórkowe można zatem obrazowo porównać do struktury porowatego żelu – małe cząsteczki poruszają się swobodnie, dyfundując między porami. Model nanolepkości zależnej od wielkości cząsteczki obecnej w komórce, odpowiednio dla cytoplazmy i jądra komórkowego, w formie wykresu wykładniczego przedstawiono na Rysunku 1.9.

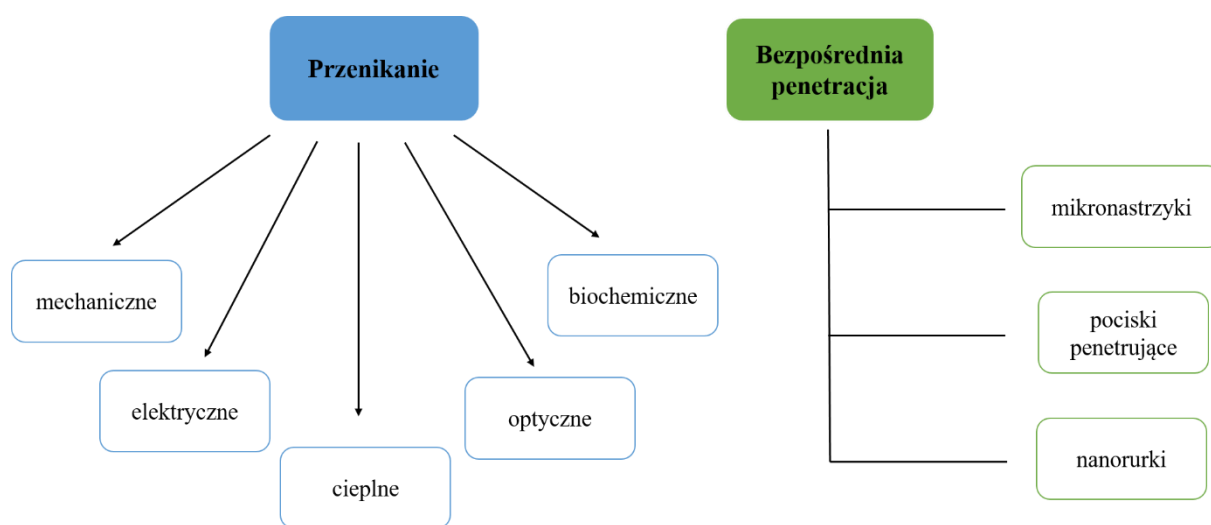


Rysunek 1.9. Graficzna prezentacji modeli nanolepkości zależnych od skali długości (Równanie 1.5.) dla cytoplazmy i jądra komórek linii HeLa.^{82,91}

1.7. Metody dostarczania cząsteczek do komórek

Każda komórka w ludzkim organizmie jest otoczona błoną komórkową, która ma za zadanie chronić komórkę przed działaniem czynników zewnętrznych i wnikaniem do jej wnętrza niepożądanych cząsteczek. Zatem błona komórkowa reguluje transport związków z i do komórki, stanowiąc pewnego rodzaju „tarczę”. W związku z tym, przekroczenie tej „tarczy” i wprowadzenie do wnętrza komórki pożądanej substancji nie jest zadaniem prostym. Leki, z założenia, powinny samodzielnie wnikać do wnętrza komórek. Jednak zdolność samodzielnego pobierania określonej cząsteczki przez komórkę zależy od wielu czynników, jak ładunek elektryczny, hydrofobowość, rozmiar molekuly czy jej powinowactwo do błony komórkowej. Jeśli więc cząsteczka, której właściwości wskazują na obiecujący potencjał terapeutyczny nie wnika do wnętrza ludzkich komórek samodzielnie, stosowane są metody intensyfikujące proces jej dostarczenia do miejsca docelowego. Warto także zaznaczyć, że termin dostarczania wewnątrzkomórkowego to etap kluczowy nie tylko w kontekście związków terapeutycznych, leków, ale generalnie większości badań biologicznych, biofizycznych, biochemicznych czy biomedycznych. Wprowadzenie pożadanego związku do wnętrza komórki jest kluczowe na przykład w eksperymentach nad celami molekularnymi nowych leków, badaniem funkcji genów/białek, znakowaniem komórek w celu oceny ich migracji w tkankach, wewnątrzkomórkowej dystrybucji nanokulek, czy tak popularnym obecnie dostarczaniem do komórek kwasów nukleinowych przy opracowywaniu szczepionek/leków opartych o zastosowanie mRNA. Takie ujęcie dostarczania substancji do ludzkich komórek wyłania duże zapotrzebowanie na technikę/techniki umożliwiające przekroczenie bariery błony komórkowej i wprowadzenie do komórki związku stanowiącego przedmiot badań. Z tego powodu, od kilku dekad naukowcy i inżynierowie opracowują metody umożliwiające dostarczanie substancji do wnętrza komórek.

W ujęciu ogólnym, wszystkie istniejące techniki można podzielić na dwie kategorie: bezpośredniej penetracji i przenikania (Rysunek 1.10.). Kategoria bezpośredniej penetracji obejmuje mikronastrzyki (mikroiniekcję), pociski penetrujące oraz zastosowanie nanorurek – struktur o średnicy kilkuset nanometrów. Każda z tych technik ma swoje określone wady i zalety. Mikronastrzyki są pierwszą wynalezioną metodą dostarczania wewnątrzkomórkowego, stosowaną przez naukowców od ponad 100. lat.⁹² To technika z wyboru, niezależnie od rodzaju związku, który chcemy do komórki wprowadzić oraz od typu komórek badanych. Jednak największą wadą standardowej mikroiniekcji jest jej niska przepustowość – nawet doświadczony eksperymentator nie jest w stanie wykonać więcej nastrzyknięć niż trzy/pięć na minutę.⁹³ Analizując pozostałe techniki w obrębie kategorii bezpośredniej penetracji, zastosowanie pocisków penetrujących – cząstek rozpędzanych do dużej prędkości poprzez falę uderzeniową – to metoda stosowana przede wszystkim do wprowadzania kwasów nukleinowych. Raportowane są różne efektywności dostarczania w zależności od rodzaju badanych komórek.⁹⁴ Jednak największą wadą tej techniki jest uszkodzenie komórek powodowane wysoką prędkością pocisków. To ograniczenie uzasadnia największą użyteczność tego rozwiązania do komórek roślinnych ze ścianą komórkową lub komórek mikroorganizmów, uniemożliwiając jednocześnie zastosowanie tej techniki do hodowli komórkowych *in vitro*.⁹⁵ Ostatnia technika w kategorii bezpośredniej penetracji to zastosowanie nanostruktur (nanorurek), po raz pierwszy wykorzystane do dostarczania plazmidów DNA. Warto jednak zaznaczyć, że nanostruktury mogą wpływać na szybkość wzrostu komórek, a także przebieg cyklu komórkowego.⁹⁶



Rysunek 1.10. Ogólny podział technik dostarczania komórkowego obejmuje przenikanie i bezpośrednią penetrację. W obrębie przenikania wyróżniono metody mechaniczne, elektryczne, cieplne, optyczne i biochemiczne. W zakres penetracji bezpośredniej wchodzi mikronastrzyki, pociski penetrujące i nanorurki.

Druga kategoria metod dostarczania komórkowego to przenikanie. W tym zakresie wyróżnia się przenikanie na drodze mechanicznej, elektrycznej, optycznej, cieplnej oraz biochemicznej – zastosowaniu rozpuszczalników organicznych, peptydów, detergentów czy toksyn modulujących przepuszczalność błony komórkowej (Rysunek 1.10.). Rozpatrując popularność metody, na szczególną uwagę zasługuje elektroporacja – tworzenie tymczasowych porów w błonie komórkowej na skutek zastosowania impulsów elektrycznych. Niewątpliwą zaletą tego

rozwiązania jest szeroki zakres cząsteczek wprowadzanych do komórek oraz użyteczność tej techniki zarówno względem komórek zwierzęcych jak i roślinnych.⁹³ Warto jednak zwrócić uwagę na doniesienia literaturowe o występujących zjawiskach agregacji wprowadzanych związków – na przykład kulek kwantowych oraz kwasów nukleinowych.^{97,98} Wydaje się jednak, że najistotniejszym problemem tej metody jest śmiertelność komórek spowodowana nieodwracalną elektroporacją, lizą lub uszkodzeniem termicznym. Co więcej, wykorzystanie elektroporacji może wywoływać powstanie reaktywnych form tlenu,⁹⁹ czy denaturację białek i uszkodzenia DNA.^{100,101} W ujęciu uniwersalności wprowadzanych substancji, w obrębie kategorii przenikania warto także zwrócić uwagę na technikę ładowania kulek, a więc mechanicznego przenikania przez bezpośredni kontakt. Technika ta oferuje szerokie spektrum substancji wprowadzanych, uwzględniając plazmidy, białka, peptydy, przeciwciała, czy kulki kwantowe.⁹³ Mimo jednoznacznej uniwersalności tej metody, największą jej wadą jest niska żywotność komórek po zakończeniu procedury dostarczania. Dodatkowo, skala uszkodzenia błony komórkowej w wyniku tego rozwiązania jest bardzo zróżnicowana względem pojedynczych komórek. W konsekwencji naukowiec stosujący tę technikę analizuje populację komórek o bardzo zróżnicowanej zawartości pożądanego związku. Warto także nadmienić, że specyfika procedury ładowania kulek wyklucza stosowanie drogich cząsteczek skoncentrowanych w małej objętości oraz badania komórek w zawiesinie – użyteczność tej techniki dotyczy tylko komórek adherentnych.⁹³

Podsumowując, portfolio technik dostarczania wewnątrzkomórkowego jest obszerne. Jednak ograniczenia i wady każdej z tych metod w ujęciu żywotności komórek, typu badanego związku, skuteczności względem konkretnych rodzajów komórek czy czasochłonności i przepustowości techniki, skłaniają naukowców do nieustannego poszukiwania nowych rozwiązań. Zestawienie wag/ograniczeń poszczególnych metod dostarczania cząsteczek do wnętrza komórek przedstawiono na w Tabeli 1.1.

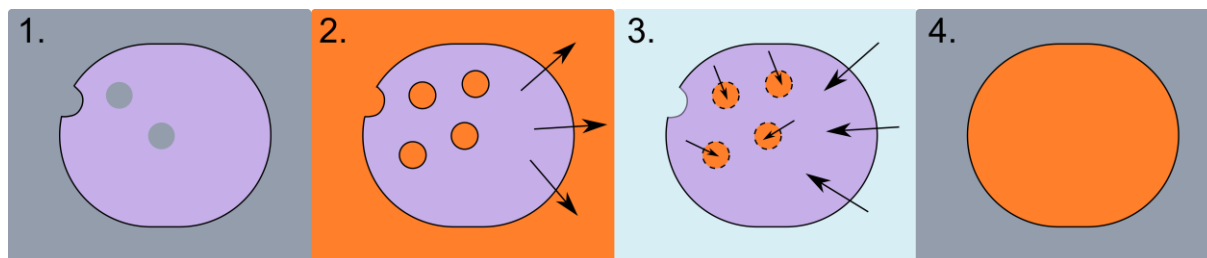
Tabela 1.1. Ograniczenia i wady najbardziej uniwersalnych metod dostarczania wewnątrzkomórkowego.

Metoda dostarczania wewnątrzkomórkowego	Wady/ograniczenia
Bezpośrednia penetracja	
Mikronastryki	<ul style="list-style-type: none"> – Niska przepustowość – Mechaniczny stres komórek i analiza pojedynczych, nastrzykniętych komórek a nie całej populacji – Konieczność posiadania specjalistycznego sprzętu – Czasochłonność
Pociski penetrujące	<ul style="list-style-type: none"> – Użyteczność głównie względem komórek roślinnych i mikroorganizmów z uwagi na mechaniczne uszkodzenie komórek – Stosowalność głównie względem kwasów nukleinowych, z różną efektywnością względem różnych linii komórkowych
Nanorurki	<ul style="list-style-type: none"> – Modulacja czynności fizjologicznych komórek – Konieczność zrozumienia wpływu rozmiaru nanorurki, czynnej siły i funkcjonalizacji powierzchni na efektywność metody
Przenikanie	
Elektroporacja	<ul style="list-style-type: none"> – Mechaniczne uszkodzenie komórek – Modulacja procesów wewnątrzkomórkowych – Agregacja niektórych typów cząsteczek wprowadzanych do komórek – Konieczność posiadania specjalistycznego sprzętu
Ładowanie kulek	<ul style="list-style-type: none"> – Mechaniczne uszkodzenie komórek – Czasochłonny protokół, dostosowany tylko dla komórek adherentnych – Nierównomierne dostarczanie

Dostarczanie wewnątrzkomórkowe z zastosowaniem różnic ciśnienia osmotycznego

Jednym ze sposobów dostarczania cząsteczek do komórek ssących w obrębie kategorii przenikania na drodze mechanicznej jest zastosowanie szoku osmotycznego.⁹³ Technika ta po raz pierwszy została opisana w 1982 roku.¹⁰² Jej zasada jest oparta na przepływie wody z roztworu o niższym ciśnieniu osmotycznym (medium hipotonicznego) do roztworu o wyższym ciśnieniu osmotycznym (medium hiper-tonicznego) poprzez przepuszczalną dla wody błonę komórkową otaczającą każdą komórkę w ludzkim organizmie. W pierwszym etapie tego procesu badane komórki są umieszczane w roztworze hipertonicznym, a woda z komórki wypływa, celem wyrównania ciśnień osmotycznych. Równolegle zachodzi ciągła pinocytoza rozumiana jako wgłębienie błony komórkowej, a następnie utworzenie pęcherzyka wewnątrzkomórkowego. Uzyskane w ten sposób pęcherzyki w swoim wnętrzu zawierają: a) związek, który naukowiec chciał do komórki wprowadzić, b) pozostałe składniki medium hipertonicznego. W kolejnym etapie komórki dynamicznie przenoszone są do roztworu o wysokim stężeniu wody – hipotonicznego. W tym momencie woda wpływa do komórek (cytoplazmy) ale także do utworzonych wcześniej pęcherzyków wewnątrzkomórkowych. W konsekwencji następuje pęknięcie błon pęcherzyków i uwolnienie ich zawartości do wnętrza komórek. W końcowym etapie komórki przenoszone są do roztworu izotonicznego.¹⁰³

Procedura dostarczania związków do komórek z zastosowaniem zmian ciśnienia osmotycznego została schematycznie przedstawiona na Rysunku 1.11.



Rysunek 1.11. Schematyczne przedstawienie procedury dostarczania wewnątrzkomórkowego szoku osmotycznym. 1) Komórka występuje w naturalnym środowisku – roztworze izotonicznym. 2) Umieszczenie komórki w roztworze hipertonicznym zawierającym polimer osmotycznie czynny i związek, który eksperymentator chce do komórki wprowadzić. Podczas tego etapu woda wypływa z komórki (kierunek zaznaczony strzałkami) celem wyrównania ciśnienia osmotycznego układu. Równolegle zachodzi ciągła pinocytoza, podobnie jak w etapie 1. Jednak w wyniku stresu osmotycznego, pinocytoza na etapie 2 jest wzmożona. 3) Przeniesienie komórki do roztworu hipotonicznego i napływ wody do jej wnętrza (kierunek zaznaczony strzałkami). Ten napływ wody dotyczy też pęcherzyków wewnątrzkomórkowych. Jako konsekwencja tego procesu, pęcherzyki pękają, a ich zawartość zostaje uwolniona do wnętrza komórek. 4) Komórka jest umieszczana w roztworze izotonicznym. W wyniku opisanego procesu, pożądany związek jest obecny we wnętrzu badanej komórki. Rysunek stworzony na podstawie publikacji Karpińskiej i innych.¹⁰³

Rozpatrując składy poszczególnych roztworów stosowanych w tej metodzie, podstawowym składnikiem medium hipertonicznego jest polimer budujący ciśnienie osmotyczne. Jak potwierdzają dane literaturowe, o powodzeniu lub jego brak procesu dostarczania komórkowego z zastosowaniem szoku osmotycznego decyduje skład roztworu hipertonicznego. Okada i Rechsteiner¹⁰² uzyskali wysokie ciśnienie osmotyczne, używając 0,5 mol/l sacharozy z dodatkiem 10% w/w PEG o masie cząsteczkowej 1 kDa. Autorzy publikacji przeprowadzili także eksperymenty dotyczące zastąpienia polimeru PEG dekstranem o masie molowej 10 kDa. Uzyskane przez nich wyniki wykazały, że skuteczniejszy we wprowadzaniu związków do komórek jest roztwór hipertoniczny oparty o PEG. Nad zastosowaniem zmian ciśnienia osmotycznego w dostarczaniu wewnątrzkomórkowym pracowali także Chadha i inni, którzy w tym celu zastosowali 20% PEG. Co istotne, testowany przez nich roztwór hipertoniczny był pozbawiony sacharozy,¹⁰⁴ w przeciwieństwie do badań Okady. Z kolei Aoki ze współautorami otrzymali satysfakcjonujące wyniki poprzez zwiększenie stężenia sacharozy do 2 mol/l, w połączeniu z PEG o masie cząsteczkowej 1 kDa.¹⁰⁵ Przytoczone doniesienia literaturowe generują więc pytania: 1) czy sama sacharoza jest wystarczająca do przeprowadzenia skutecznego dostarczenia wewnątrzkomórkowego szoku osmotycznym oraz 2) jaka jest rola polimeru osmotycznie czynnego w tym procesie.

1.8. Podsumowanie wstępu literaturowego

W ujęciu walki z nowotworami, którą toczy cały świat, lekarze i biolodzy molekularni współpracują, rozwijając i wprowadzając do kliniki kolejne terapie celowane – leczenie skierowane na konkretny składnik komórki nowotworowej, na przykład białko czy szlak sygnałowy. W zakresie dwóch typów nowotworów kobiecych: potrójnie ujemnego raka piersi i raka szyjki macicy, przykładami celowanego leczenia są cząsteczki o nazwach olaparib, bewacizumab, pembrolizumab, sacituzumab, czy erlotynib. Warto jednak podkreślić, że wprowadzenie wybranego leku celowanego do stosowania klinicznego wymaga przeprowadzenia odpowiednich badań klinicznych. Wiadomo, że badania te obejmują wiele

faz, kosztują kilka miliardów dolarów i trwają od 10 do 15 lat. Choć proces ten jest kosztowny i czasochłonny, wiele kandydatów na leki nie uzyskuje zatwierdzenia, głównie ze względu na niewystarczającą skuteczność terapeutyczną lub nieakceptowalne działania niepożądane.

Aby lek opracowywany w reżimie terapii celowanych wywołał pożądaną efekt kliniczny, musi działać w miejscu występowania jego celu molekularnego. Zatem na przykład, jeśli związek terapeutyczny ma zahamować aktywność konkretnego enzymu wewnątrzkomórkowego, musi wnikać do komórek i zadziałać w ich wnętrzu. Z kolei leki, których określony fragment reaguje z cząsteczkami występującymi na zewnątrz komórki, powinny występować zewnątrzkomórkowo. Zatem w zależności od miejsca działania terapeutyka, jego wnikanie do komórek może zachodzić lub nie, będąc jednocześnie procesem pożądanym bądź niepożądanym.

Istnieje wiele technik badawczych pozwalających określić, czy zachodzi proces wnikania cząsteczki do ludzkich komórek. Wśród tych metod znajdują się między innymi obrazowanie fluorescencyjne czy popularna cytometria przepływowa. W obliczu potencjalnych oszczędności, zarówno pod względem kosztów, jak i czasu, związanych z badaniami klinicznymi, w niniejszej rozprawie doktorskiej zweryfikowano potencjał zastosowania techniki FCS do ilościowej charakterystyki wnikania różnych cząsteczek do wnętrza komórek nowotworowych. Dla molekuł obecnych we wnętrzu komórek, przeprowadzono analizę mającą na celu określenie ich losów wewnątrzkomórkowych. Tego typu badania przeprowadzone jeszcze na etapie badań laboratoryjnych są istotne w ujęciu selekcji najbardziej obiecujących kandydatów na leki, trafiających następnie do fazy badań klinicznych. Bowiem, jeśli lek, który z założenia powinien wnikać do komórek, nie jest w nich obecny, dalsze i kosztowniejsze badania nad nim wydają się być niezasadne.

Metoda FCS jest oparta na pomiarze mobilności cząsteczek fluorescencyjnych w obrębie ogniska detekcji. To technika wyjątkowo czuła, umożliwiająca analizę cząsteczek w zakresie fizjologicznych stężeń (rzędu nM), dostarczająca informacji o współczynniku dyfuzji badanego związku. Parametr ten, w połączeniu z modelem nanolepkości wnętrza komórek nowotworowych zależnym od skali długości, pozwala określić, czy dana cząsteczka występuje w stanie wolnym, niezwiązany, czy też uległa agregacji, degradacji lub jest związana z komponentami wewnątrzkomórkowymi. Dodatkowo, dla każdej frakcji powstałej w wyniku wnikania badanej cząsteczki do komórek możliwe jest określenie jej stężenia, co umożliwia ilościową ocenę stopnia penetracji związku do wnętrza komórek, przy znajomości jego stężenia w środowisku zewnętrznym. Warto podkreślić, że technika FCS umożliwia pomiary na poziomie pojedynczych cząsteczek oraz pojedynczych komórek.

Bazując na technice FCS jako podstawowej metodzie badawczej, w niniejszej pracy dokonano charakterystyki wnikania różnych, wybranych cząsteczek, jak leki, terapeutyczne białka i dinukleotydy. Dla każdej z nich na poziomie ilościowym określono, co dzieje się z molekułą po wnikięciu do komórki nowotworowej. Jako metodę wspierającą, jakościową, zastosowano obrazowanie konfokalne/FLIM. Równolegle, w ramach rozprawy doktorskiej zgłębiono także tematykę prostej i szybkiej metody wprowadzania cząsteczek do ludzkich komórek z zastosowaniem różnic ciśnienia osmotycznego. Uzyskane wyniki (Rozdział 3.7.) stały się podstawą opracowania odczynnika o nazwie Cell-IN. Odczynnik ten jest przedmiotem komercjalizacji prowadzonej w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk (lider inicjatywy: autor niniejszej pracy - Aneta Magiera).

2. Materiały i metody

Odczynniki

Do wyznaczenia krzywej nanolepkości cytoplazmy komórek linii MDA-MB-231 zastosowano dekstrany znakowane izotiocyjanianem tetrametylorodaminy (TRITC-dekstrany, Sigma-Aldrich), nanocząstki pokryte PEG (Siliquan, Polska), kalceinę-AM (Sigma-Aldrich), spontanicznie pobieraną przez komórki, oraz odpowiednie plazmidy, które w wyniku transfekcji pozwalały na detekcję ekspresji białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (EGFP). Znakowane dekstrany oraz nanocząstki zostały wprowadzone do komórek przy użyciu odczynnika Cell-IN (<https://cell-in.eu/>, Polska). Białko zielonej fluorescencji (GFP, numer produktu 14-392) zostało zakupione w Sigma-Aldrich.

Pochodna fluorescencyjna leku olaparib o nazwie PARPi-FL, pochodziła z firmy Tocris Bioscience (numer katalogowy 6461, Wielka Brytania). Stosowany do badań roztwór leku przygotowano zgodnie z protokołem producenta, rozpuszczając 1 mg PARPi-FL w 1,56 ml sterylnym dimetylosulfotlenku (DMSO, Sigma-Aldrich) do stężenia 1 mM. Tak przygotowany odczynnik przechowywano w temperaturze -20°C w sterylnych warunkach.

Białko PARP1 użyte do określenia promienia hydrodynamicznego kompleksu [białko - PARPi-FL] i określenia stałej równowagi w buforze zostało zakupione od Thermo Fischer Scientific (Stany Zjednoczone). Nazwa produktu to Human PARP1 His-Tag Recombinant Protein (numer katalogowy A42574). Białko rozpuszczono w buforze zawierającym 50 mM 2-amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diolu (TRIS, Carl Roth), 100 mM chlorku sodu (Avantor) i 10% glicerolu (Sigma-Aldrich). Otrzymany w ten sposób roztwór do badań został następnie rozcieńczony do stężenia roboczego w sterylnym roztworze soli fizjologicznej (PBS, Sigma-Aldrich) i przechowywany w temperaturze -20°C w sterylnych warunkach.

Zdolność białka PARP1 do wiązania się z cząsteczką RNA określono przy użyciu produktu firmy Thermo Fischer Scientific o nazwie RNA Control 250 (numer katalogowy AM7155). Roztwór przechowywano w temperaturze -20°C.

Bewacizumab (Avastin®) zastosowany do badań procesu jego internalizacji został zakupiony z firmy Selleck Chemicals LLC (Stany Zjednoczone, numer katalogowy A2006). Zgodnie z zaleceniami producenta, stężony roztwór przechowywano w temperaturze 4°C w ciemności. Eksperymenty przeprowadzono w ciągu trzech miesięcy od otrzymania odczynnika, aby uniknąć degradacji przeciwciała. Roztwór leku przechowywano w sterylnych warunkach.

Interakcje między bewacizumabem a VEGF-A zbadano przy użyciu rekombinowanego ludzkiego białka VEGF-A (ab55566) zakupionego od Abcam (Wielka Brytania). Temperatura jego przechowywania wynosiła -20°C. Unikano wielokrotnych cykli zamrażania/rozmarzania, aby utrzymać aktywność białka.

Konjugaty analogów dinukleotydów 5', 5' – trifosforanowych cap z cholesterolem (m⁷GpppA-FAM-Chol) i kwasem foliowym (m⁷GpppA-FAM-FA) zostały zsyntetyzowane przez Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego i otrzymane w ramach współpracy naukowej.¹⁰⁶

Znakowane barwnikiem Alexa Fluor 568 ferrytyna (Ft-568) oraz hemoglobina (Hb-568), zarówno z barwnikiem przyłączonym do grup aminowych, jak i cysteinowych, otrzymano w ramach współpracy z firmą Cellis Sp. z o.o. oraz Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Do pomiarów Ft-568 w buforze w pH neutralnym (pH = 7.4) oraz kwaśnym (pH = 2.4) zastosowano roztwory PBS, których pH ustalono za pomocą roztworu kwasu solnego. Z kolei w celu wyznaczenia rozmiarów monomeru, dimeru i tetrameru Hb-568 zastosowano medium RPMI-1640 pozbawione płodowej surowica bydlęcej (FBS) (pomiar tetrameru) oraz 0.1 M roztwór NaHCO₃ o pH = 8.0 do pomiaru wielkości dimeru i monomeru. Do uzyskania odpowiedniego pH roztworów wykorzystano pH-metr Hanna instruments, HI 2221 Calibration Check pH/ORP Meter.

Barwnik YO-PRO-1 został zakupiony w firmie Invitrogen (Stany Zjednoczone) i rozcieńczony w buforowanym fosforanem roztworze PBS (pH = 7,4; 0,01 mM buforu fosforanowego, 0,0027 M chlorku potasu i 0,137 M chlorku sodu). W eksperymencie kolokalizacji YO-PRO-1 zastosowano DAPI (Thermo Fisher Scientific), formaldehyd (Sigma-Aldrich) oraz Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific).

Do eksperymentów (opisanych w Rozdziale 3.6.), polegających na badaniu wpływu leków na wnikanie YO-PRO-1 do komórek użyto rapamycyny (Sigma-Aldrich) oraz chlorowodoru doksorubicyny (Sigma-Aldrich).

Plazmidy DNA kodujące różne warianty oligomeryczne białka PRMT1, znakowanego EGFP, otrzymano w ramach współpracy naukowej z Uniwersytetem w Utah (Stany Zjednoczone). Poszczególne, badane, warianty oznaczono literami od A do E. Wprowadzenie plazmidów PRMT1 do komórek (proces transfekcji) zostało przeprowadzone z użyciem komercyjnego odczynnika jetPrime®, zgodnie z protokołem producenta.

Fluorescencyjne konjugaty TRITC-dekstranów, użyte do badań opisanych w Rozdziale 3.7., o masach cząsteczkowych 4,4 kDa (numer produktu T1037), 20 kDa (numer produktu 73766), 40 kDa (numer produktu 42874), 75 kDa (numer produktu T1162) i 155 kDa (numer produktu T1287) oraz GFP (numer produktu 14-392) zostały zamówione w firmie Sigma-Aldrich. Pokryte PEG fluorescencyjne nanocząstki krzemionkowe wypełnione rodaminą B pochodziły z firmy Siliquan (<https://siliquan.com/>). Plazmid pmEGFP-C1 to prezent od Benjamin Glicka (plazmid Addgene #36412). Plazmid CRISPR (numer produktu CRISPR06) został zakupiony w Sigma-Aldrich. Oba plazmidy były przechowywane w temperaturze -20°C. Jednoniciowe DNA (ssDNA) 13 nt znakowane barwnikiem ATTO 488 zamówiono w firmie IBA GmbH (Niemcy). Liofilizowany produkt zawieszono w buforze Tris-EDTA do stężenia 100 µM. Tak przygotowany roztwór przechowywano w temperaturze -20°C. Sekwencja DNA: 3' ATCGTG TAGGCAT 5'.

Dekstrany budujące ciśnienie osmotyczne o masach cząsteczkowych 10 kDa (numer produktu D9260), 40 kDa (numer produktu 31389) i 70 kDa (numer produktu 31390), Ficoll® 400 kDa (numer produktu F8016) i glikol polietylenowy 1 kDa (numer produktu 8.07488) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich. PEG o masie cząsteczkowej 35 kDa pochodził z Fluka BioChemika.

Material biologiczny

○ Hodowla komórek linii MDA-MB-231

Komórki MDA-MB-231 pochodziły z ATCC (Stany Zjednoczone). Linię komórkową hodowano w formie standardowej monowarstwy w kompletnej pożywce wzrostowej, uzupełnionej 10% v/v FBS (Gibco), 1% v/v roztworem L-glutaminy (Sigma-Aldrich) i 1% v/v roztworem antybiotyków: streptomycyny [10 mg/ml] i penicyliny [10 000 U/ml] (Sigma-Aldrich).

Komórki hodowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Jako pożywkę podstawową zastosowano RPMI-1640 z wodorowęglanem sodu i bez L-glutaminy (Sigma-Aldrich). Przeprowadzając regularne pasaże z użyciem PBS (Sigma-Aldrich) oraz 0,25% roztworu trypsyny-EDTA (Sigma-Aldrich), komórki utrzymywano w logarytmicznej fazie wzrostu. Proces trypsynizacji był kontrolowany za pomocą mikroskopii świetlnej.

Do pomiarów terapeutycznych dinukleotyków (Rozdział 3.4.), komórki tej linii hodowano w warunkach deficytu kwasu foliowego, w medium RPMI-1640 bez kwasu foliowego (Gibco), uzupełnionym 10% v/v FBS, 1% v/v roztworem L-glutaminy i 1% v/v roztworem antybiotyków: streptomycyny [10 mg/ml] i penicyliny [10 000 U/ml]. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na komórkach między 15. a 19. pasażem.

Makrofagi, wchodzące w skład badanych kultur hodowlanych w ramach pomiarów Ft-568, pochodziły z linii komórkowej THP-1, ludzkiej ostrej białaczki monocytowej (ATCC, TIB-202™). Makrofagi te otrzymano w ramach współpracy z firmą Cellis Sp. z o.o. oraz Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Proces różnicowania komórek THP-1 do makrofagów został opisany w publikacji naukowej.¹⁰⁷

○ Hodowla komórek linii HeLa

Linia komórkowa HeLa pochodziła z ATCC. Hodowlę tych komórek prowadzono analogicznie do komórek MDA-MB-231, przy czym podstawowe podłoże hodowlane stanowił Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) z dodatkiem 1 g/l glukozy (Instytut Immunologii i Techniki Doświadczalnej, Wrocław, Polska).

Sferoidy wielokomórkowe opisane w Rozdziale 3.2. otrzymano poprzez hodowlę komórek na antyadhezyjnej powierzchni - naczyniu Nunclon™ Sphera™ (ThermoFisher Scientific). Komórki hodowano w 37°C i atmosferze 5% stężenia CO₂, z zastosowaniem kompletnego podłoża hodowlanego bez czerwieni fenolowej, odpowiedniego dla MDA-MB-231 lub HeLa. Piątego dnia hodowli zawiesinę komórkową przeniesiono na 8-dołkową szalkę ze szklanym dnem (CellVis), na której osadzono sferoidy i przeprowadzono wszystkie eksperymenty. Protokół przygotowania hodowli 3D kompatybilnej z pomiarami FCS został opracowany wcześniej¹⁰⁸ i zastosowany do niniejszych badań.

○ Hodowla komórek linii MCF-7, A549, U2-OS, HEK 293, Hep G2 oraz fibroblasty

Komórki badanych linii MCF-7, A549, U2-OS, HEK 293, Hep G2 oraz fibroblasty pochodziły z ATCC i były hodowane w formie monowarstw w medium hodowlanym uzupełnionym 10%

v/v FBS, 1% v/v L-glutaminą oraz 1% v/v antybiotykami: streptomycyną [10 000 U/ml] i penicyliną [10 mg/ml]. W przypadku linii MCF-7 medium hodowlane zostało dodatkowo wzbogacone o 0,1% insuliny. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C i 5% stężeniu CO₂. Linie komórkowe HeLa, A549, U2-OS, HEK 293, MCF-7, Hep G2 i fibroblasty prowadzono w DMEM z dodatkiem 1 g/l glukozy. Komórki utrzymywano w logarytmicznej fazie wzrostu. Do oderwania komórek od powierzchni używano 0,25% roztworu trypsyny-EDTA.

Aparatura badawcza

o Zestaw Spektroskopii Korelacji Fluorescencji, FCS

Pomiary FCS przeprowadzono na mikroskopie konfokalnym Nikon Eclipse TE2000U połączonym z modulem Pico Harp 300 FCS (PicoQuant, Niemcy) przy użyciu obiektywu 60x (N.A. 1.2) z imersją wodną. Fluorescencja badanych cząsteczek była wzbudzana przy użyciu pulsacyjnego lasera diodowego o długości fali 488 lub 561 nm. Fotony fluorescencji były zbierane przez detektor SPAD (MPD i PerkinElmer). Na drodze optycznej przed detektorem umieszczono filtry, w zależności od długości fali wzbudzenia, 488 typu *long pass* (Chroma, Stany Zjednoczone) lub 593/46 (Chroma, Stany Zjednoczone). Przed każdym pomiarem FCS określano objętość detekcji, wykonując kalibrację z użyciem nanomolarnego roztworu rodaminy 110 (Sigma-Aldrich) lub rodaminy B (Sigma-Aldrich) w PBS. Dla pomiarów FCS wewnątrz żywych komórek, kalibrację przeprowadzano z użyciem tych barwników, rozpuszczonych w 2,5% w/w glukozy w PBS. W ten sposób zapewniono współczynnik załamania światła roztworu kalibracyjnego zbliżony do badanego środowiska (cytoplasma komórek).⁸⁸ Zadaną temperaturę (25 ± 0,5°C lub 36 ± 0,5°C) utrzymywano za pomocą komory klimatycznej (Okolab, Włochy). Uzyskane dane eksperymentalne FCS (krzywe/funkcje autokorelacji FCS) analizowano z zastosowaniem oprogramowania QuickFit 3.0 (DKFZ, Niemcy), dopasowując odpowiedni model matematyczny. Równanie (zastosowany model) zastosowane do opisu danych eksperymentalnych zamieszczono poniżej.

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\theta_{trip}}{1 - \theta_{trip}} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{trip}}\right) \right) \sum_{i=1}^n A_i \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_{Di}}\right)^\alpha} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{\kappa^2} \left(\frac{\tau}{\tau_{Di}}\right)^\alpha}}$$

Równanie (2.1.)

gdzie N to całkowita liczba cząsteczek w objętości detekcyjnej, θ_{trip} oznacza frakcję cząsteczek w stanie trypletowym, τ_{Di} to czas dyfuzji i-tego składnika dyfundującego, A_i to amplituda składnika i-tego, natomiast α oznacza współczynnik anomalności ($\alpha = 1$ dla dyfuzji normalnej, $\alpha < 1$ dla dyfuzji anomalnej). κ odnosi się do współczynnika proporcji Gaussa używanego do określenia wielkości objętości detekcji i wyznaczanego podczas kalibracji. Parametr κ ma określoną wartość, zawsze z zakresu 5,5 - 6,5.

○ **Mikroskopia konfokalna i FLIM**

Za pomocą mikroskopu konfokalnego Nikon Eclipse TE2000U dokonano oceny jakościowej wnikania/dostarczania do wnętrza ludzkich komórek wszystkich badanych w niniejszej pracy cząsteczek fluorescencyjnych.

Obrazowanie FLIM wykonano przy użyciu trybu FLIM oprogramowania SymphoTime. Czas naświetlania każdego pojedynczego piksela przez laser wynosił 60 μ s. We wszystkich eksperymentach wykonano 10 skanów dla pojedynczego zdjęcia. Z uwagi na fakt, że laser o długości fali 488 nm indukuje również autofluorescencję komórek (głównie FADH₂) zastosowano filtrowanie po czasach życia fluorescencji: czas życia fluorescencji krótszy niż 2,4 ns był traktowany jako autofluorescencja. Piksele z czasem życia autofluorescencji poniżej 2,4 ns zostały zaznaczone na niebiesko, a piksele z czasem życia fluorescencji powyżej 2,6 ns traktowano jako sygnał pochodzący od konkretnej badanej cząsteczki i zaznaczono kolorem czerwonym.

Procedury przeprowadzone w buforach (in vitro)

○ **Pomiary FCS w buforze**

Szczegóły dotyczące pomiarów FCS w buforze, rozumianych jako pomiary poza komórką, dla określonych cząsteczek fluorescencyjnych, zamieszczono w tabelach na początku każdego rozdziału wyników. Za każdym razem, do danych eksperymentalnych został dopasowany model opisany Równaniem (2.1.). Moc lasera dla wszystkich pomiarów *in vitro* wynosiła 10 μ W.

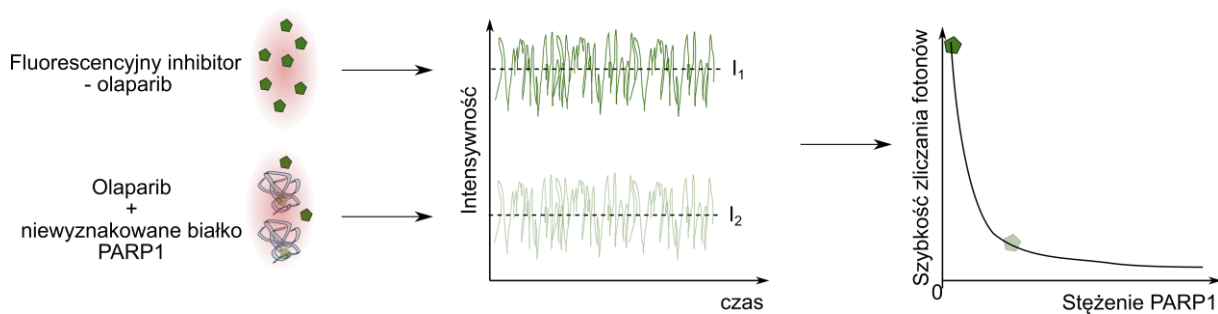
Parametrem uzyskanym z dopasowania odpowiedniego modelu do danych był czas dyfuzji τ_D badanej cząsteczki. Na podstawie wartości τ_D obliczano następnie współczynnik dyfuzji, stosując Równanie (1.1.).

Dysponując współczynnikiem dyfuzji badanej cząsteczki, w kolejnym kroku wyznaczano jej promień hydrodynamiczny, stosując Równanie Stokesa-Sutherlanda-Einsteina (Równanie (1.2)).

Schemat pomiarów FCS w buforze został przedstawiony na Rysunku 2.1.

○ **Metoda jasności molekularnej na przykładzie reakcji PARP1-PARPi-FL**

Stała równowagi kompleksu [PARP1 – inhibitor] w buforze (*in vitro*) została określona przy użyciu opisanej wcześniej metody pomiaru jasności molekularnej^{109,110} opartej na zmianie MB podczas reakcji. Schematycznie metodę tę przedstawiono na Rysunku 2.2.



Rysunek 2.1. Schemat metody jasności molekularnej na przykładzie reakcji białko-PARPi-FL. Intensywność fluorescencji próbki zawierającej jedynie wolny, swobodnie dyfundujący inhibitor, olaparib, (I_1) jest wyższa od intensywności fluorescencji próbki olaparibu po dodaniu do niej określonego stężenia białka PARP1 – celu molekularnego dla olaparibu, z którym ulega związaniu ($C_{protein} \gg C_{inhibitor}$). Zatem $I_1 > I_2$. Wykonując serię pomiarów dla stałego, zadanego, stężenia inhibitora i rosnącego stężenia białka, otrzymano krzywą zależności szybkości zliczania fotonów od stężenia PARP1, na podstawie której wyznaczono stałą równowagi reakcji białko - inhibitor.

Cząsteczka inhibitora związana z białkiem emituje mniejszą liczbę fotonów w porównaniu do samodzielnego, swobodnie dyfundującego, inhibitora.

MB zdefiniowano jako:

$$MB = \frac{I}{N_{\text{cząsteczek}}}$$

Równanie (2.2.)

gdzie I oznacza intensywność fluorescencji, mierzoną jako liczbę zarejestrowanych fotonów, a $N_{\text{cząsteczek}}$ to liczba cząsteczek obecnych w objętości detekcji, ustalonej podczas kalibracji.

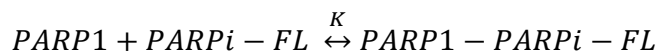
Celem określenia intensywności fluorescencji wolnego inhibitora zastosowano Równanie (2.3.).

$$I_1 = V_0 \cdot N_A \cdot C_{\text{PARPi-FL}} \cdot \alpha$$

Równanie (2.3.)

gdzie V_0 [dm^3] to objętość detekcji zdefiniowana podczas kalibracji, N_A oznacza liczbę Avogadro, $C_{\text{PARPi-FL}}$ [M] to stężenie inhibitora równe 10 nM, natomiast α odnosi się do MB swobodnie dyfundującego, wolnego, PARPi-FL.

Dla reakcji PARPi-FL z białkiem PARP1 można zapisać Równanie (2.4.).



Równanie (2.4.)

Z kolei wyrażenie na stałą równowagi między PARP1 a PARPi-FL jest określone wzorem zamieszczonym poniżej:

$$K = \frac{C_{\text{PARP1-PARPi-FL}}^{eq}}{C_{\text{PARP1}}^{eq} \cdot C_{\text{PARPi-FL}}^{eq}} = \frac{C_{\text{PARP1-PARPi-FL}}^{eq}}{(C_{\text{PARP1}} - C_{\text{PARP1-PARPi-FL}}^{eq}) \cdot (C_{\text{PARPi-FL}} - C_{\text{PARP1-PARPi-FL}}^{eq})}$$

Równanie (2.5.)

Powyższe Równanie (2.5.) można rozwiązać jako:

$$C_{PARP1-PARPi-FL}^{eq} = \frac{1}{2} \cdot \left(C_{PARP1} + C_{PARPi-FL} + \frac{1}{K} - \sqrt{\left(-C_{PARP1} - C_{PARPi-FL} - \frac{1}{K} \right)^2 - 4 \cdot C_{PARP1} \cdot C_{PARPi-FL}} \right)$$

Równanie (2.6.)

Kompleks [białko – inhibitor] emituje MB niższą od MB wolnego olaparibu. Jasność molekularną MB kompleksu określono jako γ .

Po utworzeniu kompleksu wykrywana fluorescencja pochodzi od dwóch cząsteczek: kompleksu [białko - PARPi-FL] i swobodnie dyfundującego PARPi-FL. Zatem wyrażenie na intensywność fluorescencji kompleksu [białko – inhibitor] przedstawiono w Równaniu (2.7.).

$$I_2 = V_o \cdot N_A \cdot (\alpha \cdot C_{PARPi-FL}^{eq} + \gamma \cdot C_{PARPi-FL-PARP1}^{eq})$$

Równanie (2.7.)

Określając intensywność fluorescencji dla różnych stężeń białka PARP1 przy zadanym (= 10 nM) stężeniu wolnego inhibitora, można wyznaczyć krzywą korelacji szybkości zliczania fotonów od stężenia białka. Im wyższe stężenie badanego białka PARP1, tym niższa wartość intensywności z uwagi na wiązanie fluorescencyjnego PARPi-FL w struktury białka. Do otrzymanych danych eksperymentalnych dopasowano model opisany Równaniem (2.8.), wynikający z przekształcenia Równania (2.7.) w oparciu o wyrażenie na stałą równowagi.

$$I_2 = V_o \cdot N_A \cdot \alpha \cdot [C_{PARPi-FL} - C_{PARPi-FL-PARP1}^{eq}] \left[1 + \frac{\gamma}{\alpha} K \cdot (C_{PARP1} - C_{PARPi-FL-PARP1}^{eq}) \right]$$

Równanie (2.8.)

○ Procedura znakowania bewacizumabu

Procedurę znakowania przeciwciała bewacizumab przeprowadzono, stosując barwnik estrowy Atto 488 NHS (Sigma-Aldrich). Próbkę oczyszczano przy użyciu kolumn Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 2 mL (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) i wirówki MPW 260 firmy MPW MED. INSTRUMENTS (Polska). Wszystkie wirowania wykonano w tych samych warunkach: czas wirowania: 2. minuty, prędkość wirowania: 1000 g.

Przed znakowaniem przeciwciała przepuszczono przez kolumnę (przez wirowanie) w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń. W kolejnym kroku do roztworu przeciwciała dodano odpowiednią objętość roztworu barwnika w DMSO. Stosunek molowy między barwnikiem a przeciwciałem wynosił 4:1. Po 1. godzinie inkubacji w temperaturze pokojowej, do roztworu barwnika z badanym lekiem dodano 0,5 M bufor TRIS-HCl o pH 6,8 w 4-krotnym nadmiarze użytej objętości barwnika. W kolejnym kroku przystąpiono do oczyszczania przeciwciała z wolnego barwnika, przeprowadzonego zgodnie z protokołem producenta kolumny. Otrzymany przesącz zawierał oczyszczony, znakowany bewacizumab. W celu potwierdzenia braku

wolnego barwnika w próbce znakowanego przeciwciała, po kilkukrotnym wirowaniu (przepuszczeniu) na kolumnach, wykonano pomiary kontrolne FCS *in vitro*.

Procedury przeprowadzone na żywych komórkach (in vivo)

○ Pomiary FCS bezpośrednio w żywych komórkach

Pomiary FCS bezpośrednio we wnętrzu żywych, pojedynczych, komórek rozpoczynano od spozycjonowania ogniska detekcji w cytoplazmie wybranej komórki ($2 \pm 0,5 \mu\text{m}$ nad powierzchnią szkła) z zastosowaniem trybu obrazowania mikroskopu. Do pomiarów wybierano komórki o morfologii wrzecionowatej, typowej dla żywych komórek adherentnych. Podobnie jak *in vitro*, we wszystkich eksperymentach *in vivo* moc lasera wynosiła $\sim 10 \mu\text{W}$. Następnie, zastosowany układ pomiarowy wraz z wykorzystaniem oprogramowania SymphoTime (PicoQuant, Niemcy) umożliwił uzyskanie zapisu fluktuacji fluorescencji cząsteczek obecnych w objętości detekcyjnej, której wielkość została określona w trakcie kalibracji. W ramach każdego eksperymentu *in vivo*, badano 10 różnych komórek, wykonując minimum 3 pomiary na komórkę trwające po 60 sekund każdy (w przypadku bewacizumabu – 120 s). Schemat pomiarów FCS we wnętrzu żywych komórek przedstawiono na Rysunku 1.7.

Do pomiarów FCS i obrazowania konfokalnego, komórki były wysiewane na 8-dołkowe szalki ze szklanym dnem: Cellvis (Stany Zjednoczone) lub Ibidi® (Niemcy).

○ Obrazowanie konfokalne i FLIM

W Tabeli 2.1. zamieszczono podsumowanie dotyczące wartości stężeń poszczególnych badanych cząsteczek i ich czasów inkubacji z komórkami wizualizowanymi następnie na drodze obrazowania konfokalnego lub FLIM.

Tabela 2.1. Szczegóły dotyczące procedury obrazowania konfokalnego/FLIM do oceny jakościowej wnikanía poszczególnych cząsteczek badanych.

Badana cząsteczka	Stężenie dodane do komórek	Czas inkubacji	Płukanie komórek roztworem PBS z Ca^{2+} i Mg^{2+} przed obrazowaniem
PARPi-FL	100 nM	1h	Tak
Bewacizumab	500 nM	1h, 24h, 48h	Nie
Terapeutyczne dinukleotydy	50 nM	1h	Tak
Ft-568	10 $\mu\text{g/ml}$	Transfer przez makrofagi	Nie
Hb-568	10 $\mu\text{g/ml}$	Transfer przez makrofagi	Nie
YO-PRO-1	40 nM	1h	Nie

○ Wyznaczenie współczynnika podziału

Współczynnik podziału, dla poszczególnych cząsteczek badanych, wyznaczano jako stosunek stężenia badanej cząsteczki wewnątrz komórki do jej stężenia w medium hodowlanym, otaczającym badane komórki (Równanie 2.9.). Wyznaczenie stężeń w medium przeprowadzono poprzez umieszczenie ogniska detekcji poza komórką.

$$\text{Współczynnik podziału} = \frac{\text{stężenie związku wewnątrz komórek}}{\text{stężenie związku w medium otaczającym badane komórki}}$$

Równanie (2.9.)

○ Testy cytotoksyczności MTT

Badania cytotoksyczności rozpoczęto od przeprowadzenia optymalizacji, określającej optymalną liczbę komórek obu linii komórkowych dla testu MTT. Etap ten został przeprowadzony zgodnie z protokołem ATCC (*MTT Cell Proliferation Assay ATCC*, 2011).

Na podstawie przeprowadzonej optymalizacji, w pierwszym kroku, otrzymaną po trypsynizacji zawiesinę komórek rozcieńczono do 1000 komórek/dołek dla linii MDA-MB-231 i 5000 komórek/dołek dla linii HeLa. Liczbę komórek określono, stosując licznik Countess II Cell Counter (Thermo Fischer Scientific). Komórki w zadanej ilości wysiano na 96-dołkową szalkę (Greiner Bio-One), a następnie inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C, umożliwiając związanie badanych komórek adherentnych z podłożem. W kolejnym kroku usunięto medium hodowlane i dodano badany związek w różnych stężeniach, przygotowanych w świeżej pożywce. Dla każdego stężenia wykonano trzy powtórzenia (trzy dołki pomiarowe). Odpowiednie kontrole: ślepa próba – medium hodowlane pozbawione komórek, kontrola pozytywna - komórki nietraktowane badanym związkiem oraz kontrola negatywna - martwe komórki (substancja toksyczna - 1% Triton X-100) również wykonano w trzech powtórzeniach.

Tak przygotowaną szalkę inkubowano w 37°C przez 72. godzinach dla PARPi-FL oraz 48. godzin dla bewacizumabu. Po tym czasie medium hodowlane zawierające badany związek zastąpiono podłożem hodowlanym zawierającym 1 mM bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowego (odczynnik MTT, Thermo Fischer Scientific). Kontrole negatywne, zgodnie z opisem powyżej, zawierały dodatkowo 1% Triton X-100. Komórki z odczynnikiem MTT inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37 °C. Po upływie tego czasu roztwory MTT zastąpiono DMSO i inkubowano przez 10 minut. Absorbancję w każdym dołku mierzono przy długości fali 540 nm, stosując czytnik płytek Synergy HTX (BioTek).

Procent żywych komórek dla każdego stężenia badanego związku obliczono za pomocą Równania (2.10.).

$$\text{żywołność [\%]} = \frac{\text{wartość zmierzona} - \text{średnia}_{\text{kontrola negatywna}}}{\text{średnia}_{\text{kontrola pozytywna}} - \text{średnia}_{\text{kontrola negatywna}}}$$

Równanie (2.10.)

Wykresy żywołności komórek, w tym wyznaczanie IC₅₀, wykonano, uwzględniając wartości średnie z trzech powtórzeń i stosując skalę logarytmiczną na osi x.

Do punktów pomiarowych dopasowano logistyczną funkcję dawka-odpowiedź, uwzględniającą cztery parametry, pochodzącą z programu Origin2019b.

- **Testy cytotoksyczności alamarBlue®**

Barwnik alamarBlue® do pomiaru żywotności komórek zastosowano zgodnie z protokołem producenta (*General Method for Measuring Cytotoxicity or Proliferation Using alamarBlue® by Fluorescence*, Bio-Rad). Dla każdego eksperymentu wykonano pięć kontroli: a) pożywka hodowlana z barwnikiem alamarBlue® (ślepa próba), b) komórki z alamarBlue® nietraktowane badanym związkiem (kontrola pozytywna), c) martwe komórki z alamarBlue®, substancja toksyczna - 1% Triton X-100 (kontrola negatywna), d) medium hodowlane bez barwnika, e) komórki nietraktowane badanym związkiem bez alamarBlue® (kontrola autofluorescencji). Analogicznie dla opisanego wyżej testu MTT, po odpowiednim dla badanego związku czasie inkubacji komórek w temperaturze 37°C, medium wymieniono na 10% roztwór barwnika alamarBlue® w świeżym medium hodowlanym pozbawionym czerwieni fenolowej (w celu wyeliminowania fluorescencji tła). Inkubacja w temperaturze 37°C trwała 4 godziny. Po tym czasie zmierzono fluorescencję w każdym dołku przy długości fali 590 nm (filtr 590/20) dla wzbudzenia przy 560 nm (filtr 560/20).

Wykresy żywotności komórek, w tym wyznaczanie IC₅₀ przebiegało zgodnie z opisem zamieszczonym dla testu cytotoksyczności MTT.

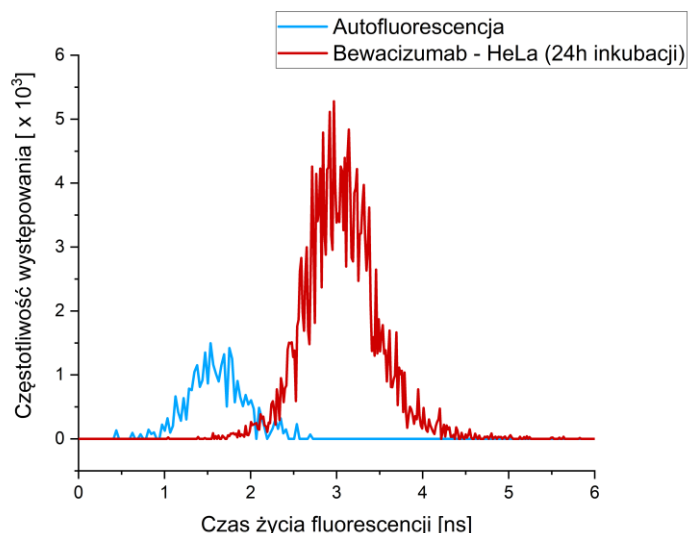
- **Procedura dostarczania wewnątrzkomórkowego z użyciem szoku osmotycznego**

Procedura dostarczania cząsteczek do wnętrza komórek składała się z dwóch etapów. W pierwszym etapie komórki umieszczono w medium hipertonicznym i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C. Następnie, medium hipertoniczne zostało usunięte, a do komórek dodano medium hipotoniczne, składające się z medium hodowlanego, dedykowanego danej linii komórkowej i pozbawionego FBS, oraz wody w stosunku 6:4. Komórki inkubowano w tak przygotowanym roztworze przez 2. minuty w temperaturze 37°C. Następnie medium hipotoniczne zastąpiono podłożem hodowlanym odpowiednim dla linii komórkowej. Eksperymenty FCS i obrazowanie konfokalne przeprowadzono po około 30. minutach od zakończeniu procedury dostarczania wewnątrzkomórkowego.

Analiza danych

- **Analiza zdjęć FLIM dla bewacizumabu**

Z zastosowaniem trybu FLIM, ustalono, że czas życia fluorescencji barwnika Atto 488 NHS, zastosowanego do wybarwienia bewacizumabu wynosi powyżej 3 ns. Wartość ta jest zgodna z informacjami od producenta barwnika. Zatem sygnał oznaczony jako czerwony na zdjęciach FLIM, uzyskany po inkubacji komórek z bewacizumabem, to sygnał pochodzący od testowanego leku. Z kolei sygnał zaznaczony jako niebieski reprezentuje autofluorescencję komórek (Rysunek 2.2.).

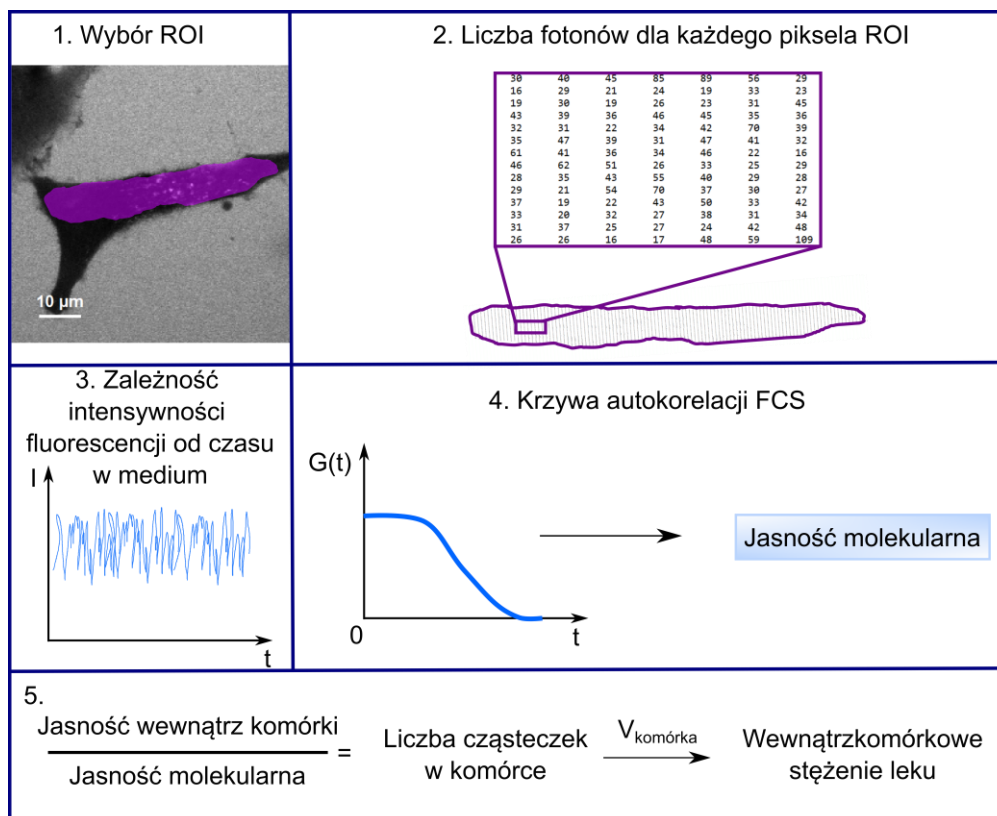


Rysunek 2.2. Histogram czasu życia fluorescencji dla autofluorescencji komórek HeLa (kolor niebieski) i bewacizumabu znakowanego Atto 488 NHS wewnątrz komórek HeLa po 24. godzinach inkubacji (kolor czerwony).

○ Wyznaczenie stężeń wewnątrzkomórkowych bewacizumabu

Stężenia wewnątrzkomórkowe znakowanego bewacizumabu obliczono z zastosowaniem modułu obrazowania oprogramowania SymphoTime, dysponując zależną od czasu ilością fotonów. To podejście pozwoliło na określenie liczby fotonów na sekundę, uzyskanych na każdą badaną komórkę. Następnie, korzystając z MB bewacizumabu (liczba fotonów/sekunda/cząsteczka) uzyskaną z pomiaru FCS, obliczono liczbę cząsteczek we wnętrzu komórek. Biorąc pod uwagę objętość komórki (ustaloną jako $2000 \mu\text{m}^3$), w kolejnym kroku wyznaczono wewnątrzkomórkowe stężenie bewacizumabu zamkniętego w pęcherzykach. Schemat objaśniający sposób wyznaczania stężenia wewnątrzkomórkowego przedstawiono na Rysunku 2.3.

Analogicznie, przeprowadzono pomiary dla TRITC-dekstranu o masie cząsteczkowej 155 kDa (Sigma-Aldrich, numer produktu T1287).⁸⁸



Rysunek 2.3. Schemat wyjaśniający sposób obliczania stężenia bewacizumabu wewnątrz komórek. W pierwszym kroku wybrano obszar analizy (ROI) dla analizowanego zdjęcia FLIM. Następnie, korzystając z oprogramowania SymphoTime, otrzymano liczbę fotonów przypadającą na każdy piksel w wybranym ROI. Wykonując pomiary FCS w buforze oraz bazując na zapisie intensywności fluorescencji w czasie (punkt 3. na rysunku), uzyskano krzywe autokorelacji FCS. W ten sposób pozyskano informacje o jasności molekularnej bewacizumabu (liczba fotonów na cząsteczkę, punkt 4. na rysunku). W ostatnim kroku obliczono liczbę cząsteczek leku wewnątrz każdej badanej komórki jako stosunek jasności leku wewnątrz komórki do jego jasności molekularnej, a uwzględniając objętość komórki (zadaną jako $2000 \mu\text{m}^3$), otrzymano wewnątrzkomórkowe stężenie bewacizumabu.

○ Obliczanie ciśnienia osmotycznego

Ciśnienia osmotyczne wszystkich badanych roztworów hipertonicznych, opisanych w Rozdziale 3.7., obliczono na podstawie Równanie (2.11.).

$$\Delta P_{osm} = \frac{RT}{M}c + A_2c^2$$

Równanie (2.11.)

gdzie R jest molową stałą gazową [$\text{J/mol}\cdot\text{K}$], T - temperaturą bezwzględną [K], c - stężeniem polimeru [kg/m^3], M - masą molową polimeru [kg/mol], natomiast A_2 oznacza drugi współczynnik wirialny [$\text{m}^5/\text{s}^2\cdot\text{kg}$]. Parametr A_2 został wyznaczony empirycznie dla każdego polimeru i przyjął następujące wartości dla badanych polimerów: PEG 35 kDa – 5,63; dekstran 10 kDa – 5,76;¹¹¹ dekstran 40 kDa – 2,5, dekstran 70 kDa – 1,69, dekstran 500 kDa – 0,43.¹¹² Do wyznaczenia ciśnienia osmotycznego medium hipertonicznego zawierającego Ficoll® zastosowano A_2 dekstranu 500 kDa ze względu na brak danych literaturowych dla tego polimeru. Cząsteczki Ficollu® i dekstranu mają podobny skład chemiczny.

Ciśnienie osmotyczne roztworu sacharozy obliczono na podstawie prawa van't Hoffa:

$$\Delta P_{osm} = RTc$$

Równanie (2.12.)

gdzie c to stężenie sacharozy [mol/m³].

3. Wyniki, ich dyskusje i podsumowania

Określenie, czy związek potencjalnie terapeutyczny wnika lub nie (w zależności od miejsca jego działania) do ludzkich komórek, na etapie badań laboratoryjnych wydaje się kluczowym etapem, który powinien poprzedzać długie i bardzo kosztowne badania kliniczne.

Przeprowadzona w niniejszej pracy charakterystyka wnikania cząsteczek do wnętrza ludzkich komórek dotyczyła:

- leku olaparib
- leku bewacizumab;
- terapeutycznych dinukleotydów;
- ferrytyny i hemoglobiny;
- barwnika YO-PRO-1.

Dla każdej z tych cząsteczek, zbadano, co dzieje się z analizowanym związkiem wewnątrz żywych, pojedynczych komórek, jakim interakcji wewnątrzkomórkowych ulega oraz jakie składniki są obecne w komórce po wnikięciu do niej określonej, badanej molekuly. W Rozdziale 3.6. opisano także ilościową ocenę dystrybucji wewnątrzkomórkowej białka PRMT1, w połączeniu z analizą form oligomerycznych. Szczegółowy opis eksperymentów i uzyskanych wyników dla każdej cząsteczki zamieszczono w poniższych podrozdziałach. Na wstępie każdego podrozdziału (za wyjątkiem 3.7.) zamieszczono tabelę (niebieskie cieniowanie) podsumowującą szczegóły eksperymentalne przeprowadzonych badań oraz schemat komórki obrazujący rozważane losy badanej cząsteczki we wnętrzu komórki.

W końcowej części tego fragmentu pracy uwagę poświęcono zastosowaniu szoku osmotycznego jako metodzie wprowadzania do komórek związków, które nie są przez nie pobierane samodzielnie.

3.1. Nanolepkość cytoplazmy komórek linii potrójnie ujemnego raka piersi MDA-MB-231

Aby móc interpretować wyniki uzyskane techniką FCS z wnętrza komórek w sposób ilościowy niezbędne jest dysponowanie wiedzą na temat nanolepkości konkretnego, badanego, typu komórek nowotworowych. W ten sposób możemy precyzyjnie określić, co dzieje się z badaną molekulą w komórkach ludzkich:

- czy występuje w formie wolnej, czy związanej ze swoim celem molekularnym;
- czy oddziałuje z organellami wewnątrzkomórkowych;
- w jakiej formie oligomerycznej występuje.

W tabeli poniżej zamieszczono szczegóły dotyczące pomiarów przeprowadzonych w ramach tego rozdziału pracy.

Tabela 3.1.1. Informacje techniczne dotyczące pomiarów wykonanych w Rozdziale 3.1.

Badane linie komórkowe	Temperatura pomiarów	Zastosowany model matematyczny <i>in vivo</i>
MDA-MB-231	36°C ± 0,5°C	<u>Dla nanokulek, białka GFP oraz kalceiny-AM:</u> model dyfuzji normalnej jedno-, dwuskładniowej ($\alpha = 1$, $i = 1$ lub 2 z Równania (2.1.)); <u>Dla TRITC-dekstranów:</u> model dyfuzji anormalnej jednoskładnikowej ($\alpha < 1$, $i = 1$ z Równania (2.1.))

Współczynnik dyfuzji, stanowiący podstawę pomiarów FCS, zależy od lepkości roztworu. Im większa jest lepkość, tym mniejsza mobilność cząsteczki. Zatem w komórkach cząsteczki poruszają się wolniej niż na przykład w wodzie. W niniejszej pracy wykorzystano model nanolepkości komórek zależny od skali długości opracowany przez T. Kalwarczyka⁸⁹ i zastosowano go do wyznaczenia nanolepkości cytoplazmy komórek MD-MB-231. Otrzymane, opisane poniżej, wyniki są częścią artykułu naukowego.¹¹³

Próbkowanie cytoplazmy komórek MDA-MB-231

Do wnętrza komórek linii MDA-MB-231 z zastosowaniem odczynnika Cell-IN wprowadzono fluorescencyjne próbki o różnych, znanych, wielkościach. Na podstawie uzyskanych, eksperymentalnych, krzywych autokorelacji FCS dla każdego wprowadzonego próbki wyznaczono współczynnik dyfuzji (zgodnie z Równaniem (1.2.)) we wnętrzu komórek, porównując go ze współczynnikiem dyfuzji charakterystycznym dla tego próbki w wodzie. W ten sposób uzyskano informację na temat oporu hydrodynamicznego, jaki odczuwa cząsteczka o określonej wielkości we wnętrzu komórek badanej linii. Jak wykazano dotychczas,^{89,91} cytoplazmatyczna lepkość efektywna komórek zależy logarytmicznie od wielkości próbki i może być opisana Równaniem (1.5.). W Tabeli 3.1.2. zestawiono uzyskane stosunki współczynników dyfuzji w cytoplazmie do współczynnika dyfuzji tej cząsteczki w wodzie.

Tabela 3.1.2. Wartości logarytmu naturalnego ze stosunku współczynnika dyfuzji w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 do współczynnika dyfuzji w wodzie, zestawione dla każdego próbnika wprowadzonego do komórek, wraz z jego promieniem hydrodynamicznym. Podane wartości są wartościami średnimi $\pm$ odchylenie standardowe ($N=10$; każda komórka była mierzona trzykrotnie).

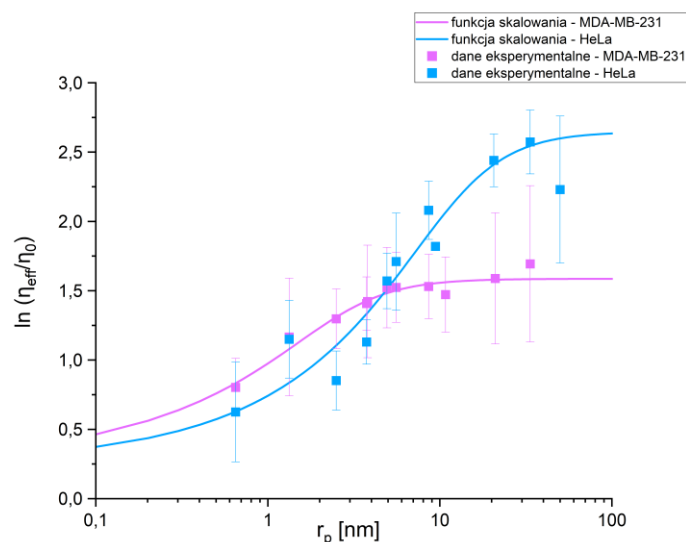
Nazwa próbника	Promień próbника [nm]	$\ln(D_{\text{cytoplazma}}/D_{\text{woda}})$
Kalceina-AM	0,7	$0,8 \pm 0,2$
TRITC-dekstran 4.4 kDa	1,3	$1,2 \pm 0,4$
EGFP	2,5	$1,3 \pm 0,2$
TRITC-dekstran 20 kDa	3,8	$1,4 \pm 0,2$
Nanokulki oznaczone Si630	3,8	$1,4 \pm 0,4$
TRITC-dekstran 40 kDa	4,9	$1,5 \pm 0,3$
TRITC-dekstran 75 kDa	5,6	$1,5 \pm 0,3$
TRITC-dekstran 155 kDa	8,6	$1,5 \pm 0,2$
Nanokulki oznaczone s98(3)	10,8	$1,5 \pm 0,3$
Nanokulki oznaczone s37	21,0	$1,6 \pm 0,5$
Nanokulki oznaczone 43(1)	33,5	$1,7 \pm 0,6$

Z dopasowania modelu nanolepkości opisanego Równaniem (1.5.) do danych eksperymentalnych wyznaczono wartości parametrów A , ξ , R_H i a charakterystyczne dla linii potrójnie ujemnego raka piersi (analiza przeprowadzona przez dr Martę Pilz). Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 3.1.3., porównując je z wynikami uzyskanymi wcześniej⁹¹ dla linii komórkowej HeLa.

Tabela 3.1.3. Wartości parametrów Równania (1.5.) nanolepkości zależnej od skali długości dla linii komórkowej MDA-MB-231 w zestawieniu z linią HeLa, wcześniej zbadaną. Błędy zostały obliczone przy użyciu metody różniczki całkowitej.

Symbol parametru	HeLa ⁹¹	MDA-MB-231 ¹¹³
ξ	$3,16 \pm 0,14$	$1,70 \pm 0,29$
R_H	$12,9 \pm 2,3$	$2,85 \pm 0,92$
a	$0,62 \pm 0,07$	$0,55 \pm 0,15$

Uzyskane wyniki zwizualizowano także w formie wykresu, uwzględniając dane porównawcze dla linii komórkowej HeLa.



Rysunek 3.1.1. Krzywa nanolepkości zależna od skali długości, uzyskana dla linii komórkowej MDA-MB-231, zestawiona w odniesieniu do wyników opisanych i opublikowanych wcześniej dla linii HeLa.⁹¹

Podsumowanie

Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na ustalenie nanolepkości cytoplazmy komórek potrójnie ujemnego raka piersi linii MDA-MB-231 z zastosowaniem modelu opisanego Równaniem (1.5.). Tym samym wykazano, jaki opór hydrodynamiczny odczuwają próbki o różnej wielkości, poruszając się w obrębie cytoplazmy badanych komórek. Uzyskane wyniki zostały wykorzystane do identyfikacji cząsteczek badanych w kolejnych rozdziałach pracy.

3.2. Interakcje wewnątrzkomórkowe leku o nazwie olaparib z białkiem PARP1 we wnętrzu żywych komórek nowotworowych

Badania internalizacji różnych cząsteczek do wnętrza żywych komórek rozpoczęto od eksperymentów dotyczących wnikania znakowanego olaparibu - inhibitora PARP1 (Rozdział 1.2.). Olaparib to przykład jednej z popularniejszych obecnie i szeroko badanych terapii celowanych między innymi względem HER2-ujemnych nowotworów piersi z mutacją BRCA1.

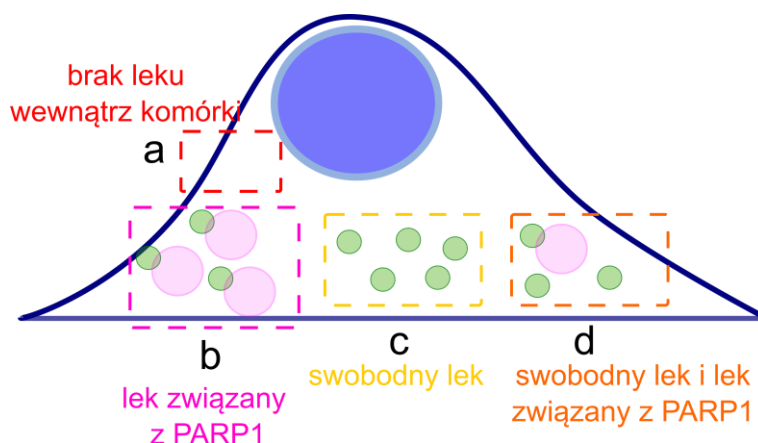
Celem pomiarów opisanych w tym rozdziale było określenie, czy znakowany fluorescencyjnie olaparib, PARPi-FL, wnika do wnętrza dwóch typów nowotworów (potrójnie ujemnego raka piersi linii MDA-MB-231 oraz nowotworu szyjki macicy linii HeLa). Jeśli lek jest obecny w komórkach, istotnym aspektem pod względem mechanizmu jego działania jest zagadnienie, co dzieje się z cząsteczką wewnątrz żywych komórek: czy lek ulega związaniu do swojego celu molekularnego (białka PARP1) oraz w jakim stopniu, czy oddziałuje ze składnikami komórki, czy swobodnie dyfunduje w komórce. Na te pytania podjęto próbę odpowiedzi w ramach opisanych poniżej eksperymentów. Uzyskane wyniki zostały w całości opublikowane w czasopiśmie *Analyst*.¹¹³

Poniżej, w formie tabeli, zamieszczono szczegóły dotyczące pomiarów przeprowadzonych w ramach tego rozdziału pracy.

Tabela 3.2.1. Informacje techniczne dotyczące pomiarów wykonanych w Rozdziale 3.2.

Badane linie komórkowe	Roztwór/roztwory zastosowane do pomiarów FCS <i>in vitro</i>	Temperatura pomiarów	Zastosowany model matematyczny <i>in vitro</i>	Zastosowany model matematyczny <i>in vivo</i>
MDA-MB-231, HeLa	PBS, medium hodowlane otaczające badane komórki	$36^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	Model dyfuzji normalnej jedno- (PARPi-FL), dwu- (kompleks [inhibitor – PARP1] lub trzyskładnikowej (kompleks [inhibitor – PARP1 – RNA] ($\alpha = 1, i = 1, 2$ lub 3 z Równania (2.1.))	Model dyfuzji normalnej trzyskładnikowej ($\alpha = 1, i = 3$ z Równania (2.1.))

Schemat komórki obrazujący rozważane losy badanej cząsteczki we wnętrzu komórki przedstawiono poniżej.



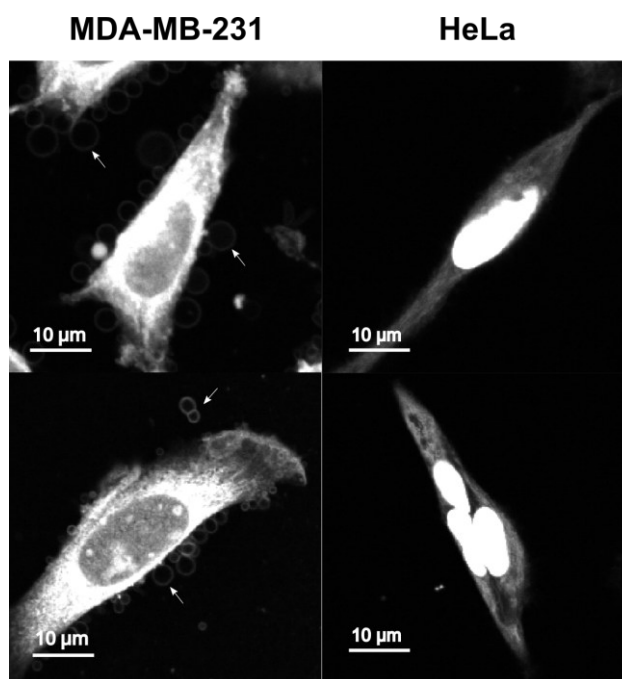
Rysunek 3.2.1. Możliwe losy wewnątrzkomórkowe leku olaparibu. Oprócz przedstawionych wariantów, możliwe są także interakcje leku ze składnikami komórkowymi, jak błony, organelle, kwasy nukleinowe.

Olaparib wnika do wnętrza żywych komórek nowotworowych

Eksperymenty rozpoczęto od sprawdzenia, czy fluorescencyjna pochodna olaparibu, PARPi-FL, przenika do komórek potrójnie ujemnego raka piersi (MDA-MB-231) pozbawionych mutacji BRCA1. W tym celu wykonano obrazowanie konfokalne komórek (Rysunek 3.2.2.). Otrzymane zdjęcia konfokalne wykazały, że większość badanego inhibitora jest wykrywana w cytoplazmie komórek MDA-MB-231.

Aby porównać uzyskane wyniki dla komórek potrójnie ujemnego raka piersi z innym typem nowotworu, przeprowadzono analogiczne badania dla komórek linii HeLa, także nieposiadającej mutacji BRCA1. Wykonane obrazowanie konfokalne (Rysunek 3.2.2.)

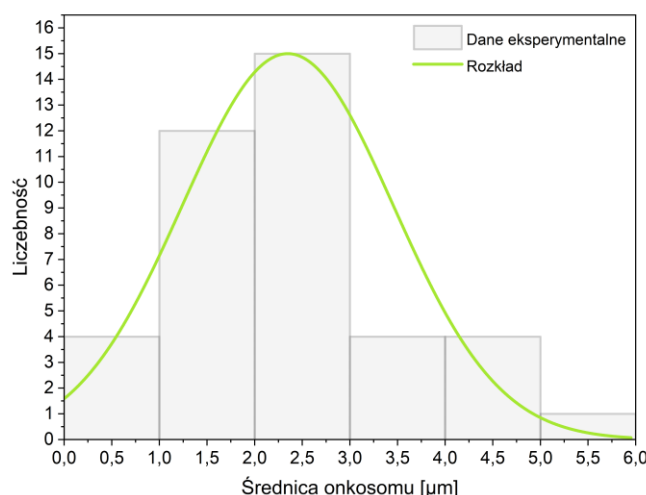
wykazało znaczącą różnicę w lokalizacji badanego związku pomiędzy tymi dwoma badanymi typami nowotworów. W przypadku komórek HeLa, zaobserwowano akumulację olaparibu w jądrze komórkowym, podczas gdy w komórkach MDA-MB-231 lek był obecny głównie w cytoplazmie.



Rysunek 3.2.2. Przykładowe zdjęcia konfokalne komórek MDA-MB-231 oraz HeLa po inkubacji z PARPi-FL. W przypadku komórek MDA-MB-231 strzałkami wskazano przykładowe zewnątrzkomórkowe pęcherzyki - onkosomy. W przeciwieństwie do komórek potrójnie ujemnego raka piersi, w komórkach HeLa lek akumulował się w jądrze komórkowym. Nie odnotowano także obecności zewnątrzkomórkowych onkosomów, widocznych w komórkach MDA-MB-231.

Warto podkreślić, że poprzez przeprowadzone obrazowanie komórek potrójnie ujemnego raka piersi zidentyfikowano obecność pęcherzyków związanych z błoną zewnątrzkomórkową (zaznaczone strzałką na Rysunku 3.2.2.). Obiekty te odpowiadają prawdopodobnie onkosomom – pęcherzykom obecnym na zewnątrz komórek i wytwarzanych przez komórki nowotworowe.^{114,115} Według danych literaturowych wielkość onkosomów waha się od 100 nm¹¹⁶ do nawet 10 µm.¹¹⁷ W przypadku badanych komórek MDA-MB-231 inkubowanych z fluorescencyjnym olaparibem dominowały pęcherzyki o średnicy 2,25 µm (Rysunek 3.2.3.). Nieco mniejsze onkosomy (około 1,5 µm średnicy) występowały równie często. Największy odnotowany rozmiar pęcherzyka wyniósł 5,3 µm.

Warto zaznaczyć, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe widoczne w komórkach potrójnie ujemnego raka piersi nie były widoczne w komórkach HeLa. Można zatem wnioskować, że onkosomy są właściwością specyficzną dla określonego typu komórek nowotworowych a ich obecność może mieć potencjalny wpływ na uwalnianie badanego leku z komórek. To z kolei przekłada się na stężenie leku wewnątrz komórek. Wydaje się więc, że wzór wnikania olaparibu do wnętrza ludzkich komórek jest właściwością charakterystyczną dla typu komórek.



Rysunek 3.2.3. Histogram wielkości (średnicy) wykrytych onkosomów, obecnych wokół komórek MDA-MB-231 wraz z tendencją rozkładu. Wielkości pęcherzyków określono na podstawie ręcznych pomiarów wykonanych na obrazach z naniesioną skalą.

Współczynnik podziału jako miara efektywności wnikania olaparibu

W kolejnym kroku przystąpiono do analizy stopnia wnikania olaparibu w sposób ilościowy. W tym celu wyznaczono parametr określony mianem współczynnika podziału.¹¹⁸ To stosunek stężenia badanej cząsteczki we wnętrzu komórek do jego stężenia na zewnątrz komórek, w medium je otaczającym. W przypadku leków współczynnik podziału jest kluczowym parametrem stosowanym do określania fizjologicznych modeli farmakokinetycznych i może być wykorzystany do oceny dystrybucji leku w tkance. Co więcej, dla związku chemicznego ulegającego związaniu z białkiem, jak badany olaparib, współczynnik ten może być kluczowy dla scharakteryzowania nasycenia, wpływającego na dystrybucję i eliminację leku.¹¹⁸ Stężenie wewnątrzkomórkowe leku (licznik współczynnika podziału) wyznaczono, wykonując pomiary FCS bezpośrednio w jądrze komórek po inkubacji z fluorescencyjnym olaparibem. Z kolei stężenie zewnątrzkomórkowe badano tą samą techniką, ale pozycjonując ognisko konfokalne poza komórką badaną, w medium ją otaczającym. Warto zaznaczyć, że stężenie wewnątrzkomórkowe było sumą stężeń wszystkich wykrytych składników.

Stężenia wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe wyznaczono, korzystając z następującego wzoru:

$$C = \frac{N}{\frac{4}{3} \cdot N_A \cdot \pi \cdot \omega_o^3 \cdot K}$$

Równanie (3.1.)

gdzie C to stężenie molowe, N odpowiada średniej liczbie fluorescencyjnych cząsteczek w objętości detekcji, N_A to liczba cząsteczek w jednym molu (liczba Avogadro) równa $6,022 \cdot 10^{23}$, ω_o – rozmiar ogniska detekcji w płaszczyźnie, natomiast K oznacza współczynnik proporcji objętości detekcji, wyznaczany podczas kalibracji.

Parametr N z Równania (3.1.), a więc średnia liczba cząsteczek obecnych w ognisku konfokalnym, jest odwrotnie proporcjonalny do amplitudy funkcji korelacji G_0 , zgodnie z Równaniem (3.2.).

$$G_0 = \frac{1}{N}$$

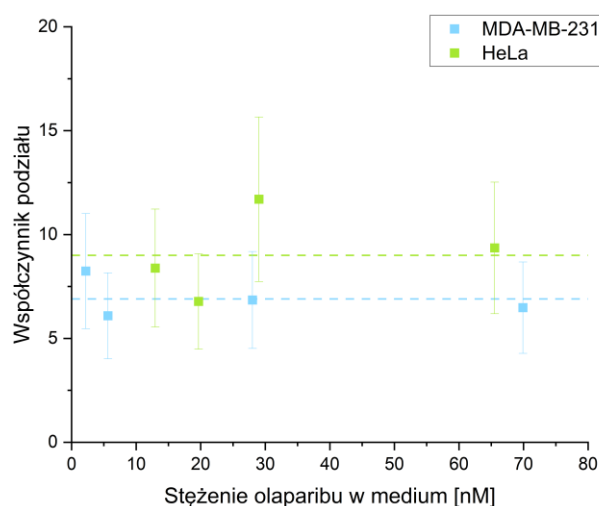
Równanie (3.2.)

Stosując Równania (3.1.) i (3.2.) oraz analizując uzyskane krzywych autokorelacji FCS obliczono stężenia wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe olaparibu. Współczynnik podziału wyznaczono dla czterech niezależnych stężeń olaparibu w medium hodowlanym. Szczegółowe wyniki dla obu badanych linii komórkowych przedstawiono w Tabeli 3.2.2.

Tabela 3.2.2. Wartości współczynników podziału dla komórek MDA-MB 231 i HeLa, obliczone na podstawie stężeń badanego olaparibu w medium hodowlanym (na zewnątrz komórek) i stężeń wewnątrzkomórkowych. Błędy obliczono metodą różniczki całkowitej (liczba badanych komórek $N = 12$; każda komórka była mierzona trzykrotnie).

Stężenie w medium C_{medium} [nM]	Stężenie w komórkach C_{kom} [nM]	Współczynnik podziału ($C_{\text{kom}}/C_{\text{medium}}$)
Komórki MDA-MB-231)		
70 ± 17	453 ± 109	6 ± 2
28 ± 7	192 ± 46	7 ± 2
6 ± 1	34 ± 8	6 ± 2
$2,2 \pm 0,5$	38 ± 9	8 ± 3
Komórki HeLa		
66 ± 16	613 ± 147	9 ± 3
29 ± 7	339 ± 82	12 ± 4
13 ± 3	109 ± 26	8 ± 3
20 ± 5	133 ± 32	7 ± 2

Uzyskane wartości współczynnika podziału w sposób ilościowy dowodzą, że skuteczność wnikania PARPi-FL do komórek HeLa była o około 30% wyższa w porównaniu do linii MDA-MB-231. Ilościowe różnice wnikania leku między badanymi typami komórek zobrazowano graficznie w formie wartości współczynników podziału na Rysunku 3.2.4.



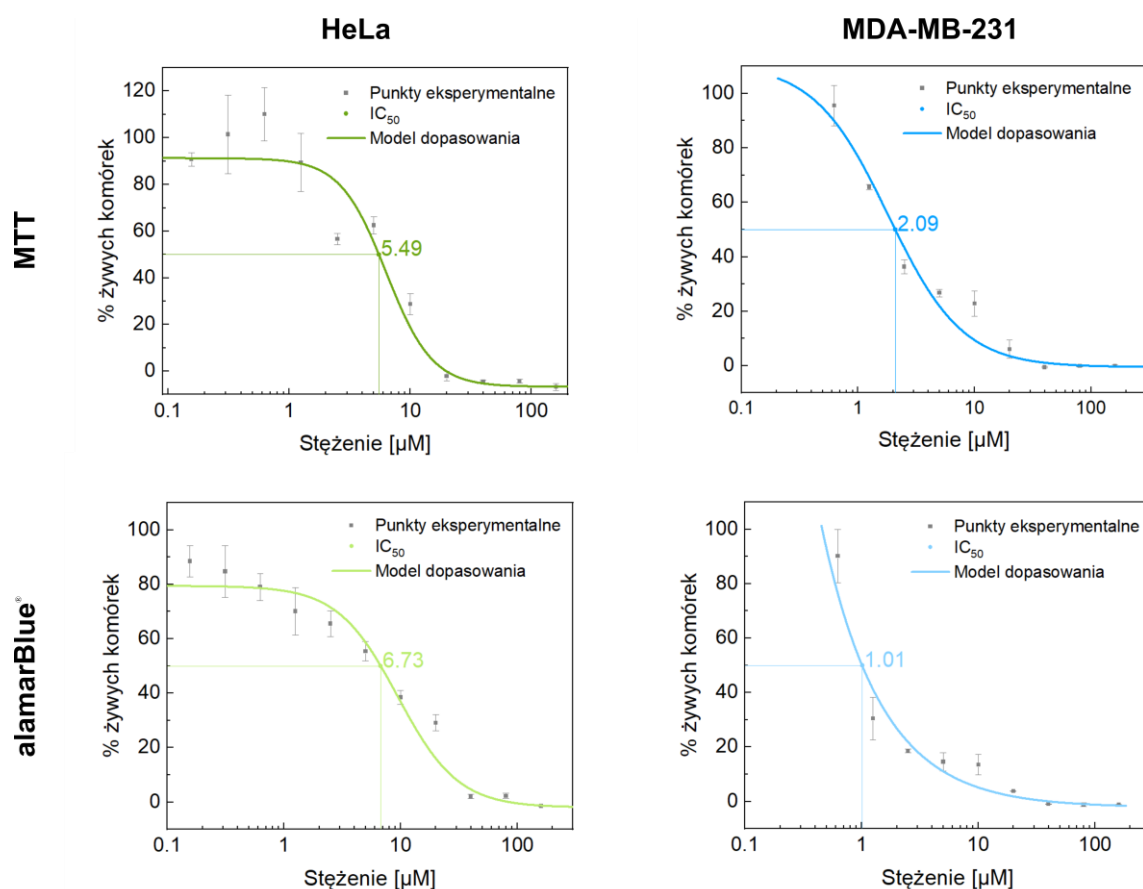
Rysunek 3.2.4. Zależność współczynnika podziału od stężenia olaparibu w medium hodowlanym. Wyniki przedstawiono dla obu badanych typów nowotworów. Im większy współczynnik podziału, tym większa efektywność wnikania związku do badanych komórek.

Cytotoksyczność fluorescencyjnego olaparibu

Dotychczas opisane badania wykazały, że fluorescencyjna pochodna olaparibu wnika do komórek potrójnie ujemnego raka piersi i raka szyjki macicy, a lokalizacja badanej cząsteczki jest determinowana typem nowotworu. W sposób ilościowy wyznaczono też współczynnik podziału (Tabela 3.2.2.), określający efektywność wnikania badanego leku do ludzkich komórek. Olaparib to lek przeciwnowotworowy, mający niszczyć komórki nieprawidłowe. W związku z tym, w kolejnym etapie przystąpiono do wyznaczenia cytotoksyczności znakowanego olaparibu względem obu linii komórkowych. W tym celu zastosowano dwa niezależne testy cytotoksyczności: MTT i alamarBlue® (w zakresie stężeń 0,625-160 μ M dla MDA-MB-231; 0,156 - 80 μ M dla HeLa). Określono w ten sposób, czy akumulacja leku w jądrze (miejscu działania olaparibu) zaobserwowana w komórkach HeLa przekłada się na zwiększony efekt terapeutyczny. Z zastosowaniem testu MTT wyznaczono stężenie PARPi-FL powodującego zahamowanie aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej, natomiast z użyciem alamarBlue® określono stężenie reakcji redukcji metabolicznej barwnika resazuryny. Otrzymane wartości IC_{50} (z dopasowania logistycznej funkcji zależności dawka-odpowiedź do danych eksperymentalnych, Rysunek 3.2.5.) były prawie 3-krotnie i 7-krotnie wyższe dla komórek HeLa w porównaniu z komórkami nowotworu piersi, odpowiednio dla MTT i alamarBlue®. Warto zauważyć, że wartości IC_{50} były zbliżone dla obu testów. Zaobserwowane różnice mogą wynikać z tego, że zastosowane testy cytotoksyczności opierają się na różnych mechanizmach działania - MTT wykrywa przede wszystkim aktywność enzymów mitochondrialnych, z kolei alamarBlue® pozwala na wyznaczenie ogólnej aktywności redoks w komórce. W efekcie te dwa podejścia eksperymentalne potencjalnie mogą być w różnym stopniu czułe na obecność PARPi-FL wewnątrz badanych komórek.

Oba zastosowane testy wykazały, że stężenia rzędu kilku μ M badanej pochodnej leku powodują zahamowanie wzrostu połowy badanych typów nowotworów. Uzyskane wyniki wykazały zatem, że komórki HeLa są bardziej odporne na fluorescencyjną pochodną olaparibu. Tym

samą akumulacją leku w miejscu jego działania – jądrze komórkowym – nie znalazła przełożenia na zwiększony efekt terapeutyczny.



Rysunek 3.2.5. Żywotność komórek HeLa oraz MDA-MB-231 inkubowanych przez 72. godziny z fluorescencyjnym olaparibem PARPi-FL jako funkcja zależna od stężenia badanego związku, ze wskazaniem wartości IC₅₀ uzyskanej z testów MTT oraz alamarBlue®. Na wszystkich wykresach do punktów eksperymentalnych została dopasowana logistyczna funkcja dawka-odpowiedź obejmująca cztery parametry, uzyskana z programu Origin2019b. Wyniki odpowiadają wartości średniej ± odchylenie standardowe (N = 6).

Odnosząc uzyskane wartości IC₅₀ do wartości literaturowych, dla komórek potrójnie ujemnego raka piersi inkubowanych z niewyznakowanym lekiem w teście MTT Keung i inni uzyskali stężenie IC₅₀ równe 13,5 μM,¹¹⁹ co jest wartością dziesięciokrotnie wyższą względem wyników otrzymanych w niniejszych badaniach dla PARPi-FL. Warto także podkreślić, że przeprowadzone badania wykazały skuteczność znakowanego olaparibu względem komórek pozbawionych mutacji BRCA1, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi.¹¹⁹ Analizując wyniki uzyskane dla komórek HeLa względem literatury, Kukulj i inni wykazali,¹²⁰ że ich przeżywalność raka szyjki macicy w obecności olaparibu w stężeniu 10 μM dodanego do komórek na 72. godziny wynosiła ponad 60% (w oparciu o test MTS).

Biorąc pod uwagę przytoczone informacje można stwierdzić, że potencjalnie fluorescencyjna pochodna leku olaparib jest zaangażowana w niezbadane dotąd procesy komórkowe. To przekłada się z kolei na jej większą toksyczność względem obu zbadanych typów nowotworów w porównaniu do leku niewyznakowanego. Jedną z możliwych hipotez wyjaśniających otrzymane wyniki jest także niższa stała równowagi między olaparibem, białkiem PARP1 i DNA w porównaniu do fluorescencyjnej pochodnej tego leku.

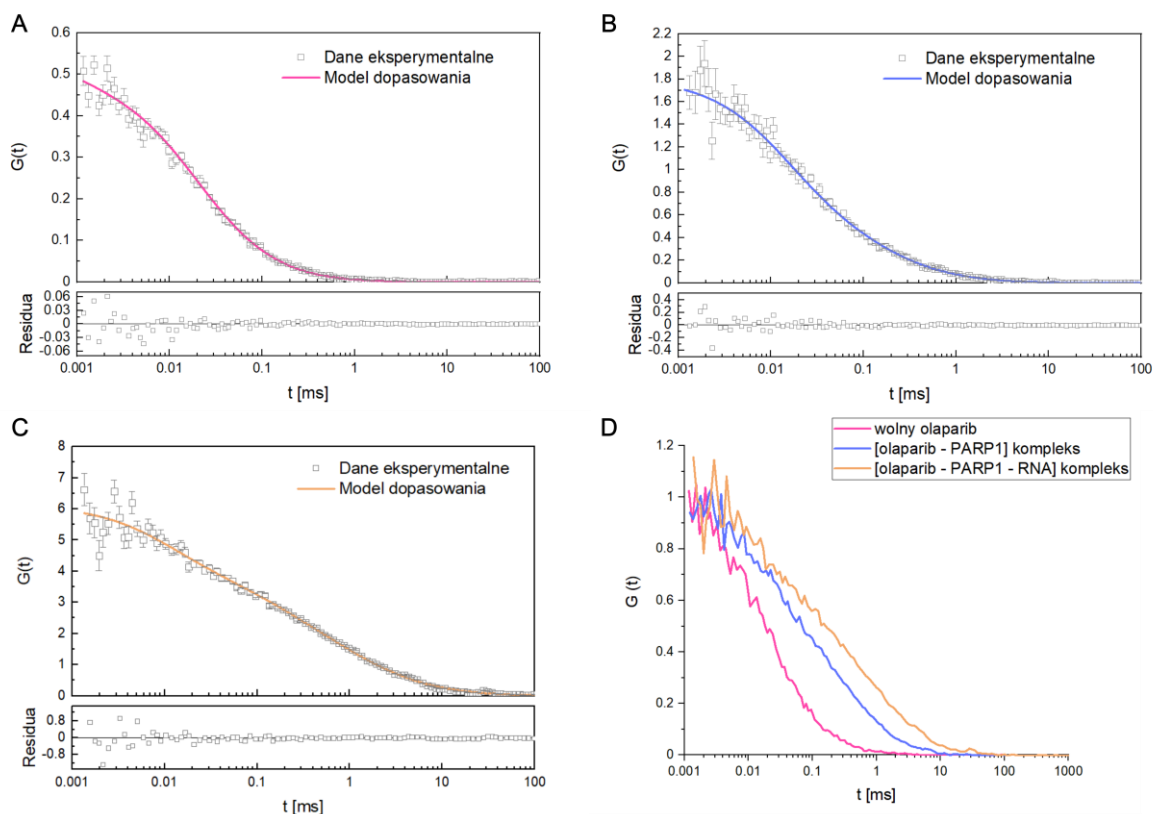
Ilościowe pomiary FCS jako narzędzie do określenia losów olaparibu wewnątrz komórek

○ Pomiary FCS w buforze (*in vitro*)

Przeprowadzone dotychczas eksperymenty pozwoliły określić zależność między wewnątrzkomórkową lokalizacją olaparibu w komórkach nowotworowych, efektywności jego wnikania, a cytotoksycznością. W kolejnym kroku przystąpiono do określenia, co dzieje się z cząsteczką PARPi-FL wewnątrz komórek.

W tym celu, zastosowano ilościową technikę FCS, a pomiary rozpoczęto od warunków *in vitro*. Zgodnie bowiem ze schematem postępowania opisanym wcześniej, aby w sposób ilościowy określić, jakim interakcjom wewnątrzkomórkowym ulega badana fluorescencyjna cząsteczka wewnątrz komórek, w pierwszym kroku należy określić rozmiary badanego związku lub/i jego kompleksów z potencjalnymi celami molekularnymi. Zatem w ramach niniejszych badań, uwzględniając mechanizm działania olaparibu, wyznaczono wielkości (promienie hydrodynamiczne) PARPi-FL oraz kompleksu [PARP1 – PARPi-FL] w roztworze PBS, stosując Równania (1.1.) i (1.2.). Przykładowe krzywe autokorelacji FCS wraz z modelem dopasowania przedstawiono na Rysunku 3.2.6.

Analizie poddano także potencjalne wiązanie kompleksu [PARP1 – inhibitor] do cząsteczek RNA – mobilnych, przyjmujących różne wielkości wewnątrz ludzkich komórek. Wiadomo bowiem, że białko PARP1 ulega związaniu z DNA. Niemniej jednak, RNA ma podobną strukturę chemiczną do DNA, różniącą się na poziomie molekularnym tylko jednym nukleotydem i szkieletem węglowodanowym. Zatem cząsteczki RNA mogą stanowić potencjalny składnik wykrywany podczas pomiarów FCS we wnętrzu komórek nowotworowych. Celem sprawdzenia, czy fluorescencyjny kompleks [PARPi-FL – PARP1] wiąże się z cząsteczkami RNA, wykonano pomiary w roztworze PBS. Jako modelową cząsteczkę RNA zastosowano pojedynczą nić RNA o długości 2002 nt. Poprzez uzyskane krzywe autokorelacji FCS w próbce zidentyfikowano obecność najwolniejszego składnika - kompleks [PARPi-FL – białko – RNA]. Pozostałe dwa składniki odpowiadały kompleksowi [białko – inhibitor] oraz wolnemu inhibitorowi. Stosując Równania (1.1.) i (1.2.), obliczono promień hydrodynamiczny kompleksu z RNA, wynoszący 57 ± 7 nm. Wyniki pomiarów FCS *in vitro* podsumowano w Tabeli 3.2.3.



Rysunek 3.2.6. Przykładowe krzywe autokorelacji FCS uzyskane w PBS *in vitro* dla: A) wolnego, swobodnie dyfundującego, znakowanego olaparibu (model dopasowania: dyfuzja normalna jednoskładnikowa), B) kompleksu białka PARP1 z badanym lekiem (model dopasowania: dyfuzja normalna dwuskładnikowa), C) kompleksu białka PARP1 z olaparibem i cząsteczką RNA (model dopasowania: dyfuzja normalna trzyskładnikowa). Dolne panele wykresów A, B, C przedstawiają odchylenia danych eksperymentalnych od zastosowanego modelu dopasowania. D) Zestawienie na jednym wykresie znormalizowanych krzywych autokorelacji FCS dla samego inhibitora, kompleksu [PARP1 – olaparib] oraz kompleksu [olaparib – PARP1 – RNA].

Na podstawie literatury wiadomo, że promień hydrodynamiczny cząsteczek RNA (pojedyncze nici) o długości zbliżonej do badanej w niniejszej pracy wynosi około 10 nm, określony metodą FCS.¹²¹ Zatem uzyskany rozmiar kompleksu [PARPi-FL – białko – RNA] (promień hydrodynamiczny = 57 nm) może budzić pewne wątpliwości. Należy jednak wziąć pod uwagę, że badane RNA oddziałuje z białkiem PARP1 o rozmiarze 14,4 nm. Zatem w wyniku interakcji z białkiem, lokalna struktura cząsteczki mRNA ulega usztywnieniu, tworząc strukturę cylindryczną, co prowadzi do zmian konformacyjnych. Efektem tych zmian jest istotne, zaobserwowane, zwiększenie efektywnego promienia hydrodynamicznego kompleksu.

Dla obliczonych rozmiarów PARPi-FL oraz kompleksów [PARP1 – PARPi-FL] i [PARPi-FL – PARP1 – RNA], przystąpiono do wyznaczenia przewidywanego współczynnika dyfuzji, na podstawie modelu nanolepkości jądra komórkowego zależnego od skali długości,⁸² dla każdego z tych składników. Uzyskane wartości przedstawiono w Tabeli 3.2.3.

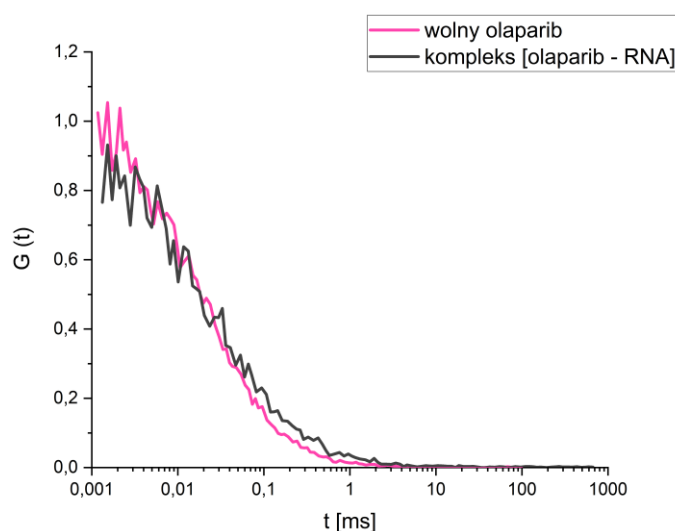
Tabela 3.2.3. Otrzymane *in vitro* i przewidywane dla jądra komórkowego wartości współczynników dyfuzji wraz z promieniami hydrodynamicznymi pochodnej olaparibu, kompleksu [olaparib – PARP1] oraz kompleksu [olaparib - PARP1 – RNA]. Błędy obliczono metodą różniczki całkowitej ($N = 15$).

Składnik	Otrzymany współczynnik dyfuzji w PBS [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	Promień hydrodynamiczny [nm]	Przewidywany współczynnik dyfuzji w jądrze komórkowym MDA-MB-231 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] ⁸²
Olaparib (PARPi-FL)	539 ± 17	$0,56 \pm 0,02$	250
Olaparib – PARP1	42 ± 5	$7,2 \pm 0,9$	9
Olaparib – PARP1 – RNA	$5,3 \pm 0,6$	57 ± 7	1,0

Dyskują na temat uzyskanego promienia hydrodynamicznego kompleksu [PARP1 – PARPi-FL] w odniesieniu do masy cząsteczkowej białka, a także opis przeprowadzonych dodatkowo symulacji wielkości cząsteczki (dr inż. Paweł Żuk) zostały szczegółowo opisane w opublikowanym artykule.¹¹³

○ Olaparib nie ulega wiązaniu niespecyficznemu do cząsteczek RNA

W ramach badań wykluczono także potencjalne wiązanie niespecyficzne między badanym lekiem a cząsteczkami RNA, przeprowadzając eksperyment kontrolny, polegający na analizie próbki w roztworze PBS zawierającej cząsteczkę RNA i inhibitor. Uzyskany współczynnik dyfuzji odpowiadał współczynnikowi dyfuzji wolnego PARPi-FL, co wskazuje na brak interakcji leku z RNA. Na Rysunku 3.2.7. zaprezentowano kształt uzyskanych krzywych autokorelacji FCS.

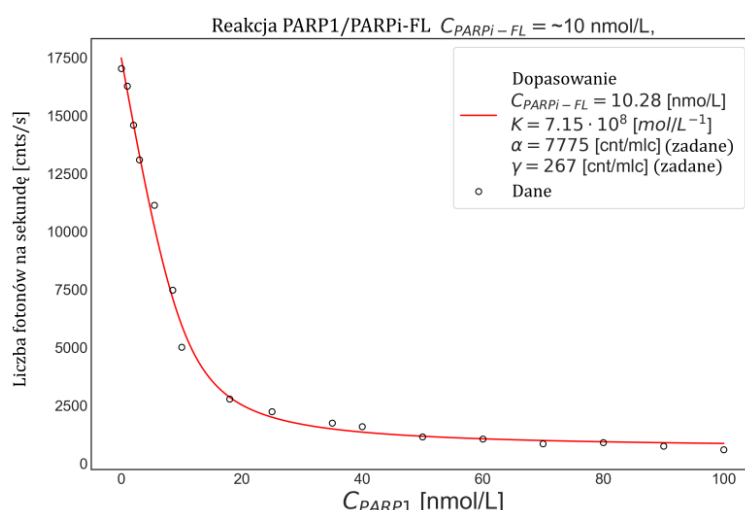


Rysunek 3.2.7. Przykładowe, znormalizowane krzywe autokorelacji FCS dla samego inhibitora oraz mieszaniny inhibitora z RNA. Z kształtu krzywych wynika, że cząsteczki RNA nie wiążą fluorescencyjnej pochodnej olaparibu.

○ Stała równowagi kompleksu PARPi-FL z białkiem PARP1

W ostatnim kroku poprzedzającym pomiary FCS wewnątrz żywych ludzkich komórek wyznaczono stałą równowagi kompleksu [PARPi-FL – PARP1], stosując opisaną wcześniej (Rozdział 2.) metodę jasności molekularnej.^{109,110} Pomiary przeprowadzono dla szeregu różnych stężeń białka PARP1, w zakresie od 1 nM do 100 nM, utrzymując stałe stężenie inhibitora. Zależność liczby fotonów na sekundę, a więc szybkości zliczania, od stężenia białka PARP1 przedstawiono na Rysunku 3.2.8.

Po związaniu inhibitora z celem molekularnym, intensywność fluorescencji emitowanej przez inhibitor maleje, odzwierciedlając spadek sygnału wraz ze wzrostem stężenia białka. Otrzymana w ten sposób średnia stała równowagi reakcji inhibitor – PARP1 wyniosła $6,06 \cdot 10^8 \text{ mol/L}^{-1}$ (uzyskana z dwóch niezależnie przeprowadzonych eksperymentów). Wartość ta jest zgodna z literaturową stałą dysocjacji kompleksu PARP1 – olaparib.¹²² Dla stałego stężenia inhibitora wynoszącego 10 nM oraz stężenia białka powyżej 10 nM intensywność fluorescencji nie zmienia się w sposób znaczący, wskazując tym samym, że na jedną cząsteczkę inhibitora przypada jedna cząsteczka PARP1. Zatem powinowactwo badanego leku do PARP1 jest wysokie.



Rysunek 3.2.8. Model dopasowania stałej równowagi kompleksu [PARPi-FL – PARP1] uzyskany z jednego z dwóch niezależnych eksperymentów. Parametrami dopasowywanymi były: stężenie związku PARPi-FL ($C_{PARPi-FL}$) oraz stała równowagi (K). MB swobodnie dyfundującego PARPi-FL (α) i kompleksu [PARPi-FL – PARP1] (γ) były zadane i stałe.

○ Interakcje wewnątrzkomórkowe olaparibu w komórkach nowotworowych

Dysponując stałą równowagi kompleksu [lek – PARP1] oraz promieniami hydrodynamicznymi oczekiwanymi w komórkach kompleksów, jak i samego olaparibu, przystąpiono do pomiarów ilościowych FCS wewnątrz żywych komórek nowotworowych. Przeprowadzone na początku obrazowanie konfokalne wykazało, że fluorescencyjna pochodna leku jest obecna w jądrze komórek potrójnie ujemnego raka piersi. Badania jakościowe potwierdzono, wykonując ilościowe eksperymenty FCS.

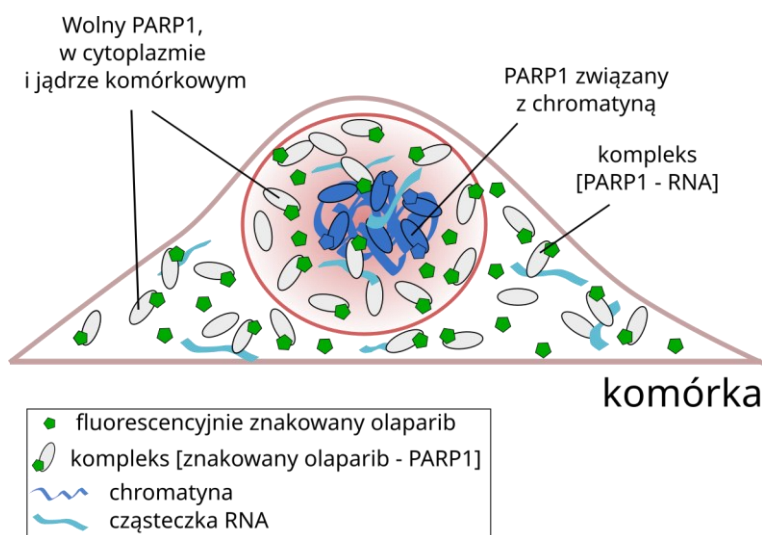
Porównując uzyskane współczynniki dyfuzji wewnątrz komórek do współczynników dyfuzji przewidywanych na podstawie modelu nanolepkości zależnego od skali (Tabela 3.2.4.), wykazano, że w jądrze komórek MDA-MB-231 obecne są trzy składniki: wolny lek, kompleks

leku z celem molekularnym (PARP1) oraz składnik przyjmujący wartości współczynnika dyfuzji od 3,6 do 0,2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

Tabela 3.2.4. Zestawienie przewidywanych na podstawie modelu nanolepkości i otrzymanych eksperymentalnie współczynników dyfuzji poszczególnych składników wykrytych w jądrze komórek linii MDA-MB-231. Błędy obliczono metodą różniczki całkowitej ($N = 10$, każda komórka była mierzona trzykrotnie).

Składnik	Przewidywany współczynnik dyfuzji w jądrze komórkowym [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] ⁸²	Otrzymany współczynnik dyfuzji w jądrze komórkowym [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	
		MDA-MB-231	HeLa
Olaparib (PARPi-FL)	250	Wartość stała, zadana	
Olaparib – PARP1	9	9 ± 2	6 ± 2
Olaparib – PARP1 – RNA	1,0	$0,8 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,3$

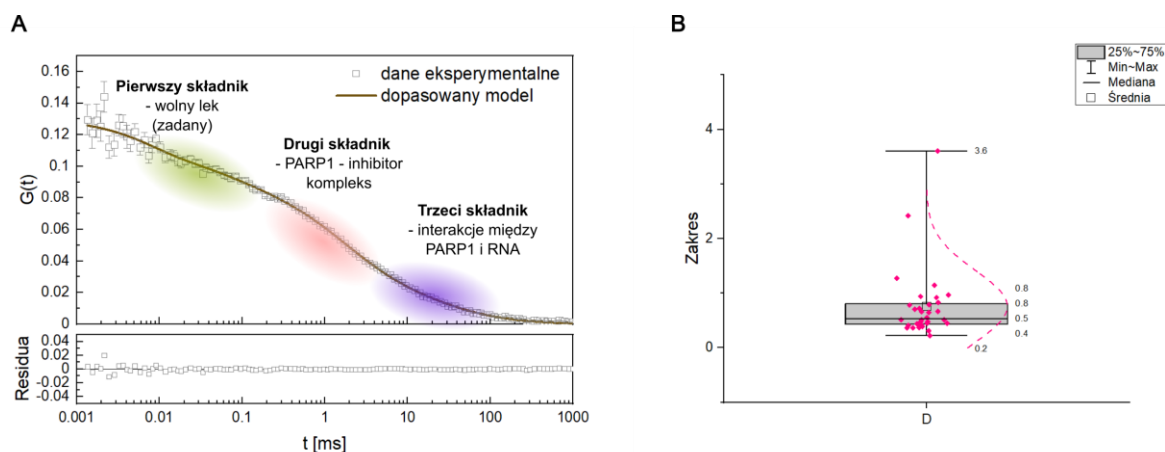
Co więcej, ustalono, wykorzystując możliwości zastosowanej techniki FCS, że badany inhibitor wiąże się ze swobodnie dyfundującym białkiem PARP1 w stopniu równym 50,1%. Pozostały odsetek składników obecnych w komórkach jest reprezentowany przez wolny, fluorescencyjny PARPi-FL (23,8%) i interakcje białka PARP1 z jądrowym RNA (26,1%). Poglądowy schemat przedstawiający komórkę z różnymi składnikami obecnymi w jej wnętrzu po inkubacji ze znakowanym olaparibem zamieszczono na Rysunku 3.2.9.



Rysunek 3.2.9. Schemat ludzkiej komórki, po jej inkubacji z fluorescencyjnym olaparibem, przedstawiający różne frakcje białka PARP1: swobodnie dyfundującą frakcję cytoplazmatyczną, wolne PARP1 w jądrze, białko związane z DNA i RNA.

Na podstawie opisanych wyżej (Podrozdział „Pomiary FCS w buforze (*in vitro*)”) wyników uzyskanych w buforze, trzeci, najwolniejszy składnik obecny w żywych komórkach przypisano oddziaływaniom kompleksu [PARP1 – lek] z cząsteczkami RNA obecnymi w jądrze

komórkowym. Stosując promień hydrodynamiczny kompleksu [lek – PARP1 – RNA] wyznaczony *in vitro* oraz model nanolepkości jądra komórkowego,⁸² obliczono, że przewidywany współczynnik dyfuzji trzeciego składnika wynosi $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Tabela 3.2.4.). Wartość ta jest zbliżona do uzyskanej, eksperymentalnej, średniej ($0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$) współczynnika dyfuzji. Rozkład składnika trzeciego, obecnego wewnątrz komórek, przedstawiono w formie wykresu pudełkowego na Rysunku 3.2.10.B, wraz z przykładową krzywą autokorelacji FCS uzyskaną w jądrze komórek MDA-MB-231.



Rysunek 3.2.10. Składniki obecne w jądrze komórkowym komórek MDA-MB-231. A) Przykładowa krzywa autokorelacji FCS z modelem dopasowania (dyfuzją normalną trzyskładnikową) i schematycznym wskazaniem zidentyfikowanych składników. B) Rozkład współczynnika dyfuzji trzeciego składnika obecnego w jądrze komórek MDA-MB-231, określonego jako interakcje białka PARP1 z cząsteczkami RNA.

Odnosząc uzyskane wyniki do danych literaturowych ustalono, że współczynnik dyfuzji różnych typów cząsteczek RNA w komórkach ssaków może wahać się od $0,04$ do $1,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$.¹²³ Zatem wartość $0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mieści się w tym zakresie.

Analogiczne, ilościowe, pomiary FCS przeprowadzono także dla komórek linii HeLa wyznakowanych PARPi-FL, w przypadku których obrazowanie wykazano akumulację leku w jądrze komórkowym. Poprzez eksperymenty FCS odnotowano znaczącą różnicę w stężeniach poszczególnych składników między oba badanymi typami komórek nowotworowych. Stężenie PARPi-FL w jądrze komórek HeLa było około dziesięciokrotnie wyższe od stężenia leku w jądrze komórek MDA-MB-231 dla tego samego stężenia na zewnątrz komórek. Co więcej, wykryto znaczące różnice w ilościach (frakcjach) poszczególnych składników. W przypadku komórek HeLa frakcja swobodnie dyfundującego leku była prawie dziesięciokrotnie niższa (około 3% całkowitego stężenia), w odniesieniu do komórek raka piersi MDA-MB-231. Szczegółowe wyniki dotyczące frakcji oraz stężeń wewnątrzkomórkowych poszczególnych składników zamieszczono w Tabeli 3.2.5.

Tabela 3.2.5. Porównanie stężeń oraz udziału (frakcji) poszczególnych składników w jądrze komórkowym względem obu badanych linii: komórek potrójnie ujemnego raka piersi MDA-MB-231 oraz raka szyjki macicy HeLa. Błędy zostały obliczone przy użyciu metody różniczki całkowitej ($N = 10$, każda komórka była mierzona trzykrotnie).

Linia komórkowa	Stężenie składnika [nM]			Frakcja składnika		
	Swobodnie dyfundujący PARPi-FL	Kompleks [olaparib – PARP1]	Kompleks [olaparib – PARP1 – RNA]	Swobodnie dyfundujący PARPi-FL	Kompleks [PARP1 – olaparib]	Kompleks [olaparib – PARP1 – RNA]
MDA-MB-231	13 ± 4	28 ± 3	16 ± 3	$0,24 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,06$
HeLa	15 ± 10	339 ± 9	152 ± 4	$0,03 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,01$

○ Obecność PARP1 w cytoplazmie komórek nowotworowych

Analogiczne ilościowe pomiary FCS przeprowadzono także w obrębie cytoplazmy komórek obu badanych typów nowotworów, pozycjonując ognisko konfokalne w odpowiednim rejonie komórki z zastosowaniem trybu obrazowania. Identyfikacja składników komórkowych została przeprowadzona w oparciu o model nanolepkości cytoplazmy zależny od skali (Równanie (1.5.), Tabela 3.1.1., Rysunek 3.1.1.).

Na podstawie analizy krzywych autokorelacji FCS wykazano, że drugi składnik w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 odpowiada, analogicznie do jądra komórkowego, kompleksowi [PARP1 – olaparib]. Porównanie oczekiwanego współczynnika dyfuzji tego kompleksu w cytoplazmie z uzyskanym współczynnikiem dyfuzji przedstawiono w Tabeli 3.2.6.

Tabela 3.2.6. Zestawienie współczynnika dyfuzji kompleksu [PARP1 – olaparib] przewidywanego na podstawie modelu nanolepkości zależnego od skali ze współczynnikiem uzyskanym dla cytoplazmy jako lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Wartości przedstawione dla obu badanych linii komórkowych. Błędy obliczono metodą różniczki całkowitej ($N = 10$; każdą komórkę mierzono trzykrotnie).

Składnik	Przewidywany współczynnik dyfuzji w cytoplazmie [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]		Otrzymany eksperymentalnie współczynnik dyfuzji w cytoplazmie [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	
	MDA-MB-231	HeLa	MDA-MB-231	HeLa
Olaparib – PARP1	10 ± 2	$7,5 \pm 0,4$	8 ± 2	6 ± 1
Olaparib – PARP1 – RNA	$1,1 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,6$

Trzeci składnik obecny w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 przyjmował podobne wartości jak w jądrze komórkowym, ze średnim współczynnikiem dyfuzji równym $0,8 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$, co odpowiada promieniowi hydrodynamicznemu 78 nm. Przyjęto, że składnik ten reprezentuje wiązanie niespecyficzne, prawdopodobnie z cytoplazmatycznym mRNA.¹²⁴ Na podstawie wcześniej przytoczonych pomiarów cząsteczki RNA z PARP1 *in vitro*, wiadomo, że rozmiar (promień hydrodynamiczny) RNA o długości 2000 nukleotydów wynosi 57 ± 7 nm. W oparciu

o model nanolepkości cytoplazmy komórek MDA-MB-231 (Tabela 3.1.1., Rysunek 3.1.1.) obliczono przewidywany współczynnik dyfuzji dla cząsteczki o takim rozmiarze. Wyniósł on $1,1 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Wartość ta mieści się w granicach błędu wartości współczynnika dyfuzji otrzymanego eksperymentalnie ($0,8 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$).

Analogiczne pomiary ilościowe FCS przeprowadzono także w cytoplazmie komórek HeLa. Drugi, zidentyfikowany składnik tak jak w przypadku komórek MDA-MB-231 odpowiadał kompleksowi [PARP1 – PARPi-FL]. Przewidywany i uzyskany współczynnik dyfuzji wynosił odpowiednio $7,5 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ i $6 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Z kolei współczynnik dyfuzji trzeciego, najwolniejszego składnika w cytoplazmie komórek HeLa wyniósł $0,6 \pm 0,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$. W oparciu o nanolepkość cytoplazmy HeLa (Tabela 3.1.1., Rysunek 3.1.1., Równanie (1.5.))⁹¹ można wnioskować, że najprawdopodobniej składnik ten również odpowiadał interakcjom białka PARP1 z cytoplazmatycznym mRNA.

Odnosząc uzyskane wyniki do danych literaturowych, ekspresja (obecność) białka PARP1 w cytoplazmie raka piersi została opisana wcześniej.^{125,126} Ponadto literatura donosi, że wysoka ekspresja cytoplazmatycznego PARP1 w przypadku potrójnie ujemnego raka piersi koreluje z agresywnym przebiegiem nowotworu i prawdopodobnym niekorzystnym długoterminowym rokowaniem. Co więcej, obecność cytoplazmatycznego PARP1 może stać się markerem pozwalającym na przewidywania dotyczące poziomu aktywności inhibitorów PARP.¹²⁷ Warto jednak zauważyć i podkreślić, że przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania donoszą, że stężenie kompleksu [inhibitor - białko] w cytoplazmie dla obu badanych linii komórkowych było praktycznie takie samo, podczas gdy efekt cytotoksyczny istotnie różnił się. Zatem wykonane eksperymenty poddają pod wątpliwość stwierdzenie o potencjale predykcyjnym występowania cytoplazmatycznej formy białka PARP1.

○ Obliczenia wewnątrzkomórkowych stężeń białka PARP1

Chcąc zweryfikować, czy stopień wnikania olaparibu do wnętrza komórek nowotworowych jest skorelowany z ilością jego celu molekularnego, PARP1, w ramach badań wyznaczono stężenia wewnątrzkomórkowe tego białka.

Na podstawie stężeń wolnego inhibitora, kompleksu [PARP1 – lek] oraz stałej równowagi między białkiem a badanym inhibitorem, wyznaczonej *in vitro*, określono ilość białka PARP1 swobodnie dyfundującego w jądrze obu typów komórek. Wartości te wynosiły odpowiednio 32 nM dla komórek MDA-MB-231 oraz 356 nM dla HeLa. Uzyskano zatem ponad dziesięciokrotnie wyższą ilość PARP1 niezwiązanego z materiałem genetycznym w komórkach HeLa, w stosunku do MDA-MB-231. Do obliczeń założono, że stała równowagi *in vivo* jest taka sama jak wyznaczona w ramach niniejszych badań *in vitro* z uwagi na brak znaczących różnic nanolepkości między komórkami a buforem dla próbników o promieniach hydrodynamicznych mniejszych niż 1 nm: dla próbника o promieniu 0,6 nm nanolepkość jądra komórek HeLa jest 1,8 razy większa od lepkości wody.

Dodatkowo, w oparciu o dane proteomiczne¹²⁸ oraz objętości badanych komórek ($6900 \mu\text{m}^3$ dla HeLa i $8400 \mu\text{m}^3$ dla MDA-MB-231, wyznaczone przy użyciu oprogramowania NIS-Elements przez dr Martę Pilz), określono całkowite stężenie białka PARP1 dla obu typów badanych nowotworów. Następnie po odjęciu stężeń białka PARP1 związanego z RNA

(uzyskanego z pomiarów FCS w komórkach), wolnego białka w cytoplazmie (opisane poniżej), i swobodnie dyfundującego w jądrze komórkowym (na podstawie pomiarów, bazując o stałą równowagi), uzyskano stężenia białka PARP1 związanego z DNA. Stężenie to było równe 632 nM dla komórek HeLa oraz 220 nM dla linii MDA-MB-231. Uzyskana wyższa ilość PARP1 związanego z DNA w komórkach HeLa potencjalnie może wynikać zarówno ze zwiększonej obecności uszkodzeń DNA w tych komórkach, jak i większego znaczenia szlaku naprawy powstałych pęknięć w materiale genetycznym za pośrednictwem białka PARP1.

Na podstawie przeprowadzonej ilościowej analizy FCS stwierdzono, że zaobserwowane różnice w rozmieszczeniu wewnątrzkomórkowym pochodnej olaparibu pomiędzy komórkami HeLa i MDA-MB-231 wynikają z poziomu ekspresji białka PARP1 dla obu badanych linii komórkowych. Poziom ekspresji białka PARP1 w komórkach HeLa jest istotnie wyższy niż w potrójnie ujemnym raku piersi linii MDA-MB-231 (na podstawie literatury - wyników Western Blot).¹²⁰ Potwierdzają to również dane proteomiczne¹²⁸ (337 nM dla MDA-MB-231 i 1200 nM dla HeLa po uwzględnieniu eksperymentalnych objętości komórek). Zatem większa ilość białka PARP1 w komórkach raka szyjki macicy implikuje odnotowany wzrost ilości leku związanego z białkiem (drugi składnik w pomiarach FCS). Podsumowanie zaobserwowanych różnic między komórkami w formie wyników ilościowych przedstawiono w Tabeli 3.2.7.

Tabela 3.2.7. Porównanie stężeń: białka PARP1 w cytoplazmie komórek, wolnego białka PARP1 w jądrze komórkowym oraz białka PARP1 związanego z DNA pomiędzy komórkami MDA-MB-231 i HeLa. Błędy były obliczone przy użyciu metody różniczki całkowitej. (N = 10; każda komórka była mierzona trzykrotnie).

Linia komórkowa	Stężenie kompleksu [PARP1 – olaparib] w cytoplazmie [nM]	Stężenie wolnego białka PARP1 w jądrze komórkowym [nM] ^a	Stężenie białka PARP1 związanego z DNA [nM] ^b
MDA-MB-231	68 ± 1	32 ± 6	220
HeLa	61 ± 1	356 ± 87	632

^a na podstawie stałej równowagi wyznaczonej *in vitro*; ^b na podstawie danych proteomicznych¹²⁸

Podsumowanie badań nad wnikaniem olaparibu do wnętrza komórek nowotworowych

W wyniku przeprowadzonych badań nad lekiem o nazwie olaparib ustalono, że fluorescencyjna pochodna tej cząsteczki wnika do dwóch typów komórek nowotworowych – raka szyjki macicy (linia HeLa) oraz potrójnie ujemnego raka piersi (linia MDA-MB-231). Wykonane eksperymenty FCS (w połączeniu z obrazowaniem konfokalnym) pozwoliły stwierdzić, co dzieje się z badanym lekiem we wnętrzu żywych komórek, na poziomie pojedynczej cząsteczki i pojedynczych komórek. Określono, które składniki (swobodnie dyfundujący inhibitor, kompleks [PARPi-FL – PARP1] oraz kompleks [PARPi-FL – PARP1 – RNA]) i w jakich stężeniach są obecne w jądrze komórkowym po inkubacji z fluorescencyjną pochodną olaparibu, PARPi-FL.

Przeprowadzone eksperymenty FCS w połączeniu z obrazowaniem konfokalnym, wyznaczeniem stałej równowagi kompleksu [olaparib – PARP1], testami cytotoksyczności oraz obliczeniami stężeń białka PARP1 i dyskusją literaturową pozwoliły na szerszą analizę

zależności między potencjałem terapeutycznym, wnikaniem badanej cząsteczki do komórek, a stężeniami białek PARP1/BRCA1. Poniżej szerzej opisano poszczególne zagadnienia.

○ **Różnice między rakiem szyjki macicy a potrójnie ujemnym rakiem piersi**

Poprzez analizę dwóch rodzajów nowotworów, zidentyfikowano liczne różnice między liniami komórkowymi MDA-MB-231 oraz HeLa:

- PARPi-FL akumuluje się w jądrze komórek HeLa (całkowite stężenie pochodnej olaparibu było około 10-krotnie wyższe);
- rak szyjki macicy jest bardziej oporny na fluorescencyjną pochodną olaparibu;
- efektywność wnikania znakowanego olaparibu do komórek HeLa była o około 30% wyższa;
- w komórkach MDA-MB-231 stwierdzono obecność onkosomów - pęcherzyków charakterystycznych dla komórek nowotworowych.

○ **Zależność między wnikaniem olaparibu, ilością PARP1 i cytotoksycznością**

Na podstawie literatury i danych proteomicznych wiadomo, że akumulacja leku w jądrze jest związana z ilością białka PARP1. Podobnie jest ze skutecznością wnikania, którą także determinuje ilość celu molekularnego badanego inhibitora, a więc białka PARP1. Z danych literaturowych wiadomo, że nadekspresja białka PARP1 w komórkach macierzystych raka piersi jest związana z opornością na olaparib.¹²⁹ Co więcej, w przypadku neuroblastomy¹³⁰ i raka piersi¹³¹ wysoki poziom ekspresji PARP1 jest powiązany z niekorzystnym dla pacjenta rokowaniem. Przytoczone raporty są zgodne z uzyskanymi wynikami: skuteczność wnikania i akumulacja leku w miejscu działania, którym jest jądro komórkowe, raka szyjki macicy nie były równoznaczne z efektem cytotoksycznym: komórki tej linii były bardziej odporne na badany lek.

○ **Obecność białka PARP1 w cytoplazmie a efekt cytotoksyczny**

Co istotne, białko PARP1 (a tym samym jego kompleks z badaną cząsteczką) zidentyfikowano nie tylko w jądrze komórek nowotworowych, ale również w cytoplazmie obu badanych linii komórkowych. W przypadku komórek HeLa, obecność cytoplazmatycznej formy PARP1 odnotowano po raz pierwszy. Przeprowadzone testy cytotoksyczności pozwoliły jednak wykazać, że ekspresja białka PARP1 w cytoplazmie nie koreluje z efektem cytotoksycznym - dla obu linii komórkowych stężenia kompleksu [lek – białko] w cytoplazmie były bardzo podobne, podczas gdy oporność komórek HeLa wyższa.

○ **Zależność między cytotoksycznością a ilością białka BRCA1**

Warto także podsumować uzyskane wyniki w ujęciu występowania mutacji BRCA1. Obie testowane linie komórkowe są pozbawione tej mutacji. FDA zatwierdziła stosowanie inhibitora PARP u pacjentek z rozpoznaniem potrójnie ujemnym rakiem piersi, ale z mutacją BRCA1. Tylko wtedy bowiem uszkodzenia DNA wywołane przez olaparib nie są naprawiane przez białko BRCA1. Zatem im większa ilość białka BRCA1, tym skuteczniejsze są procesy naprawcze. Na podstawie literatury wiadomo, że komórki raka szyjki macicy HeLa wytwarzają znacznie więcej białka BRCA1 w porównaniu z komórkami potrójnie ujemnego raka piersi.¹²⁰

Zestawiając to z danymi proteomicznymi¹²⁸ wskazującymi, że linia komórkowa HeLa jest drugą pod względem największej produkcji białka BRCA1, można stwierdzić, że mimo większej akumulacji leku w komórkach (HeLa), efekt terapeutyczny olaparibu jest ściśle związany z ilością białka BRCA1. Tym samym najlepsze efekty leczenia inhibitorami PARP powinny wystąpić u pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi pozbawionym mutacji BRCA. Wówczas brak jest ścieżki naprawiającej uszkodzenia indukowane olaparibem. Jednak przeprowadzone badania wykazały, że nawet komórki posiadające białko BRCA1, ale w niewielkich ilościach, jak linia MDA-MB-231, są wrażliwe na znakowany olaparib.

3.3. Wnikanie na drodze endocytozy na przykładzie leku o nazwie bewacizumab

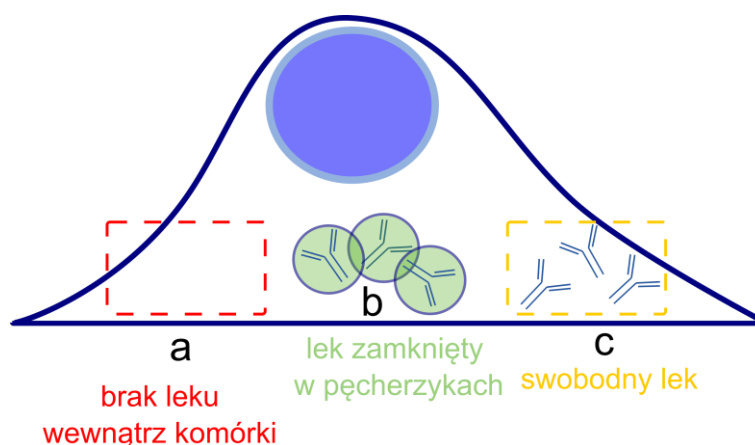
Obok olaparibu, przykładem innej, szeroko badanej, terapii celowanej do leczenia nowotworów kobiecych jest przeciwciało o nazwie bewacizumab (Rozdział 1.2.). Wyżej opisane badania wykazały, że z zastosowaniem techniki FCS można zweryfikować, czy badany związek fluorescencyjny swobodnie dyfunduje w cytoplazmie, czy ulega związaniu z celem molekularnym. Co istotne, z użyciem tej metody badawczej możliwe jest rozróżnienie, czy sygnał pochodzi od swobodnie dyfundującego związku, czy związku zamkniętego wewnątrz pęcherzyków. Jeśli bowiem cząsteczka jest obecna wewnątrz pęcherzyków, kształt krzywej autokorelacji FCS oraz zastosowany do opisu danych model matematyczny będzie charakterystyczny dla takiego zachowania cząsteczki. W niniejszym rozdziale zweryfikowano doniesienia literaturowe o internalizacji bewacizumabu do wnętrza komórek nowotworowych. Bowiem działanie bewacizumabu, z uwagi na występowanie jego celu, VEGF, na zewnątrz komórek, powinno być również zewnątrzkomórkowe. Co istotne, wnikanie bewacizumabu do wnętrza komórek będzie zjawiskiem niepożądanym, prowadzącym do obniżenia jego potencjału terapeutycznego. Technika FCS wykryło pojedyncze cząsteczki fluorescencyjnego leku w komórkach potrójnie ujemnego raka piersi i raka szyjki macicy, określając, czy bewacizumab wnika do ludzkich komórek. Opisane poniżej wyniki zostały w całości opublikowane.¹³²

Tabela poniżej zawiera szczegóły eksperymentalne dotyczące wykonanych pomiarów.

Tabela 3.3.1. Informacje techniczne dotyczące pomiarów wykonanych w Rozdziale 3.3.

Badane linie komórkowe	Roztwór/roztwory zastosowane do pomiarów FCS <i>in vitro</i>	Temperatura pomiarów	Zastosowany model matematyczny <i>in vitro</i>	Zastosowany model matematyczny <i>in vivo</i>
MDA-MB-231, HeLa	PBS, medium hodowlane otaczające badane komórki	36°C ± 0,5°C	Bewacizumab oraz jego kompleks z VEGF: model dyfuzji normalnej jednoskładnikowej ($\alpha = 1, i = 1$ z Równania (2.1.))	Równanie (3.3.) poniżej

Schemat komórki obrazujący rozważane losy badanego bewacizumabu we wnętrzu komórki przedstawiono poniżej.



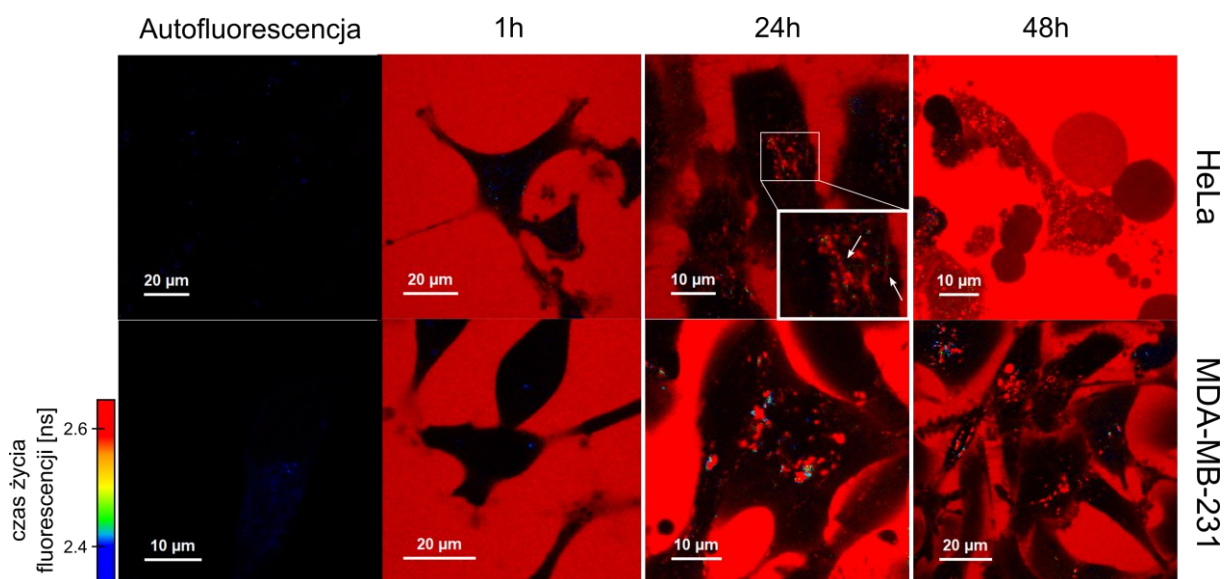
Rysunek 3.3.1. Możliwe losy wewnątrzkomórkowe leku bewacizumab. Oprócz przedstawionych wariantów, możliwe są także interakcje leku ze składnikami komórkowymi, jak błony, organelle, kwasy nukleinowe.

Jakościowa ocena internalizacji bewacizumabu do żywych komórek

Badanie internalizacji bewacizumabu do komórek raka szyjki macicy (HeLa) i potrójnie ujemnego raka piersi (MDA-MB-231) rozpoczęto od obrazowania FLIM, pozwalającego na rozróżnienie sygnału emitowanego przez lek (wyznakowany barwnikiem Atto 488 NHS, emitującym fluorescencję o długości fali 488 nm) od autofluorescencji komórek, stosując filtrowanie po czasach życia fluorescencji, odpowiednio poniżej 2,4 ns dla autofluorescencji i powyżej 2,6 ns dla badanego bewacizumabu.¹⁰⁶

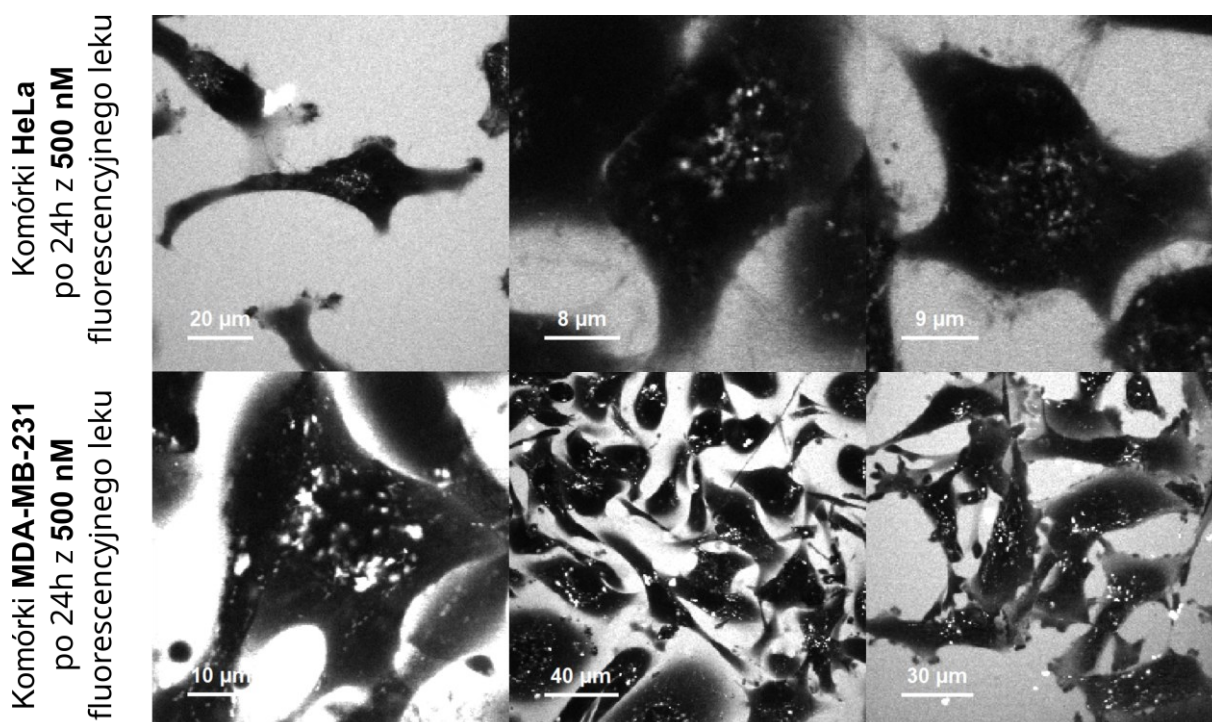
Uzyskane zdjęcia FLIM (Rysunek 3.3.2.) wykazały, że po 1. godzinie inkubacji bewacizumab nie był obecny we wnętrzu komórek HeLa, o czym świadczy brak sygnału odpowiadającemu czasowi życia fluorescencji powyżej 2.6 ns. Sygnał ten odpowiada kolorowi czerwonemu. Ciemne obszary (Rysunku 3.3.2., panel 1h) odpowiadają komórkom. Sygnał o czasie życia fluorescencji powyżej 2.6 ns (czerwony) był widoczny tylko w obszarach zewnątrzkomórkowych. Warto jednak zauważyć, że istotna zmiana w ujęciu internalizacji

badanego przeciwciała nastąpiła po 24. godzinach inkubacji (Rysunku 3.3.2., panel 24h). Po tym czasie w komórkach obecne były pęcherzyki emitujące sygnał powyżej 2.6 ns. Warto zauważyć, że wybarwione zostały również wydłużone struktury wokół jądra komórkowego (Rysunek 3.3.2., panel 24h).



Rysunek 3.3.2. Obrazowanie FLIM komórek HeLa oraz MDA-MB-231 inkubowanych ze znakowanym bewacizumabem przez 1. godzinę, 24 godziny i dwa dni. Czerwony kolor wskazuje na badany lek, niebieski odpowiada autofluorescencji komórek. Dla komórek HeLa po 24. godzinach inkubacji z fluorescencyjnym bewacizumabem odnotowano obecność zabarwionych, wydłużonych struktur (strzałki wskazują przykładowe miejsca ich występowania). Przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty dla każdej linii komórkowej dla każdego z badanych czasów inkubacji.

Aby jeszcze wyraźniej zaznaczyć wyznakowane obszary, na Rysunku 3.3.3. przedstawiono więcej zdjęć w skali szarości. Zaobserwowane, fluorescencyjne, pęcherzyki były obecne w jądrze komórek raka szyjki macicy (HeLa). Wydłużając czas inkubacji z lekiem, po 48. godzinach komórki HeLa zmieniły swoją morfologię z komórek o wydłużonym kształcie (charakterystycznym dla komórek adherentnych) na komórki o kształcie kulistym. Odnotowane zmiany morfologiczne sugerowały śmierć badanych komórek po 2. dniach z lekiem obecnym w medium hodowlanym.



Rysunek 3.3.3. Zdjęcia konfokalne (w skali szarości) komórek HeLa i MDA-MB-231 uzyskane po 24. godzinach. Badane komórki inkubowano z 500 nM znakowanego bewacizumabu.

Wyniki obrazowania FLIM uzyskane dla komórek HeLa porównano następnie do innego typu nowotworu – potrójnie ujemnego raka piersi (MDA-MB-231). Podobnie do linii komórkowej HeLa, MDA-MB-231 nie pobierała badanego przeciwciała po 1. godzinie inkubacji. Co więcej, w komórkach nowotworu piersi także dopiero po 24. godzinach inkubacji były widoczne wewnątrzkomórkowe pęcherzyki emitujące sygnał powyżej 2.6 ns. Na tym etapie zaobserwowano różnicę między dwiema badanymi liniami komórkowymi, bowiem we wnętrzu komórek MDA-MB-231 nie były widoczne wybarwione, wydłużone struktury, których obecność odnotowano wcześniej w komórkach HeLa. Dodatkowa różnica dotyczyła lokalizacji/rozmieszczenia pęcherzyków wewnątrzkomórkowych. Dla linii komórek MDA-MB-231 pęcherzyki były obecne w całej cytoplazmie. Dodatkowo, po 48. godzinach komórki potrójnie ujemnego raka piersi pozostały żywe (na podstawie oceny morfologicznej).

Uzyskane w ramach niniejszych badań jakościowe wyniki obrazowania FLIM są sprzeczne w odniesieniu do literatury. Na tym etapie bowiem, w żadnej z poddanych analizie linii komórkowych nie wykryto cytoplazmatycznej, wolnej, frakcji bewacizumabu, leku związanego z błonami czy cytoszkieletem. Obecność takich frakcji jest z kolei opisana w pracy Deisslera oraz Borchersa.^{133,134} Jednak różnice między uzyskanymi wynikami a danymi literaturowymi wynikają najprawdopodobniej z typu badanych komórek. Deissler, a także Borchers badali komórki śródbłónka siatkówki. Warto także pamiętać, że w niniejszej pracy analizowano proces internalizacji fluorescencyjnego bewacizumabu do komórek żywych, bez zmienionego metabolizmu, a zastosowaną techniką był rodzaj spektroskopii. W literaturze występują informacje dotyczące komórek utrwalonych formaldehydem, a metodą stosowaną do badania wnikania komórkowego było immunobarwienie, pozwalające na śledzenie procesu wnikania w sposób pośredni. Immunobarwienie polega bowiem na detekcji sygnału pochodzącego od znakowanego przeciwciała drugorzędowego (lek - przeciwciało

pierwszorzędowe - przeciwciało drugorzędowe - barwnik). W przypadku zastosowanego obrazowania FLIM analizowano konjugat leku z barwnikiem. Niemniej jednak, w obu przypadkach barwnik powinien być przyłączony do badanej cząsteczki.

Aby upewnić się, że w trakcie opisywanych w tej pracy badań analizie poddawany jest kompleks lek-barwnik, wykonano szereg eksperymentów kontrolnych. Badania te polegały na wykluczeniu obecności wolnego barwnika w próbce, za każdym razem określając rozmiar badanego znakowanego przeciwciała (szczegóły: podrozdział „*Wiązanie bewacizumabu do celu molekularnego – czynnika VEGF*”). Eksperymenty kontrolne przeprowadzano zawsze przed inkubacją komórek z badanym lekiem.

Współczynnik podziału dla internalizacji bewacizumabu do komórek nowotworowych

Podobnie do badań opisanych w Rozdziale 3.2., dla badanego bewacizumabu obliczono współczynnik podziału, charakteryzując w ten sposób ilościowo efektywność internalizacji bewacizumabu do wnętrza komórek. Stężenie wewnątrzkomórkowe leku (licznik współczynnika podziału) określono na podstawie analizy obrazów FLIM (szczegóły: Rozdział 2.). Natomiast stężenie zewnątrzkomórkowe bewacizumabu (mianownik współczynnika podziału) wyznaczono wykonując pomiary FCS w medium otaczającym badane komórki.

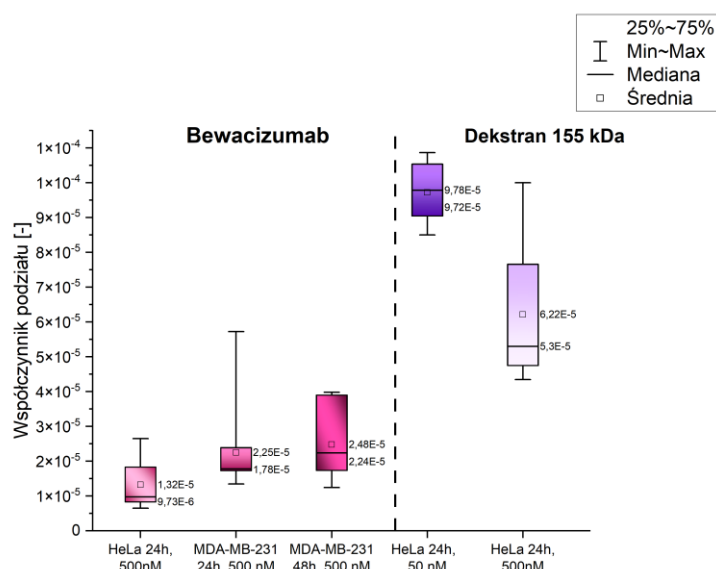
Współczynnik podziału obliczono dla obu badanych typów nowotworów (potrójnie ujemnego raka piersi i raka szyjki macicy) po 24. godzinach inkubacji z lekiem, a także 48. godzinach w przypadku komórek MDA-MB-231 (komórki HeLa po 2. dniach z bewacizumabem były martwe). Przyjęto, że po upływie takiego czasu została osiągnięta równowaga wymiany leku (mechanizm jego pobierania i usuwania) pomiędzy komórką a medium ją otaczającym. Uzyskane wartości współczynników podziału zestawiono na Rysunku 3.3.4. Dokładne wartości współczynników zamieszczono także w Tabeli 3.3.2.

Tabela 3.3.2. Wartości (średnie $\pm$ odchylenie standardowe) współczynników podziału bewacizumabu, liczonych jako stosunek stężenia wewnątrzkomórkowego leku do jego stężenia zewnątrzkomórkowego. Metodę wyznaczania tego parametru przedstawiono schematycznie na Rysunku 2.3. Zamieszczono wartości dla linii komórkowych HeLa i MDA-MB-231 po odpowiednich czasach inkubacji. Błędy zostały obliczone przy użyciu metody różniczki całkowitej ($N = 8$; każda komórka była mierzona trzykrotnie).

Linia komórkowa z czasem inkubacji	Współczynnik podziału ($\cdot 10^{-5}$)
HeLa 24h inkubacji	$1,3 \pm 0,7$
MDA-MB-231 24h inkubacji	2 ± 1
MDA-MB-231 48h inkubacji	2 ± 1

Analizując uzyskane wyniki, na tym etapie założono, że sygnał o czasie życia powyżej 2,6 ns odpowiada barwnikowi użytemu do znakowania przeciwciała. Stężenie związku zamkniętego wewnątrz pęcherzyków wewnątrzkomórkowych było około 10^5 razy mniejsze w porównaniu do stężenia leku w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Nie jest jednak jednoznaczne, czy po tak stosunkowo długim czasie w pęcherzykach jest obecny kompleks [lek – barwnik], czy też sam barwnik z uwagi na możliwą degradację badanego przeciwciała. Współczynniki podziału nie różniły się znacząco względem obu badanych typów komórek nowotworowych. Dodatkowo, w przypadku linii MDA-MB-231 parametr ten przyjął zbliżone wartości zarówno po 24. jak i

48. godzinach inkubacji. Warto dodać, że proces internalizacji bewacizumabu wydaje się być zależny termodynamicznie, gdyż nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy typami nowotworów i czasem inkubacji. Dla porównania, gdyby lek był transportowany w sposób aktywny, a zawartość pęcherzyków byłaby uwalniana do cytoplazmy, wówczas współczynnik podziału mógłby osiągnąć wartość bliską lub równą 1.



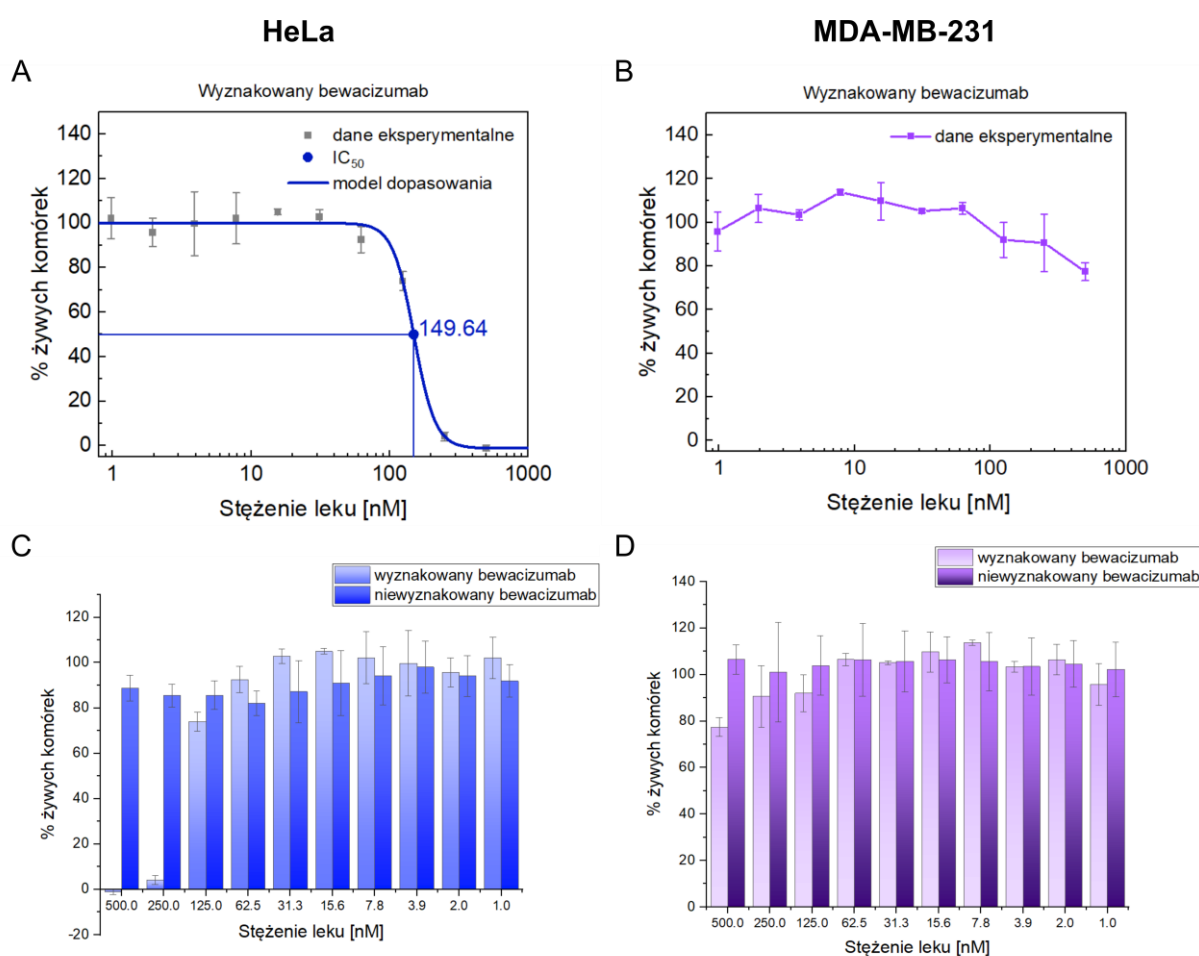
Rysunek 3.3.4. Współczynnik podziału jako parametr określający efektywność internalizacji bewacizumabu. Wykres pudełkowy, uwzględniający wyniki dla komórek HeLa po 24. godzinach inkubacji oraz MDA-MB-231 po 24. i 48. godzinach. Jako porównanie zastosowano wnikanie TRITC-dekstranu o masie cząsteczkowej 155 kDa do komórek HeLa po 24. godzinach inkubacji z 500 nM i 50 nM polimerem. Przedstawiono wartości uśrednione z ośmiu niezależnych powtórzeń.

Badania rozszerzono, porównując współczynnik podziału dla bewacizumabu z efektywnością wnikania neutralnego dla komórek, nie oddziałującego wewnątrzkomórkowo, TRITC-dekstranu o masie cząsteczkowej 155 kDa. Wielkość (promień hydrodynamiczny) wybranego polimeru jest zbliżona do bewacizumabu (szczegóły: podrozdział „Wiązanie bewacizumabu do celu molekularnego – czynnika VEGF”) i wynosi 8,6 nm.⁸⁸ Jedynym możliwym mechanizmem transportu dekstranu do komórki powinna być konstytutywna endocytoza. Pomiary wykonano dla komórek HeLa po 24. godzinach inkubacji z 500 nM i 50 nM TRITC-dekstranem. Uzyskane wyniki porównano z wynikami współczynnika podziału dla bewacizumabu i przedstawiono na Rysunku 3.3.4. Uzyskany, nieco wyższy współczynnik podziału dla TRITC-dekstranu, dowodzi, że bewacizumab, działający poza komórkami, nie jest pobierany przez komórki chętniej od związku uznawanego za neutralny - TRITC-dekstranu.

Poprzednie badania¹¹³ (Rozdział 3.2.) wykazały, że współczynnik podziału jest parametrem stałym dla danego związku i linii komórkowej, niezależnym od stężenia leku w medium hodowlanym. Różnice we współczynnikach podziału pomiędzy stężeniami 500 nM i 50 nM TRITC-dekstranu wynikają prawdopodobnie z ograniczeń sprzętowych. Stężenia zostały określone przy użyciu metody FCS dedykowanej do analizy stężeń rzędu nM. Przy stężeniach 500 nM uzyskane współczynniki obarczone są znacznym błędem, co może implikować różnice pomiędzy współczynnikiem uzyskanym dla 50 nM i 500 nM. Należy jednak podkreślić, że rząd wielkości współczynnika podziału w przypadku bewacizumabu i TRITC-dekstranu 155 kDa jest taki sam.

Znakowany bewacizumab wykazuje cytotoksyczność względem komórek HeLa

Zmiany morfologiczne zaobserwowane w obrazowaniu FLIM komórek HeLa inkubowanych przez 48 godzin ze znakowanym lekiem (Rysunek 3.3.2.) sugerowały cytotoksyczność bewacizumabu wobec tego typu nowotworu. W ujęciu otrzymanych wyników jakościowych, zbadano w sposób ilościowy potencjalną toksyczność fluorescencyjnego bewacizumabu wobec obu badanych typów nowotworów. Cytotoksyczność znakowanego przeciwciała badano przy użyciu testu alamarBlue® (w zakresie stężeń 1 - 500 nM). Jak przedstawiono na Rysunku 3.3.5.A, C, znakowany bewacizumab w najwyższych testowanych stężeniach (500 nM i 250 nM) zabijał komórki raka szyjki macicy. Wartość IC_{50} wynosiła 149,64 nM.

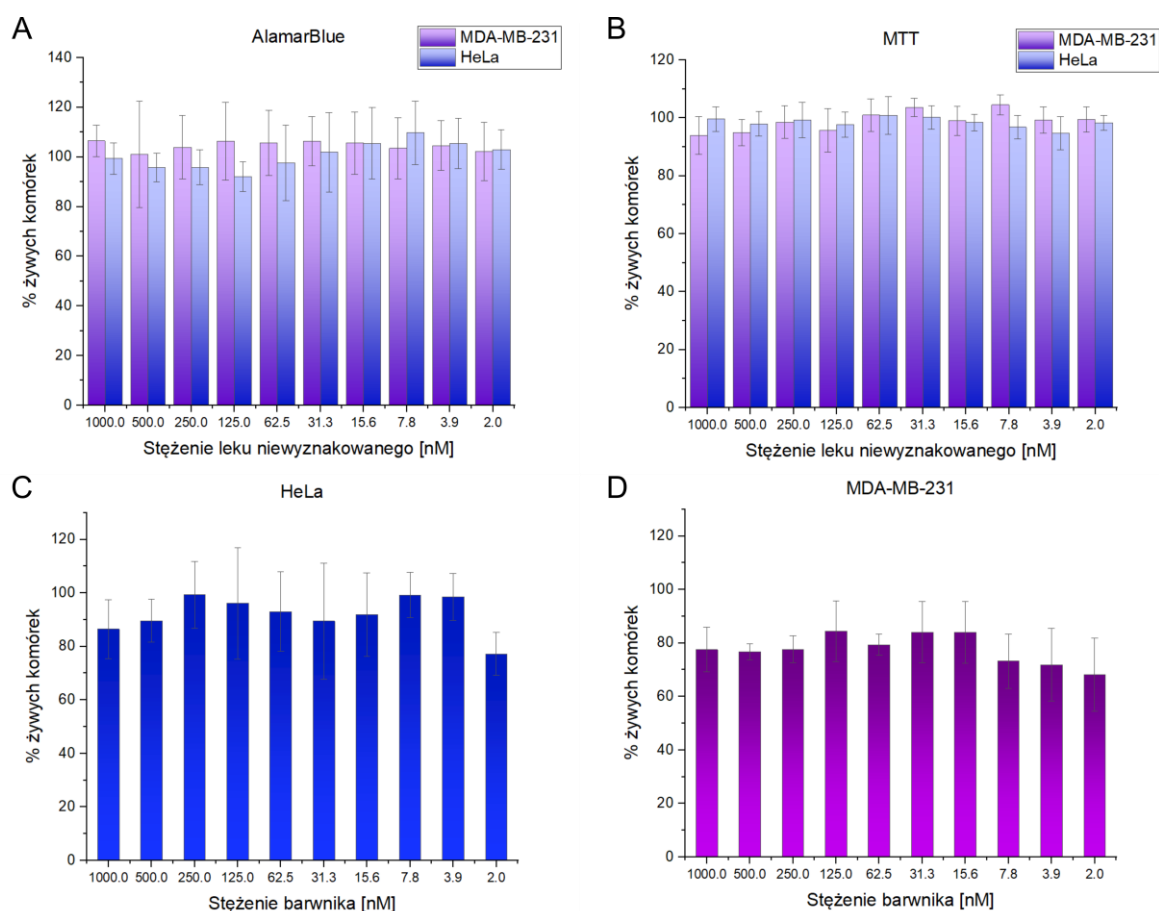


Rysunek 3.3.5. Cytotoksyczność bewacizumabu względem linii komórkowych HeLa oraz MDA-MB-231: A) Żywotność komórek HeLa inkubowanych z fluorescencyjnym lekiem w funkcji stężenia związku, z wartością IC_{50} , na podstawie testu alamarBlue®. B) Żywotność komórek MDA-MB-231 inkubowanych z fluorescencyjnym lekiem w funkcji stężenia związku, z wartością IC_{50} , na podstawie testu alamarBlue®. C) Porównanie cytotoksyczności leku wyznakowanego i niewyznakowanego względem linii komórkowej HeLa. D) Porównanie cytotoksyczności wyznakowanego i niewyznakowanego bewacizumabu względem linii komórkowej MDA-MB-231.

Dla porównania, komórki MDA-MB-231 inkubowane z 500 nM i 250 nM fluorescencyjnie znakowanego bewacizumabu pozostały żywe odpowiednio w 77% i 90%. Niewielki spadek żywotności komórek potrójnie ujemnego raka piersi widoczny na Rysunku 3.3.5.B, D dla trzech najwyższych stężeń leku może sugerować nieznaczną odpowiedź komórkową na badany

związek. Jednak spadek ten mieści się w zakresie błędu. Zatem ilościowe wyniki alamarBlue® potwierdziły obserwacje odnotowane poprzez obrazowanie FLIM.

W ramach badań zweryfikowano również, czy przyłączenie cząsteczki barwnika do cząsteczki leku wpływa na jego właściwości farmakologiczne. W tym celu, przetestowano potencjalną cytotoksyczność bewacizumabu pozbawionego barwnika (w zakresie stężeń 2 - 1 000 nM) wobec obu badanych liniom komórkowym (Rysunek 3.3.6.C, D). W tym przypadku również zastosowano test alamarBlue®, który wykazał, że pozbawiony barwnika lek nie wykazuje cytotoksyczności wobec żadnego z badanych typów nowotworów (Rysunek 3.3.6.A). Chcąc potwierdzić uzyskane wyniki poszerzono badania, wykonując test MTT, w którym żywotność obu linii komórkowych utrzymywała się na poziomie 100% (Rysunek 3.3.6.B).



Rysunek 3.3.6. Cytotoksyczność bewacizumabu oraz barwnika zastosowanego do wybarwienia przeciwciała: Atto 488 NHS. A) Zależność żywotności komórek HeLa oraz MDA-MB-231 od stężenia niewyznakowanego bewacizumabu, określona w teście alamarBlue®. B) Zależność żywotności komórek HeLa oraz MDA-MB-231 od stężenia niewyznakowanego bewacizumabu, wyznaczona w teście MTT. C) Cytotoksyczność estru Atto 488 NHS (użytego barwnika) wobec komórek HeLa określona za pomocą testu MTT. D) Cytotoksyczność estru Atto 488 NHS wobec linii komórkowej MDA-MB-231 określona za pomocą testu MTT.

Uzyskane wyniki względem komórek MDA-MB-231 są zgodne z doniesieniami literaturowymi. Emlet i inni¹³⁵ raportowali niewielki spadek żywotności linii komórkowej MDA-MB-231 dla nieznakowanego bewacizumabu w stężeniach do 670 nM. Ten brak odpowiedzi w żywotności komórek potrójnie ujemnego raka piersi na pozbawiony barwnika bewacizumab może wynikać z istotnego spadku poziomu ekspresji celu molekularnego

badanego leku - czynnika VEGF, po 24. godzinach inkubacji komórek MDA-MB-231 z lekiem.¹³⁶ Warto podkreślić także, że uzyskane wyniki cytotoksyczności dowodzą, że znakowanie bewacizumabu zmienia jego potencjał kliniczny. Obserwacje te są prawdopodobnie bezpośrednio związane z inną stałą równowagi między lekiem a jego celem działania - czynnikiem VEGF. Stała równowagi znakowanego kompleksu [lek – VEGF] jest prawdopodobnie wyższa niż w przypadku pozbawionego barwnika bewacizumabu. Wartość stałej równowagi bezpośrednio przekłada się z kolei na znaczenie terapeutyczne i właściwości farmakologiczne.

Na koniec, zbadano również cytotoksyczność samego barwnika (ester Atto 488 NHS), chcąc upewnić się, że obserwowana toksyczność znakowanego leku nie jest spowodowana toksycznością samego barwnika. Barwnik nie był szkodliwy dla żadnego typu badanych komórek, nawet w najwyższym testowanym stężeniu równym 1 μM . Żywotność komórek HeLa poddanych działaniu Atto 488 NHS wynosiła 90% dla wszystkich badanych stężeń (Rysunek 3.3.6.C). W przypadku komórek MDA-MB-231, około 80% komórek poddanych działaniu Atto 488 NHS wykazało żywotność niezależnie od stężenia barwnika (Rysunek 3.3.6.D).

Wielkość bewacizumabu oraz jego wiązanie z VEGF – warunki in vitro

○ Wiązanie bewacizumabu do celu molekularnego – czynnika VEGF

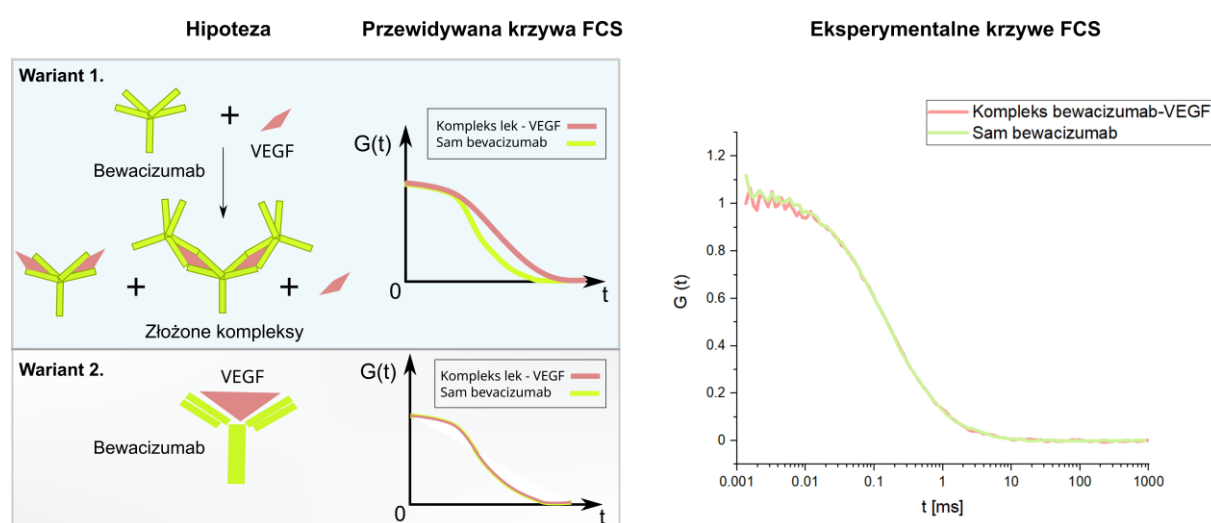
Według mechanizmu działania, bewacizumab wiąże się do czynnika VEGF. W ramach badań zweryfikowano, czy bewacizumab po związaniu (jeśli taka reakcja zachodzi) ze swoim celem molekularnym zmienia swój rozmiar na tyle, aby zmiany te były widoczne podczas eksperymentów FCS. Pomiar w roztworze PBS zawierającym lek i VEGF-A w stosunku stechiometrycznym 1:2 nie wykazały znaczących różnic we współczynniku dyfuzji między samym lekiem a lekiem inkubowanym z VEGF-A. Uzyskane wyniki podsumowano w Tabeli 3.3.3.

Tabela 3.3.3. Współczynniki dyfuzji i promienie hydrodynamiczne samego bewacizumabu, oraz kompleksu pomiędzy badanym lekiem a VEGF-A (pomiar wykonany w buforze), uzupełnione o wartości jasności wyrażonej w liczbie zliczeń fotonów na sekundę. Wyniki uzyskano z trzech niezależnych eksperymentów, a błędy obliczono przy użyciu metody różniczki całkowitej ($N = 10$).

Parametr	Sam bewacizumab	Bewacizumab inkubowany z VEGF-A
Współczynnik dyfuzji [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	49 ± 1	51 ± 1
Promień hydrodynamiczny [nm]	$6,2 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,1$ (stosunek stechiometryczny 1:2)
Jasność [liczba zliczeń/s]	29 734	27 548 (stosunek stechiometryczny 1:30)

Eksperymenty FCS *in vitro* określiły zatem, że rozmiar kompleksu bewacizumab-VEGF i samego leku jest taki sam (zmiany mieszczą się w granicach błędów). Kształty krzywych autokorelacji FCS (Rysunek 3.3.7.) potwierdzają wartości liczbowe. Pojawia się zatem pytanie, w jaki sposób VEGF wiąże się do cząsteczki przeciwciała, że reakcja ta nie wpływa na rozmiar leku. W literaturze istnieją dwie hipotezy dotyczące struktury kompleksu [VEGF –

bewacizumab]. Chang i inni opisali pierwszą z nich:¹³⁷ w próbce bewacizumabu z nadmiarem VEGF, jedna cząsteczka leku będzie wiązać dwie cząsteczki czynnika. Proponowany schemat tworzenia kompleksu przedstawiono na Rysunku 3.3.7. (wariant 1). Co istotne, hipoteza ta zakłada, że możliwe jest tworzenie kompleksów supramolekularnych. Należy także zaznaczyć, że autorzy tej pracy¹³⁷ uzyskali wyniki (przesunięcie pików na chromatogramie) wskazujące na wzrost wielkości leku po dodaniu czynnika VEGF do próbki przeciwciała. Przeprowadzone w ramach niniejszych badań eksperymenty FCS jednoznacznie wykluczyły możliwość tworzenia większych kompleksów - nie zaobserwowano dodatkowego składnika o promieniu większym niż badany lek. Obecność tak dużych kompleksów znalazłaby odzwierciedlenie w przesunięciu krzywych autokorelacji FCS (Rysunek 3.3.7.). W konsekwencji kompleksy implikowałyby zastosowanie dwuskładnikowego modelu dyfuzji jako modelu dopasowania danych eksperymentalnych, a dobrany został model dyfuzji jednoskładnikowej.



Rysunek 3.3.7. Schematy hipotez dotyczących wiązania bewacizumabu z VEGF w zestawieniu z uzyskanymi eksperymentalnie krzywymi autokorelacji FCS dowodzącymi brak zmian po związaniu leku z czynnikiem. Lewy panel: Hipotezy dotyczące wyglądu kompleksu bewacizumabu z VEGF. Wariant 1: Mechanizm wiązania VEGF z bewacizumabem zaproponowany przez Chang i innych.¹³⁷ Jedna cząsteczka leku wiąże dwie cząsteczki VEGF. Możliwe jest również tworzenie kompleksów supramolekularnych. Wariant 2: Prosty schemat przedstawiający kompleks bewacizumabu z VEGF zdeponowany w bazie danych PDB.¹³⁸ Prawy panel: Kształt eksperymentalnych krzywych autokorelacji FCS jako wskaźnik zmian wielkości badanego próbniaka. Nie odnotowano żadnych różnic między samym lekiem a próbką leku z czynnikiem VEGF.

Alternatywny sposób wiązania VEGF do bewacizumabu bazuje na strukturze 3D mutantu Fab bewacizumabu w kompleksie z VEGF, dostępnej w bazie danych PDB.¹³⁸ W tym wariancie, VEGF znajduje się pomiędzy dwoma fragmentami Fab przeciwciała a stosunek stechiometryczny wynosi jedna cząsteczka VEGF na jedną cząsteczkę leku (Rysunek 3.3.7., wariant 2). Biorąc pod uwagę masy cząsteczkowe badanego leku i VEGF-A (odpowiednio 149 kDa i 45 kDa) można wnioskować, że VEGF wbudowuje się pomiędzy specyficzne fragmenty przeciwciała. Wyniki uzyskane z pomiarów FCS wskazują na wariant 2. wiązania leku ze swoim celem molekularnym, w którym bewacizumab nie zmienia swojego rozmiaru po związaniu.

○ MB jako alternatywa FCS wykluczenia lub potwierdzenia zajścia reakcji

Metoda FCS nie umożliwiła wykrycia wiązania VEGF z bewacizumabem ze względu na brak widocznych zmian wielkości między kompleksem a samym lekiem. W związku z tym,

wykorzystano wcześniej opisaną metodę jasności molekularnej^{109,110,113} (Rozdział 3.2.) do ustalenia, czy zachodzi wiązanie między lekiem a jego celem. W tej metodzie wykorzystano fakt, że po związaniu VEGF następuje zmiana jasności fluorescencji emitowanej przez cząsteczki leku. Jasność samej cząsteczki bewacizumabu jest wyższa od jasności kompleksu lek-VEGF. Uzyskane wyniki zostały zamieszczone w Tabeli 3.3.3. Przy stosunku stechiometrycznym 1 : 30 (bewacizumab : VEGF) otrzymano 7% spadek intensywności fluorescencji leku. Warto zaznaczyć, że procentowe zmiany intensywności fluorescencji po związaniu istotnie zależą od zlokalizowania cząsteczek barwnika w cząsteczce leku. W trakcie przeprowadzonego barwienia badanego przeciwciała (Rozdział 2.) ilość cząsteczek barwnika przypadająca na ilość cząsteczek leku została ustalona poprzez stechiometrię reakcji, a nie specyficzność wiązania barwnika do określonych miejsc w cząsteczce leku. W związku z tym, niektóre cząsteczki barwnika mogą być obecne w miejscu wiązania z VEGF - w takim przypadku zmiana intensywności będzie wyraźniejsza. Niektóre natomiast mogą być zlokalizowane w innych miejscach przeciwciała, co przekłada się na mniejszy spadek fluorescencji. Niemniej jednak udowodniono, że fluorescencyjny bewacizumab wiąże się z VEGF w warunkach *in vitro*.

Pomiary FCS bezpośrednio wewnątrz żywych komórek jako ilościowa metoda charakterystyki internalizacji bewacizumabu

Pomiary FCS wewnątrz żywych komórek pozwalają na identyfikację pojedynczych cząsteczek fluorescencyjnych na podstawie ich czasów dyfuzji. Brak krzywej autokorelacji FCS świadczy o braku mobilnej frakcji analizowanej cząsteczki, która dyfundowałaby przez objętość konfokalną. Na poziomie pojedynczej komórki i pojedynczych cząsteczek, przeprowadzono pomiary FCS we wsparciu modułu FLIM, pozycjonując ognisko konfokalne w każdej analizowanej komórce w dwóch obszarach:

- gdzie sygnał od leku fluorescencyjnego nie został wykryty w jakościowym podejściu - obrazowaniu FLIM (w cytozolu)
- gdzie na zdjęciach FLIM były widoczne wybarwione pęcherzyki (wokół jądra w przypadku komórek raka szyjki macicy).

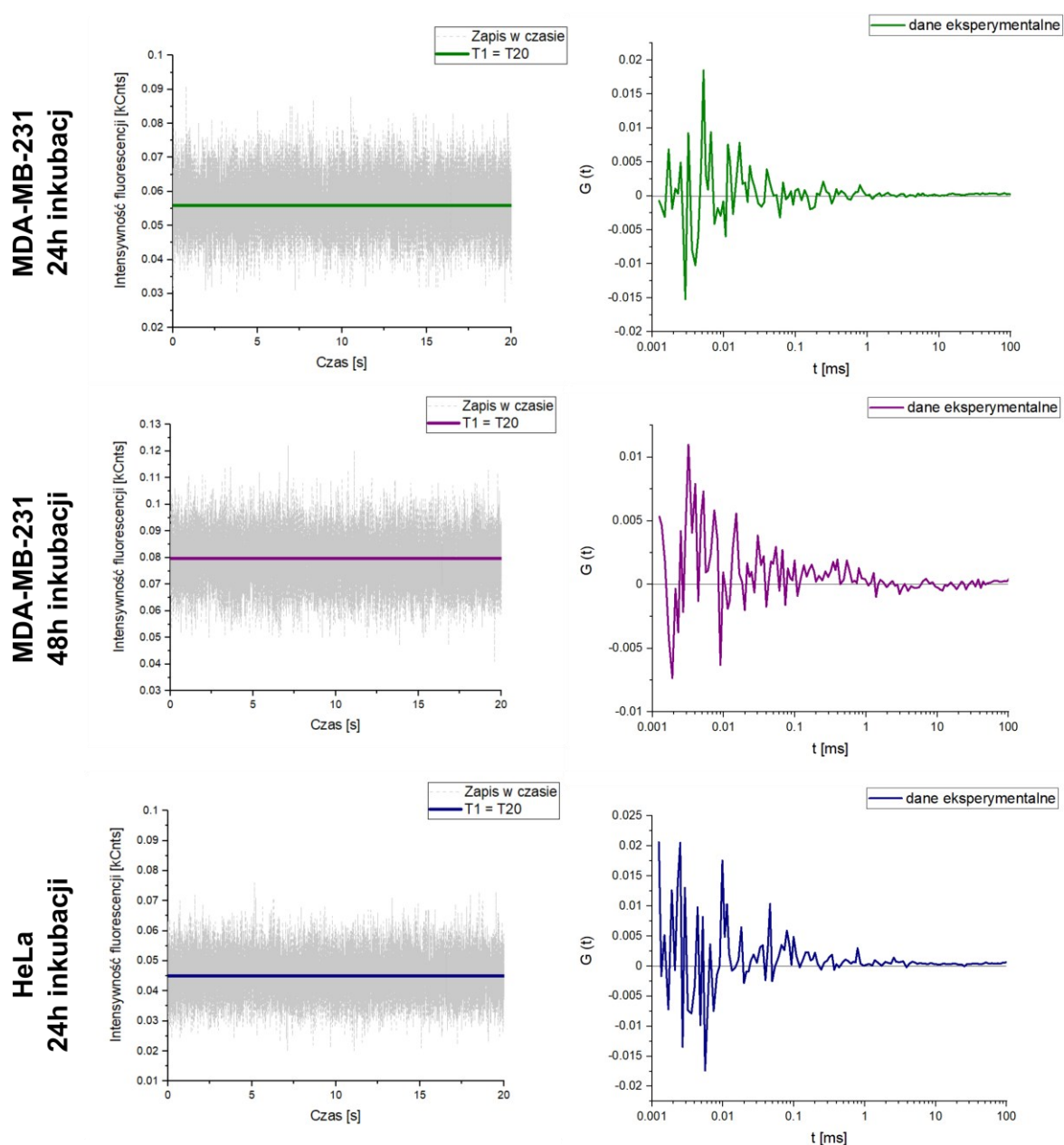
Z miejsc cytoplazmatycznych, w których na zdjęciach FLIM nie zaobserwowano sygnału pochodzącego od leku, nie otrzymano krzywych autokorelacji FCS. Uzyskany zapis symetrycznie oscylował wokół 0, potwierdzając tym samym, że wolny, znakowany, bewacizumab nie był obecny w cytoplazmie. Opisane obserwacje otrzymane w wyniku pomiarów FCS dotyczyły obu badanych linii komórkowych (Rysunek 3.3.8.). Z kolei pozycjonując ognisko konfokalne w miejscach występowania endosomów (Rysunek 3.3.9.), otrzymano krzywe autokorelacji FCS, identyfikując dyfuzję leku zamkniętego w pęcherzyku. Krzywe autokorelacji FCS z wnętrza komórek zostały opisane za pomocą modelu dyfuzji opisanego przez Ochab-Macielek i innych,¹³⁹ uzupełnionego o parametr reprezentujący transport pęcherzyków. Funkcję matematyczną dopasowanego modelu przedstawiono w Równaniu (3.3.).

$$G(t) = G_{inf} + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{2 \left[6D_M t + \frac{6}{5} a^2 (1 - e^{-5D_M t/a^2}) \right]}{\omega_{xy}^2} \right)^{-1} \times \left(1 + \frac{2 \left[6D_M t + \frac{6}{5} a^2 (1 - e^{-5D_M t/a^2}) \right]}{\kappa^2 \omega_{xy}^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \cdot e^{-\left(\frac{tv}{\omega_{xy}} \right)^2}$$

Równanie (3.3.)

gdzie N oznacza całkowitą liczbę cząsteczek w objętości konfokalnej, D_M odpowiada współczynnikowi dyfuzji pęcherzyka, a - promieniowi pęcherzyka, D_m jest współczynnikiem dyfuzji cząsteczki zamkniętej w pęcherzyku, ω_{xy} to promień objętości konfokalnej, zdefiniowanej podczas kalibracji, a v jest prędkością pęcherzyka. Parametr κ został określony podczas kalibracji.

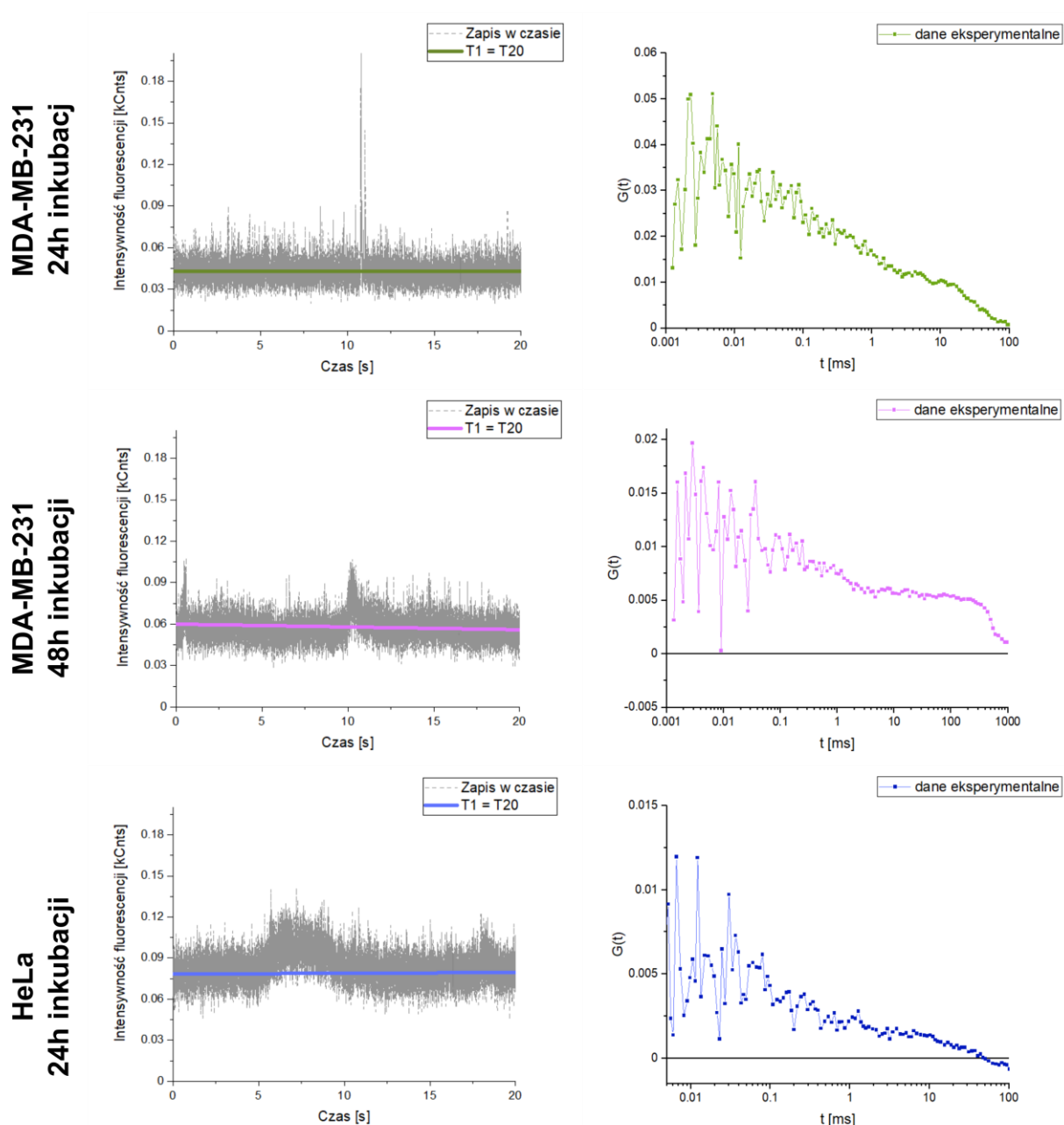
Miejsce detekcji: CYTOPLAZMA



Rysunek 3.3.8. Przykładowe zapisy intensywności fluorescencji w czasie i odpowiadające im krzywe autokorelacji FCS otrzymane przez pozycjonowanie ogniska konfokalnego w cytoplazmie. Wyniki przedstawione dla linii komórkowej HeLa po 24. godzinach inkubacji z badanym lekiem oraz dla komórek linii MDA-MB-231 po 24. i 48. godzinach inkubacji.

W ten sposób uzyskano informacje o współczynniku dyfuzji pęcherzyka, współczynniku dyfuzji leku zamkniętego w pęcherzyku, prędkości ruchu pęcherzyka (aktywny transport pęcherzyka wzdłuż mikrotubul) oraz promieni pęcherzyka. Wartości wszystkich wymienionych parametrów zamieszczono w Tabeli 3.3.4.

Miejsce detekcji: PĘCHERZYKI



Rysunek 3.3.9. Przykładowe zapisy intensywności fluorescencji w czasie i odpowiadające im krzywe autokorelacji FCS otrzymane przez pozycjonowanie ogniska konfokalnego w miejscach występowania pęcherzyków. Wyniki przedstawione dla linii komórkowej HeLa po 24. godzinach inkubacji z badanym lekiem oraz dla komórek linii MDA-MB-231 po 24. i 48. godzinach inkubacji.

Co istotne, na podstawie analizy zapisów intensywności fluorescencji bewacizumabu w czasie, wykluczono zjawisko wypalania (przykładowe zapisy w czasie przedstawiono na Rysunkach 3.3.8. i 3.3.9.). Wypalanie, zjawisko często występujące w trakcie pomiarów FCS, wpływa na kształt krzywej autokorelacji FCS – może się wówczas pojawić dodatkowy, charakterystyczny, czas zaniku lub brak zbieżności krzywej do zera. Porównując intensywność fluorescencji w pierwszej i w 20. sekundzie pomiaru, jednoznacznie wykluczono zjawisko wypalania dla pomiarów bewacizumabu w komórkach. Tym samym potwierdzono, że uzyskane krzywe

autokorelacji FCS odzwierciedlają ruch pęcherzyka i zamkniętego w nim fluoroforu. Średnia prędkość transportu pęcherzyków dla obu badanych linii komórkowych wyniosła 1,56 $\mu\text{m/s}$ (Tabela 3.3.4.). Uzyskana wartość odpowiada prędkości białek motorycznych z rodziny kinezyn (w tym kinezy-1),¹⁴⁰ transportujących endosomy wzdłuż mikrotubul.

Tabela 3.3.4. Wartości parametrów uzyskane z opisanego eksperymentalnych FCS przy użyciu Równania (3.3.). Pomiarów wykonano wewnątrz komórek HeLa i MDA-MB-231. D_M reprezentuje współczynnik dyfuzji pęcherzyka, a - promień pęcherzyka, D_m oznacza współczynnik dyfuzji cząsteczki zamkniętej wewnątrz pęcherzyka, v jest prędkością przemieszczania się pęcherzyka. Błędy odpowiadają odchyleniom standardowym ($N = 10$).

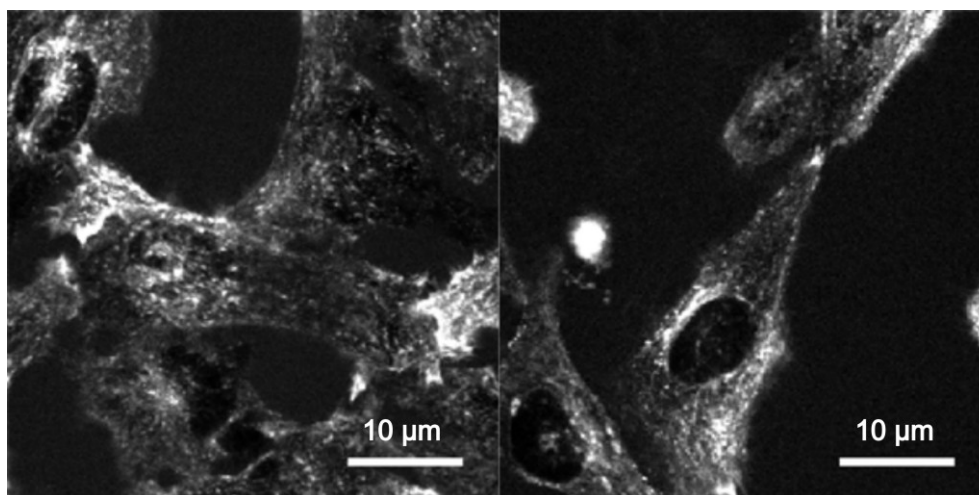
Parametr (Równanie (3.3.))	Komórki HeLa po 24h inkubacji z lekiem	Komórki MDA-MB-231 po 24h inkubacji z lekiem	Komórki MDA-MB-231 po 48h inkubacji z lekiem
$D_M [\mu\text{m}^2/\text{s}]$	$0,03 \pm 0,10$	$0,4 \pm 0,3$	$0,03 \pm 0,01$
$a [\mu\text{m}]$	$0,24 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,07$	$0,28 \pm 0,09$
$D_m [\mu\text{m}^2/\text{s}]$	8 ± 3	10 ± 9	6 ± 1
$v [\mu\text{m/s}]$	1 ± 2	3 ± 3	$0,8 \pm 0,8$

Tym samym obserwacje dokonane za pomocą obrazowania FLIM i konfokalnego (Rysunki 3.3.2, 3.3.3.) zostały potwierdzone poprzez ilościowe pomiary FCS. Wykluczono obecność wolnego, swobodnie dyfundującego bewacizumabu wewnątrz żywych komórek. Udowodniono również, że pojedyncze świecące punkty odpowiadają pęcherzykom - pęcherzykom endocytarnym lub lizosomom.

o Endocytoza konstytutywna jako mechanizm transportu bewacizumabu

Dotychczas opisane wyniki dowiodły, że dla obu linii komórkowych, fluorescencyjny bewacizumab nie jest obecny w formie wolnej w cytoplazmie komórek nowotworowych. Na podstawie obrazowania FLIM, współczynnika podziału i jego porównania do neutralnego dla komórek TRITC-dekstranu oraz pomiarów FCS *in vivo*, domniemanym mechanizmem transport wydaje się endocytoza konstytutywna. Tego typu proces odbywa się stale i niezależnie od obecności leku w medium otaczającym komórki. Gdyby bowiem lek był transportowany przez endocytozę (transport aktywny), ilość pęcherzyków wewnątrzkomórkowych zawierających badany bewacizumab byłaby wyraźnie i znacząco większa już po krótkim czasie inkubacji.

Na potwierdzenie tej tezy wykonano eksperyment kontrolny (przeprowadzony przez dr inż. Karinę Kwapiszewską), w trakcie którego inkubowano komórki HeLa z fluorescencyjną transferyną w stężeniach 50 nM i 200 nM przez około 1. godzinę. Uzyskane zdjęcia konfokalne przedstawiono na Rysunku 3.3.10. Transferyna to białko będące modelowym przykładem cząsteczki transportowanej przez endocytozę zależną od klatryny.¹⁴⁰ Jak widać na Rysunku 3.3.10, już po 1. godzinie inkubacji z transferyną wewnątrz komórek raka szyjki macicy widoczne były pęcherzyki - endosomy. Ich liczba (niezależnie od stężenia białka) była znacznie wyższa od liczby pęcherzyków widocznych w tych samych komórkach HeLa po 24. godzinach inkubacji z 500 nM fluorescencyjnym bewacizumabem (Rysunki 3.3.2, 3.3.3.).



Rysunek 3.3.10. Zdjęcia konfokalne komórek HeLa inkubowanych przez 1. godzinę z transferyną – modelową cząsteczką, dla której mechanizmem transportu jest endocytoza (transport aktywny) w stężeniu 200 nM (lewy obraz) i 50 nM (prawy obraz). Skala = 10 µm.

Liczba pęcherzyków widocznych na uzyskanych zdjęciach FLIM/konfokalnych (Rysunki 3.3.2., 3.3.3.) pozwala stwierdzić, że lek dostaje się do komórki przypadkowo, w wyniku endocytozy zachodzącej stale (konstytutywnej).¹⁴¹ Parametrem, który dodatkowo wyklucza aktywny transport bewacizumabu jest czas, po którym pęcherzyki zostały w komórkach zaobserwowane. W przypadku aktywnego transportu pęcherzyki powinny być zauważalne już po 1. godzinie inkubacji leku z komórkami (jak w przypadku transferyny, Rysunek 3.3.10.). Dla badanego bewacizumabu, endosomy nie były obecne wewnątrz obu badanych typów komórek aż do 24. godzin inkubacji.

- **Różnice w internalizacji bewacizumabu względem potrójnie ujemnego raka piersi i raka szyjki macicy**

Odnotowane różnice między badanymi typami nowotworów w ujęciu lokalizacji badanego leku (wybarwione, wydłużone struktury w komórkach HeLa – Rysunki 3.3.2., 3.3.3.) oraz reakcji na niego (komórki HeLa po 2. dniach inkubacji z lekiem przypominały morfologicznie komórki martwe) są prawdopodobnie związane z rozbudowanym systemem wewnątrz błonowym. Bewacizumab zamknięty w pęcherzyku endocytarnym może być trawiony w lizosomie, który powstaje, gdy pęcherzyk endocytarny łączy się z pęcherzykiem Golgiego zawierającym enzymy trawienne. Zabarwione struktury błonowe wokół jądra w przypadku komórek HeLa prawdopodobnie odpowiadają błonom retikulum endoplazmatycznego (ER). Wiadomo, że transport pęcherzykowy zachodzi między ER a aparatem Golgiego.¹⁴² Bewacizumab może przedostawać się do ER przez układ wewnątrz błonowy (transport wsteczny),¹⁴³ barwiąc w ten sposób jego błony. Jest również prawdopodobne, że błony ER są barwione przez sam barwnik uwalniany po degradacji przeciwciała w lizosomach. Takiej sytuacji nie odnotowano w komórkach MDA-MB-231, w których zawartość endosomów/lizosomów nie dostawała się do ER. Aby jednak bardziej szczegółowo wyjaśnić zjawisko wybarwionych struktur błonowych i ich braku w komórkach potrójnie ujemnego raka piersi, konieczne są dodatkowe badania.

Podsumowanie badań nad internalizacją bewacizumabu do wnętrza komórek nowotworowych

Mimo że bewacizumab nie powinien wnikać do komórek, w literaturze istnieją doniesienia opisujące jego internalizację. Dla przykładu, Deissler i inni¹³³ wykazali, że bewacizumab internalizuje komórki śródbłónka siatkówki, wskazując trzy frakcje wewnątrzkomórkowe tego leku: cytoplazmę, błony/organelle i cytoszkielet. Podobne wyniki zostały opublikowane przez Borchersa i innych.¹³⁴ Główną różnicą między tymi dwoma badaniami był czas inkubacji komórek z bewacizumabem. Inny raport literaturowy dotyczący internalizacji bewacizumabu dotyczył komórek glejaka. Autorzy tej publikacji wykazali, że komórki CD133+ *in vitro* internalizują badany lek na drodze makropinocytozy już po 5. minutach inkubacji.¹⁴⁴ Wszystkie wymienione prace opisują proces wnikania bewacizumabu do komórek. Z drugiej jednak strony, w literaturze można znaleźć artykuły opisujące modyfikacje przeciwciał, takich jak bewacizumab, mające na celu zapewnienie ich wprowadzenie do wnętrza komórek.¹⁴⁵ Takie zmodyfikowane przeciwciała, nazywane cytotransmabami, wnikają do komórek głównie na drodze endocytozy. Warto w tym miejscu ponownie podkreślić, że wnikanie bewacizumabu do komórek będzie zjawiskiem niepożądanym, obniżającym jego potencjał terapeutyczny w stopniu zależnym od stopnia wnikania. Fakt, że internalizacja tego przeciwciała nie powinna zachodzić wynika z miejsca występowania jego celu molekularnego, VEGF, ulegającego sekrecji na zewnątrz komórek.

W ramach niniejszej pracy, zbadano proces internalizacji bewacizumabu przy użyciu metody FCS, w połączeniu z obrazowaniem FLIM/konfokalnym, zastosowanej bezpośrednio we wnętrzu żywych komórek nowotworowych, bez zmienionego metabolizmu. Zastosowanie metody FCS dostarczyła informacji, jakie składniki są obecne wewnątrz komórek oraz jaki jest mechanizm transportu badanej cząsteczki wyznakowanej fluorescencyjnie. Dzięki zaimplementowaniu tej techniki do pomiarów ludzkich komórek wykazano, że:

- lek o nazwie bewacizumab nie jest uwalniany z pęcherzyków do cytoplazmy komórek potrójnie ujemnego raka piersi oraz raka szyjki macicy;
- endosomy obecne w komórkach nie pochodziły z aktywnego pobierania leku, ale najprawdopodobniej wynikały z konstytutywnej endocytozy zachodzącej w sposób ciągły;
- efektywność internalizacji bewacizumab utrzymuje się na takim samym poziomie jak efektywność pobierania przez komórki neutralnego dla nich związku (na przykładzie TRITC-dekstranu). Internalizacji bewacizumab nie jest zatem procesem zachodzącym w sposób aktywny.

Zatem przeprowadzone badania ponownie potwierdziły, że technika FCS to cenne narzędzie dostarczające rozstrzygających informacji w dziedzinie internalizacji leków w komórkach.

Porównując wyniki dla bewacizumabu z wynikami dla leku olaparib, opisanymi w Rozdziale 3.2., efektywność wnikania (wyrażona w formie współczynnika podziału) była około 100 000 razy mniejsza dla bewacizumabu w porównaniu do olaparibu - leku samodzielnie wnikającego do komórek przez błonę komórkową.¹¹³ Odnotowana różnica jest zjawiskiem oczekiwanym i wynikającym z mechanizmów transportu badanych leków. Olaparib, mała cząsteczka,

swobodnie przenika na drodze biernej dyfuzji, akumulując się wewnątrz komórek. Z kolei bewacizumab nie jest pobierany przez komórki na drodze dyfuzji lub aktywnej endocytozy. Obecność tego leku w komórkach jest konsekwencją konstytutywnej endocytozy, zachodzącej stale, niezależnie od obecności bewacizumabu w medium.

Badania mające na celu określenie, czy bewacizumab wnika do komórek nowotworowych oraz jeśli tak, co dzieje się z tym lekiem wewnątrz komórek, poszerzono o testy cytotoksyczności bewacizumabu i porównania wpływu fluorescencyjnie znakowanego leku z niewyznakowanym bewacizumabem na ludzkie komórki. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że fluorescencyjny bewacizumab w stężeniach 250 nM i 500 nM zabijał komórki HeLa, czego nie odnotowano w przypadku komórek potrójnie ujemnego raka piersi. Co ważne, niewyznakowany lek nie wykazywał działania cytotoksycznego wobec żadnej z badanych linii. Tym samym można twierdzić, że znakowanie leku zmienia jego właściwości farmakologiczne. Bewacizumab z przyłączoną cząsteczką barwnika wydaje się być obiecującym celem badań klinicznych w leczeniu raka szyjki macicy.

3.4. Wnikanie terapeutycznych dinukleotydów do komórek nowotworowych

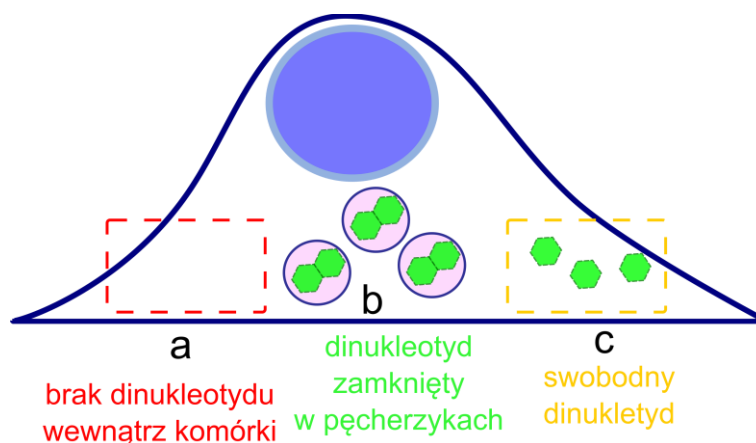
Badania opisane w tym rozdziale pracy zostały przeprowadzone w ramach współpracy z Centrum Nowych Technologii UW. Ich celem było określenie (za pomocą techniki FCS w połączeniu z obrazowaniem FLIM), czy wybrane, dostarczone przez UW, dinukleotydy wnikają do komórek potrójnie ujemnego raka piersi oraz jeśli tak, jakie są ich losy: czy w komórce obecne są wolne, niezwiązane cząsteczki lub czy badane związki oddziałują ze składnikami komórkowymi. Podjęto także próbę zaproponowania mechanizmu transportu badanych cząsteczek. Uzyskane wyniki to część szerszych, opublikowanych, eksperymentów.¹⁰⁶ Cząsteczki stanowiące przedmiot badań tego rozdziału to antagoniści eukariotycznego czynnika inicjacji translacji eIF4E w formie syntetycznych, dinukleotydowych 5',5'-trifosforanów analogów. Tego typu związki mogą obniżać poziom czynnika eIF4E w komórkach nowotworowych, hamując proces inicjacji translacji. Tym samym takie podejście stanowi formę obiecujących terapii przeciwnowotworowych. Dużym problemem pozostaje jednak samodzielnie wnikanie tych cząsteczek do komórek, co zweryfikowano w ramach eksperymentów opisanych poniżej.

W tabeli poniżej zestawiono informacje dotyczące przeprowadzonych w tym rozdziale pomiarów.

Tabela 3.4.1. Informacje techniczne dotyczące pomiarów wykonanych w Rozdziale 3.4.

Badane linie komórkowe	Roztwór/roztwory zastosowane do pomiarów FCS <i>in vitro</i>	Temperatura pomiarów	Zastosowany model matematyczny <i>in vitro</i>	Zastosowany model matematyczny <i>in vivo</i>
MDA-MB-231	H ₂ O, medium hodowlane otaczające badane komórki	36°C ± 0,5°C	Model dyfuzji normalnej jednoskładnikowej ($\alpha = 1, i = 1$ z Równania (2.1.))	Model dyfuzji normalnej dwuskładnikowej ($\alpha = 1, i = 2$ z Równania (2.1.))

Schemat komórki obrazujący rozważane losy badanych dinukleotydów we wnętrzu komórki przedstawiono poniżej.

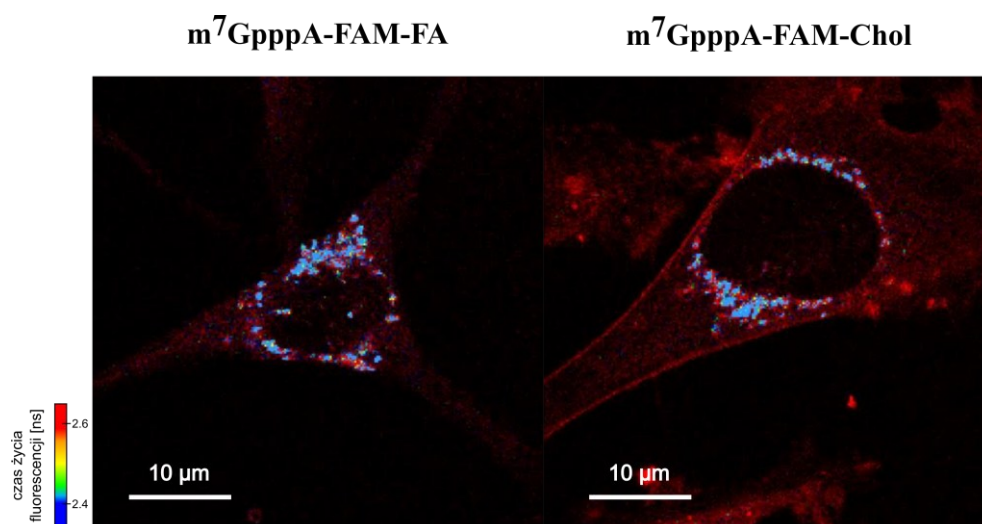


Rysunek 3.4.1. Możliwe losy wewnątrzkomórkowe terapeutycznych dinukleotydów. Oprócz przedstawionych wariantów, możliwe są także interakcje dinukleotydu ze składnikami komórkowymi, jak błony, organelle, kwasy nukleinowe.

Terapeutyczne dinukleotydy wnikają do komórek potrójnie ujemnego raka piersi

Tak jak w przypadku poprzednich eksperymentów pomiary rozpoczęto od oceny jakościowej, czy badane konjugatów z cholesterolem i kwasem foliowym wnikają do wnętrza komórek MDA-MB-231. W tym celu wykonano obrazowanie FLIM, umożliwiające rozróżnienie sygnału pochodzącego od badanej cząsteczki (czas życia fluorescencji > 2,6 ns) od autofluorescencji (czas życia fluorescencji < 2,4 ns) emitowanej przez komórki przy wzbudzeniu laserem o długości fali 488 nm.

Wykonane pomiary wykazały obecność obu badanych konjugatów w komórkach potrójnie ujemnego raka piersi (kolor czerwony pochodził od badanych konjugatów, Rysunek 3.4.2.). Należy podkreślić, że obie badane cząsteczki w większości były zlokalizowane w cytoplazmie komórek. Dodatkowo, dla konjugatu analogu cap z cholesterolem obrazowanie FLIM wykazało wiązanie do błony komórkowej.



Rysunek 3.4.2. Przykładowe obrazy FLIM komórek MDA-MB-231 inkubowanych z konjugatami dinukleotydowych analogów cap 5', 5' – trifosforanowych z kwasem foliowym i cholesterolem. Sygnał widoczny jako czerwony pochodzi od badanych sond (czas życia fluorescencji powyżej 2,6 ns). Natomiast sygnał przedstawiony na zdjęciach jako niebieski to sygnał autofluorescencji wzbudzonej laserem o długości fali 488 nm (czas życia fluorescencji poniżej 2,4 ns).

Ilościowe pomiary FCS w warunkach *in vitro* i *in vivo*

○ Wielkości terapeutycznych dinukleotydów

Eksperymenty FCS rozpoczęto od wyznaczenia wielkości dwóch badanych, otrzymanych w ramach współpracy z UW, konjugatów dinukleotydów cap z cholesterolem i kwasem foliowym. Uzyskane krzywe autokorelacji FCS opisano odpowiednim modelem matematycznym (Tabela 3.4.1). Następnie, dysponując wartościami współczynników dyfuzji (Równanie (1.1.)) obliczono promienie hydrodynamiczne obu badanych cząsteczek. W kolejnym kroku, na podstawie modelu nanolepkości cytoplazmy badanych komórek linii MDA-MB-231 (Rozdział 1.2., Równanie (1.5.), Tabela 3.1.1.) obliczono oczekiwane współczynniki dyfuzji we wnętrzu komórek MDA-MB-231. Otrzymane wyniki zestawiono w Tabeli 3.4.2.

Tabela 3.4.2. Wyniki uzyskane z pomiarów *in vitro* cząsteczek m7GpppA-FAM-FA oraz m7GpppA-FAM-Chol oraz wewnątrz żywych komórek MDA-MB-231 *in vivo*, w zestawieniu z przewidywanymi współczynnikami dyfuzji badanych związków w cytoplazmie komórek nowotworowych. Błędy zostały obliczone przy użyciu metody różniczki całkowitej. ($N = 10$).

Parametr	m7GpppA-FAM-FA	m7GpppA-FAM-Chol
Promień hydrodynamiczny, r_p [nm]	$1,4 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,5$
Współczynnik dyfuzji w wodzie, D_{aq} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	235 ± 15	159 ± 36
Przewidywany współczynnik dyfuzji w cytoplazmie MDA-MB-231, D_{cyto} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	78 ± 7	46 ± 5
Otrzymany współczynnik dyfuzji w cytoplazmie MDA-MB-231, D_1 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] dla szybszego składnika	87 ± 44	58 ± 12
Otrzymany współczynnik dyfuzji w cytoplazmie MDA-MB-231, D_2 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] dla wolniejszego składnika	$0,1 - 9,8$	$0,1 - 5$
Stężenie wewnątrzkomórkowe [nM]	222 ± 18	174 ± 5

○ **Pomiary FCS wewnątrz żywych komórek nowotworowych**

W kolejnym kroku, analogicznie do poprzednich rozdziałów, przystąpiono do pomiarów ilościowych FCS *in vivo*. W tym celu, komórki MDA-MB-231 inkubowano przez 1. godzinę z 1 μM roztworem $\text{m}^7\text{GpppA-FAM-FA}$ lub $\text{m}^7\text{GpppA-FAM-Chol}$ dodanym do medium hodowlanego. Dla każdego analogu dinukleotydu otrzymano krzywe autokorelacji FCS, co potwierdziło obecność badanych cząsteczek wewnątrzkomórkowo, zgodnie z wynikami uzyskanymi wcześniej z obrazowania FLIM.

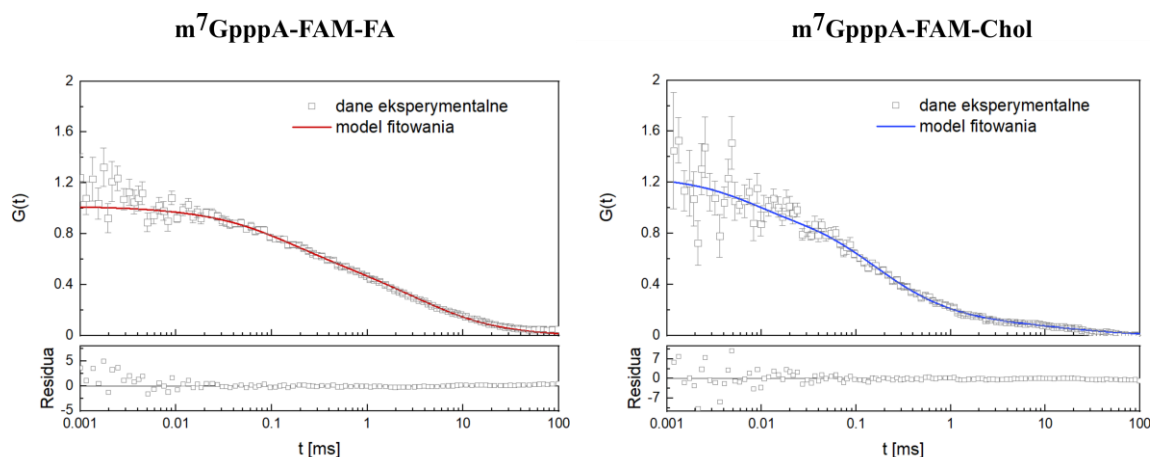
Na podstawie porównania otrzymanych współczynników dyfuzji w komórkach ze współczynnikami dyfuzji oczekiwanymi na podstawie modelu nanolepkości cytoplazmy komórek MDA-MB-231 (Tabela 3.4.2.) ustalono, że w przypadku obu cząsteczek w komórkach obecne są dwa składniki:

- szybszy odpowiadający wolnemu, swobodnie dyfundującemu w komórce konjugatowi;
- wolniejszy, który wykazywał dużą zmienność.

Dla $\text{m}^7\text{GpppA-FAM-FA}$ wolniejszy składnik przyjął wartości współczynnika dyfuzji od 0,1 do 9,8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Zakres ten obejmuje zarówno interakcje z dużymi białkami, małymi strukturami błonowymi ale także obecność pęcherzyków wewnątrzkomórkowych. Bowiem na podstawie pomiarów opisanych w Rozdziale 3.3. (Tabela 3.3.4.) wiadomo, że wartości współczynników dyfuzji równe lub mniejsze od 0,3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ są wartościami typowymi dla przemieszczania się pęcherzyków endosomalnych. Podobne wartości (0,1 – 5 $\mu\text{m}^2/\text{s}$) przyjął wolniejszy składnik obecny w komórkach nowotworowych po ich inkubacji z cząsteczką $\text{m}^7\text{GpppA-FAM-Chol}$. Wykorzystując możliwości techniki FCS, dla obu konjugatów wyznaczono także stężenie wewnątrzkomórkowe (Tabela 3.4.2., Równanie (3.1.)).

Rozważając możliwy mechanizm transportu terapeutycznych dinukleotydów do ludzkich komórek, w ujęciu wcześniejszy badań przeprowadzonych dla bewacizumabu (Rozdział 3.3.) należy rozważyć transport aktywny i dyfuzję pasywną. Oba związki były bowiem obecne w komórkach już po 1. godzinie inkubacji. Jednak ich stężenia (Tabela 3.4.2.) sugeruje mechanizm transportu analogiczny jak dla transferryny (szczegółowy opis w Rozdziale 3.3.), a więc transport aktywny. Gdyby bowiem była to dyfuzja pasywna, jak dla olaparibu, stężenie wewnątrzkomórkowe związków powinno (dla stężenia zewnątrzkomórkowego na poziomie 1 μM) około 100-krotnie wyższe.

Ilościowe wyniki otrzymane w żywych komórkach potrójnie ujemnego raka piersi inkubowanych z terapeutycznymi dinukleotydami zestawiono w Tabeli 3.4.2. Przykładowe krzywe autokorelacji FCS uzyskane w komórkach nowotworowych wraz z modelem dopasowania przedstawiono na Rysunku 3.4.3.



Rysunek 3.4.3. Przykładowe krzywe autokorelacji FCS uzyskane w cytoplazmie komórek MDA-MB-231, inkubowanych z konjugatami dinukleotydowych analogów cap 5', 5' – trifosforanowych z kwasem foliowym i cholesterolem. Dolny panel przedstawia residua – odchylenia danych eksperymentalnych od modelu dopasowania.

Podsumowanie wnikania terapeutycznych dinukleotydów do komórek nowotworowych

Opisane powyżej pomiary FCS *in vivo* w połączeniu z jakościowym obrazowaniem FLIM wykazały, że z zastosowaniem tej techniki badawczej możliwe jest ustalenie, czy terapeutyczne, dostarczone w ramach współpracy naukowej, konjugaty dinukleotydów, wnikają do ludzkich komórek oraz jeśli tak, jakie są ich losy wewnątrzkomórkowo.

Zarówno konjugat z cholesterolem jak i kwasem foliowym, samodzielnie wnikał do testowanych komórek potrójnie ujemnego raka piersi już po upływie 1. godziny inkubacji. W komórkach obecne były dwa składniki: szybszy, odpowiadający wolnemu konjugatowi oraz wolniejszy, wskazujący na interakcje cząsteczek badanych z komponentami komórkowymi lub obecność pęcherzyków endosomalnych. W przypadku konjugatu z cholesterolem wiązanie do błon komórkowych widoczne było także w trakcie obrazowania FLIM (Rysunek 3.4.2.).

Wyniki FCS (stężenia wewnątrzkomórkowe, obecność pęcherzyków wewnątrzkomórkowych) uzyskane bezpośrednio we wnętrzu żywych komórek nowotworowych sugerują transport aktywny jako mechanizm wnikania obu dinukleotydów. Warto zaznaczyć, że w przypadku kwasu foliowego literaturowo zakładanym mechanizmem wnikania jest właśnie transport aktywny z udziałem endosomów.¹⁴⁶ Inaczej sytuacja wygląda dla cholesterolu, dla którego zakładanym mechanizmem transportu jest pasywna dyfuzja.¹⁴⁷ Jednak zestawiając uzyskane wyniki z opisanymi we wczesnych rozdziałach badaniami dotyczącymi wnikania olaparibu oraz bewacizumabu nie można tego mechanizmu transportu potwierdzić.

Na koniec warto zaznaczyć, że przeprowadzone badania FCS, w zestawieniu z wynikami całościowymi opisanymi w artykule naukowym,¹⁰⁶ dostarczają szerszych informacji. Wytypowana do badań linia potrójnie ujemnego raka piersi MDA-MB-231 wykazuje nadekspresję receptora folianowego (FR) α kluczowego dla endosomalnego wychwytu kwasu foliowego.¹⁴⁸ Autorzy artykułu porównali ten rodzaj komórek z linią nowotworu płuc A549¹⁰⁶ wykazując tym samym, że wnikanie sondy m⁷GpppA-FAM-FA do ludzkich komórek zależy od ekspresji receptora FR.

Podsumowując, w wyniku badań przeprowadzonych przez Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego wykazały, że poprzez szereg modyfikacji syntetycznych, możliwe jest stworzenie cząsteczki, która hamuje inicjację translacji w komórkach, wykazuje względem nich toksyczność, a przyłączenie odpowiedniego ligandu zapewnia ich samodzielne wnikanie do ludzkich komórek.¹⁰⁶ Wśród wszystkich przebadanych cząsteczek to analog capu z cholesterolem okazał się związkiem o największym potencjale. Pomiary FCS *in vivo* stanowiły uzupełnienie badań, potwierdzające samodzielne wnikanie cząsteczek m⁷GpppA-FAM-FA oraz m⁷GpppA-FAM-Chol do komórek MDA-MB-231.

3.5. Wnikanie białek terapeutycznych i ich stopień oligomeryzacji: ferrytyna i hemoglobina

Dotychczas w niniejszej pracy opisano zastosowanie metody FCS do ilościowej analizy losów cząsteczek terapeutycznych wewnątrz żywych komórek nowotworowych. W tym rozdziale rozprawy zweryfikowano także użyteczność tej techniki do określenia, jaka forma oligomeryczna terapeutycznych białek dominuje w ludzkich komórkach po ich transferze z komórek żernych, makrofagów. Badania przeprowadzono w ramach współpracy z firmą Cellis Sp. z o.o. oraz Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.

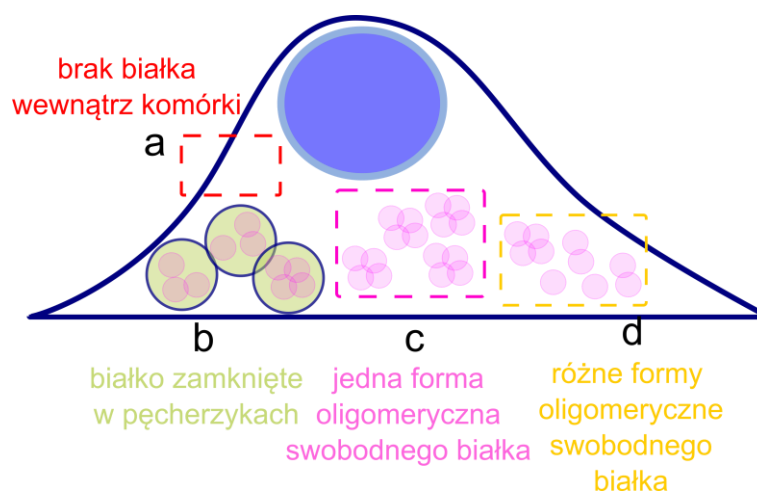
Analizie poddano dwie cząsteczki: ferrytynę, 24-mer, przypominający kształtem klatkę, powszechnie stosowany nośnik leków,¹⁴⁹ oraz hemoglobinę, ułatwiającą transport tlenu w czerwonych krwinkach. Eksperymenty FCS dotyczące hemoglobiny stanowiły część całościowych, opublikowanych,¹⁰⁷ wyników dotyczących charakterystyki transferu tego białka z makrofagów do komórek nowotworowych, w tym zastosowania tego rozwiązania jako terapii przeciwnowotworowej.

Szczegóły eksperymentalne dla pomiarów białek terapeutycznych opisanych w tym rozdziale zamieszczono w tabeli poniżej.

Tabela 3.5.1. Informacje techniczne dotyczące pomiarów wykonanych w Rozdziale 3.5.

Badana cząsteczka	Badane linie komórkowe	Roztwór/roztwory zastosowane do pomiarów FCS <i>in vitro</i>	Temperatura pomiarów <i>in vitro</i>	Zastosowany model matematyczny <i>in vitro</i>	Zastosowany model matematyczny <i>in vivo</i>
Ft-568	MDA-MB-231	PBS o odpowiednim pH	$25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	Model dyfuzji normalnej jednoskładnikowej ($\alpha = 1, i = 1$ z Równania (2.1.))	Model dyfuzji anomalnej jednoskładnikowej ($\alpha < 1, i = 1$ z Równania (2.1.))
Hb-568	MDA-MB-231	NaHCO ₃ , medium RPMI-1640 bez FBS (lepkość medium ustalona na podstawie współczynników dyfuzji rodaminy B w wodzie i medium RPMI-1640 bez FBS)	$25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	Model dyfuzji normalnej jedno- lub dwuskładnikowej ($\alpha = 1, i = 1$ lub 2 z Równania (2.1.))	Model dyfuzji normalnej dwuskładnikowej ($\alpha = 1, i = 2$ z Równania (2.1.))

Schemat komórki obrazujący rozważane losy badanych białek we wnętrzu komórki przedstawiono poniżej.



Rysunek 3.5.1. Możliwe losy wewnątrzkomórkowe ferrytyny lub hemoglobiny. Oprócz przedstawionych wariantów, możliwe są także interakcje białka ze składnikami komórkowymi, jak błony, organelle, kwasy nukleinowe.

Forma oligomeryczna ferrytyny dominująca w komórkach nowotworowych

o Obrazowanie FLIM makrofagów i pomiary FCS *in vitro*

Badania ustalające, co dzieje się z Ft-568 wewnątrz komórek linii MDA-MB-231 standardowo rozpoczęto od weryfikacji, czy badane białko jest obecne wewnątrz makrofagów, przekazujących badaną cząsteczką komórkom nowotworowym znajdującym się w kokulturze. W tym celu za pomocą obrazowania konfokalnego zwizualizowano makrofagi. Wykonane pomiary potwierdziły obecność fluorescencyjnej ferrytyny w makrofagach, jednak odnotowano dużą ilość pęcherzyków w ich wnętrzach (Rysunek 3.5.2.A).

W kolejnym kroku wyznaczono rozmiar (promień hydrodynamiczny) dwóch form oligomerycznych ferrytyny: monomeru i 24-meru w roztworach PBS odpowiednim pH. Wiadomo bowiem, że modulując wartością jonów wodorowych, możemy decydować o formie oligomerycznej tego białka. Co istotne, przywracając pH do fizjologicznego, przywracamy jednocześnie kształt klatki ferrytyny. Wykonano pomiary FCS *in vitro*, a uzyskane wyniki podsumowano w Tabeli 3.5.2.

Tabela 3.5.2. Wyniki eksperymentalne pomiarów FCS *in vitro* dla Ft-568: współczynniki dyfuzji i promienie hydrodynamiczne 24-meru i monomeru. Błędy zostały obliczone przy użyciu metody różniczki całkowitej ($N = 10$).

Parametr	pH 7,4	pH 2,4
Przewidywany oligomer	24-mer	Monomer
Współczynnik dyfuzji, D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	$39,2 \pm 0,9$	249 ± 11
Promień hydrodynamiczny, r_p [nm]	$6,3 \pm 0,1$	$0,98 \pm 0,04$

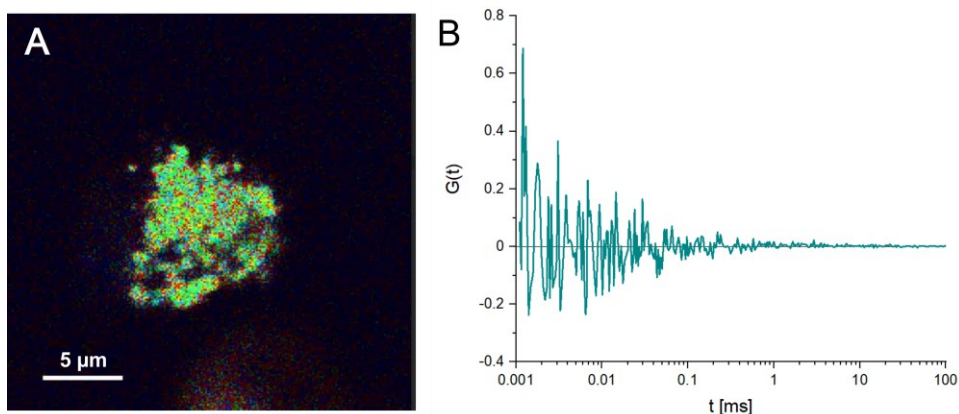
Na podstawie uzyskanych wartości promieni hydrodynamicznych 24-meru i monomeru Ft-568 oraz modelu nanolepkości cytoplazmy badanych komórek MDA-MB-231, obliczono wartości przewidywanych współczynników dyfuzji w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 dla dwóch rozpatrywanych form oligomerycznych białka. Wyniki przeprowadzonych obliczeń zestawiono w Tabeli 3.5.3.

Tabela 3.5.3. Wartości przewidywanych współczynników dyfuzji w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 dla poszczególnym form oligomerycznych Ft-568. Błędy zostały obliczone przy użyciu metody różniczki całkowitej ($N = 10$).

Parametr	24-mer	Monomer
Promień hydrodynamiczny, r_p [nm]	$6,3 \pm 0,1$	$0,98 \pm 0,04$
Współczynnik dyfuzji w wodzie, D_{aq} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	$51,3 \pm 0,8$	327 ± 13
Przewidywany współczynnik dyfuzji w cytoplazmie MDA-MB-231, D_{cyto} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	11 ± 2	123 ± 8

○ Uwalnianie ferrytyny z pęcherzyków do cytoplazmy

Po wyznaczeniu wielkości poszczególnych form oligomerycznych ferrytyny i przewidywanych współczynników dyfuzji we wnętrzu komórek nowotworowych, przystąpiono do pomiarów kultur komórek MDA-MB-231 z makrofagami THP-1 techniką FCS. Ft-568 była przekazywana komórkom nowotworowym przez makrofagi. Badania *in vivo* rozpoczęto od próby wykonania pomiarów FCS w we wnętrzu makrofagów. Nie uzyskano jednak krzywej autokorelacji FCS (sygnał oscylował wokół 0, Rysunek 3.5.2.B), co świadczyło o braku wolnej, znakowanej cząstki w makrofagach. Zatem na podstawie pomiarów FCS i przeprowadzonego obrazowania można wnioskować, że Ft-568 jest obecna w makrofagach, jednak nie nastąpiło jej uwolnienie z pęcherzyków. Warto jednak zaznaczyć, że brak wolnego, dyfundującego wewnątrz makrofagów białka jest zjawiskiem oczekiwanym z uwagi na mechanizm transferu Ft-568 z makrofagów do komórek ssaczy znajdujących się w tej samej hodowli za pośrednictwem endosomów.



Rysunek 3.5.2. Analiza makrofagów wypełnionych Ft-568. A) przykładowe zdjęcie konfokalne makrofagów wypełnionych znakowaną ferrytyną. Widoczna obecność dużej liczby pęcherzyków endosomalnych. B) Brak krzywej autokorelacji FCS we wnętrzu makrofagów, potwierdzający zamknięcie i brak uwolnienia ferrytyny z endosomów.

Przystąpiono następnie do badań FCS w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 (komórki wybierano na podstawie morfologii, rozróżniając w ten sposób komórki nowotworowe od makrofagów). Analizie poddano dwa warianty kokultury:

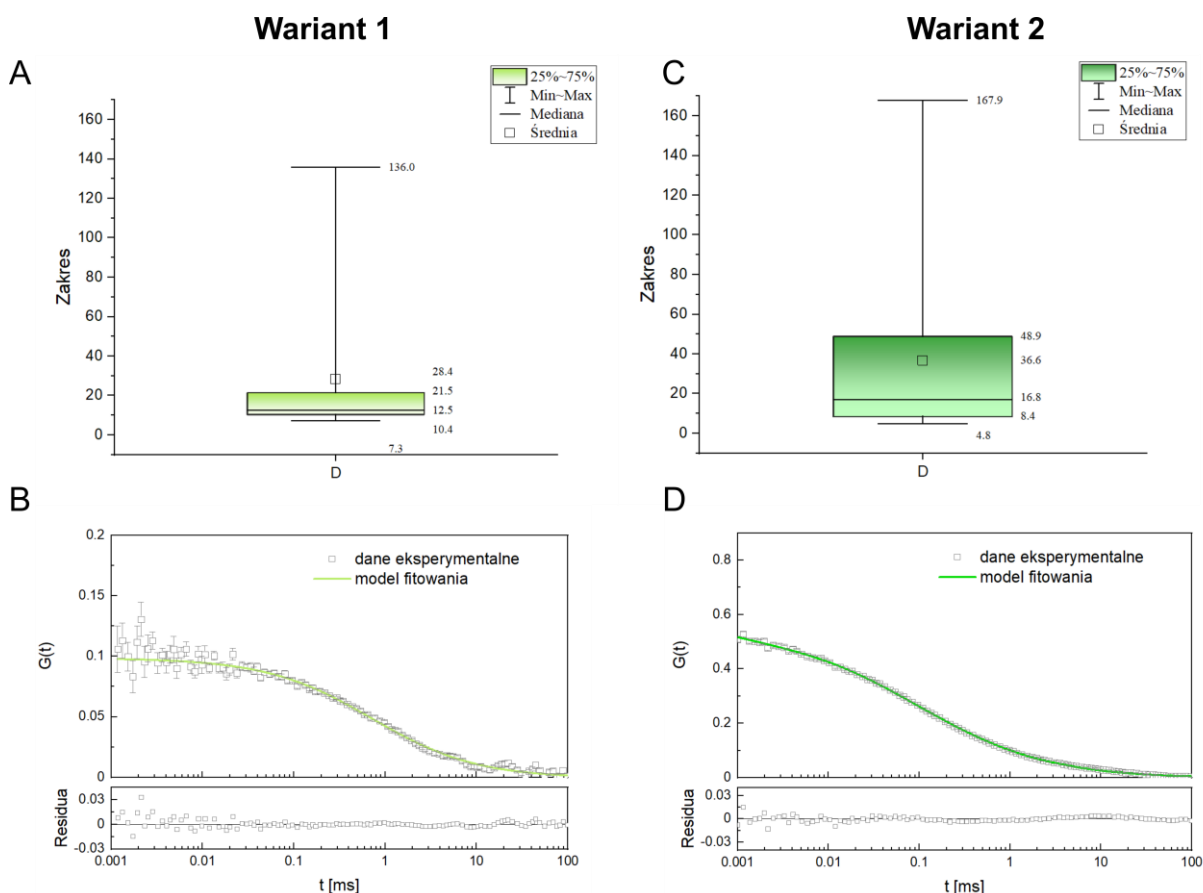
1. Makrofagi inkubowane z 10 $\mu\text{g/ml}$ Ft-568 (wariant o niskim stężeniu);
2. Makrofagi inkubowane z 10 $\mu\text{g/ml}$ Ft-568 i 1 mg/ml ferrytyny pozbawionej barwnika (wariant mieszany).

Analiza dwóch wariantów miała na celu potwierdzenie lub wykluczenie, że równowaga ustalająca się we wnętrzu komórek dla cząsteczek ferrytyny ma wpływ na formę oligomeryczną przeważającą w komórkach. Dla obu wariantów po 4. godzinach inkubacji komórek nowotworowych z makrofagami uzyskano krzywe autokorelacji FCS, potwierdzające obecność wolnego, dyfundującego białka we wnętrzu komórek nowotworowych. Model jednoskładnikowej dyfuzji anomalnej był jedynym dobrze odzwierciedlający dane eksperymentalne modelem matematycznym. Tym samym ustalono, że cząsteczki fluorescencyjne obecne w cytoplazmie potrójnie ujemnego raka piersi wykazują polidispersyjność, rozumianą jako obecność molekuł o różnych rozmiarach. Przykładową krzywą autokorelacji FCS wraz z modelem dopasowania dla obu badanych wariantów przedstawiono na Rysunkach 3.5.3.A i C.

Dla wariantu 2., dla którego stężenie badanego białka wyznakowanego fluorescencyjnie było identyczne z wariantem 1., ale całkowite stężenie ferrytyny znakowanej i niewyznakowanej było 100-krotnie wyższe, odnotowano obecność większej liczby pęcherzyków w komórkach. Średnie współczynniki dyfuzji uzyskane dla obu wariantów przedstawiono w formie wykresów pudełkowych na Rysunkach 3.5.3.B i D. Warto zaznaczyć, że przedstawione wartości są wartościami średnimi i wynikają z anomalnego modelu dyfuzji - w każdej komórce obecne są różnej wielkości cząsteczki. Uzyskane w obu wariantach eksperymentalnych średnie współczynniki dyfuzji były większe od wartości 11,2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, oczekiwanej dla 24-meru Ft-568. Oznacza to, że 24-mer ferrytyny uległ rozpadowi podczas transferu makrofag-akceptor lub podczas uwalniania do cytoplazmy. Rozkład ten jest częściowy, gdyż w komórkach raka piersi obecne były duże oligomery (z medianami współczynników dyfuzji 14,6 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ dla

wariantu 1. i $16,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ dla wariantu 2.). Warto jednak podkreślić, że w niektórych komórkach obecne były także monomery (oczekiwany współczynnik dyfuzji $123 \mu\text{m}^2/\text{s}$).

Co istotne, dla wariantu 1. uzyskano szerszy rozkład wielkości oligomerów w odniesieniu do wariantu 2. Wyniki te pozwalają wnioskować, że rozkład 24-merów ferrytyny jest niezależny od równowagi ustalającej się w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 i jest powodowany przez inne procesy zachodzące podczas transferu białka lub uwalniania z pęcherzyka, jak na przykład zakwaszenie endosomu.



Rysunek 3.5.3. Oligomeryzacja Ft-568 w kokulturze makrofagów THP-1 z komórkami linii MDA-MB-231. A, C) Dystrybucje współczynników dyfuzji uzyskanych w komórkach MDA-MB-231 dla wariantów 1. i 2. badanej kokultury. B, D) Przykładowe krzywe autokorelacji FCS uzyskane we wnętrzu komórek MDA-MB-231 dla wariantów 1. i 2. badanej kokultury, opisana modelem dyfuzji anormalnej, jednoskładnikowej (dolny panel przedstawia residua – odchylenia danych eksperymentalnych od modelu dopasowania). Wariant 1: Makrofagi inkubowane z $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ Ft-568 (wariant o niskim stężeniu); Wariant 2. Makrofagi inkubowane z $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ Ft-568 i $1 \text{ mg}/\text{ml}$ ferrytyny pozbawionej barwnika (wariant mieszany).

Forma oligomeryczna hemoglobiny dominująca w komórkach nowotworowych

Analogicznie do ferrytyny, prowadzone badania nad hemoglobina miały na celu ustalenie formy oligomerycznej Hb-568, obecnej we wnętrzu komórek potrójnie ujemnego raka piersi. Hb-568 była przekazywana komórkom nowotworowych przez makrofagi THP-1, obecne w badanej kokulturze.

○ **Obrazowanie FLIM makrofagów i pomiary FCS *in vitro***

Pomiary *in vivo* rozpoczęto od analizy makrofagów. Tak jak w przypadku ferrytyny, obrazowanie konfokalne potwierdziło obecność fluorescencyjnej hemoglobiny w ich wnętrzu oraz dużą ilość pęcherzyków endosomalnych (Rysunek 3.5.4.A).

W kolejnym kroku, poprzez pomiary FCS w warunkach *in vitro* w odpowiednim buforze, wyznaczono rozmiary trzech form oligomerycznych Hb-568: tetrameru, dimeru i monomeru. Aby eksperymentalnie uzyskać informacje na temat wielkości monomeru hemoglobiny, analizie poddano Hb-568, dla której barwnik, Alexa Fluor 568, był podłączony do grup aminowych białka. Dla tak wyznakowanej cząsteczki pomiary FCS *in vitro* przeprowadzono w 0.1 M roztworze NaHCO_3 o $\text{pH} = 8.0$. Warto zaznaczyć, że znakowana hemoglobina zastosowana do wyznaczenia promieni tetrameru i dimeru białka posiadała barwnik fluorescencyjny przyłączony do grup cysteinowych.

W próbie stanowiącej Hb-568 w medium hodowlanym zidentyfikowano swobodnie dyfundujący barwnik. Barwnik mógł odpowiadać czerwieni fenolowej – składnikowi zastosowanego medium hodowlanego (otrzymany promień hydrodynamiczny barwnika wyniósł 0,35 nm). Otrzymane wyniki pomiarów FCS *in vitro* podsumowano w Tabeli 3.5.4.

Tabela 3.5.4. Uzyskane wyniki pomiarów FCS *in vitro* dla Hb-568: współczynniki dyfuzji i promienie hydrodynamiczne wraz ze wskazaniem zastosowanego modelu dopasowania.

Parametr	Medium hodowlane (RPMI-1640 bez FBS)	NaHCO_3	NaHCO_3
Forma oligomeryczna	Tetramer	Dimer	Monomer
Model dopasowania	Dyfuzji dwuskładnikowa normalna	Dyfuzja jednoskładnikowa normalna	Dyfuzja jednoskładnikowa normalna
Współczynnik dyfuzji, $D [\mu\text{m}^2/\text{s}]$	17 ± 2	118 ± 4	136 ± 6
Promień hydrodynamiczny, $r_p [\text{nm}]$	$2,8 \pm 0,4$	$2,15 \pm 0,07$	$1,85 \pm 0,09$

Porównując otrzymane wyniki z danymi literaturowymi,¹⁵⁰ przyjęto, że promień hydrodynamiczny równy 2,77 nm odpowiada tetramerowi Hb-568, natomiast cząsteczka o promieniu równym 2,15 nm dimerowi.

Następnie analogicznie do poprzednich badań, na podstawie rozmiarów poszczególnych form oligomerycznych Hb-568 oraz modelu nanolepkości cytoplazmy komórek MDA-MB-231 wyznaczono przewidywane współczynniki dyfuzji wewnątrz żywych komórek nowotworowych. Wyniki zestawiono w Tabeli 3.5.5.

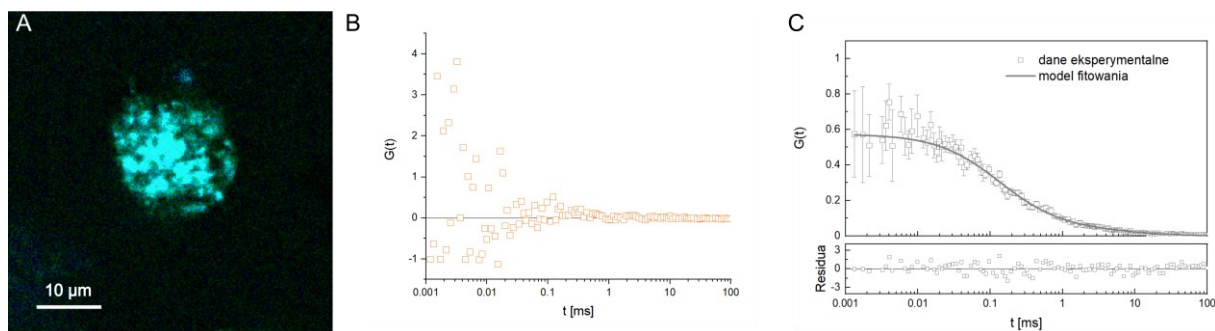
Tabela 3.5.5. Wartości przewidywanych współczynników dyfuzji w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 dla poszczególnym form oligomerycznych Hb-568. Błędy zostały obliczone przy użyciu metody różniczki całkowitej ($N = 10$).

Forma oligomeryczna	Tetramer hemoglobiny	Dimer hemoglobiny	Monomer hemoglobiny
Promień hydrodynamiczny, r_p [nm]	$2,8 \pm 0,4$	$2,15 \pm 0,07$	$1,85 \pm 0,09$
Współczynnik dyfuzji w wodzie, D_{aq} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	116 ± 17	149 ± 5	173 ± 8
Przewidywany współczynnik dyfuzji w cytoplazmie MDA-MB-231, D_{cyto} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	30 ± 4	42 ± 5	52 ± 5

○ Uwalnianie hemoglobiny z pęcherzyków do cytoplazmy

Tak jak w przypadku ferrytyny, pomiary FCS *in vivo* rozpoczęto od makrofagów. Jednak nie udało się uzyskać krzywej autokorelacji FCS w ich wnętrzu. Powodem było prawdopodobnie zamknięcie badanej cząsteczki w pęcherzykach endosomalnych, co potwierdziło obrazowanie konfokalne (Rysunek 3.5.4.A). Przystąpiono więc do pomiarów FCS we wnętrzu żywych komórek raka piersi, które dla hemoglobiny (analogicznie do ferrytyny) przeprowadzono po 4. godzinach od momentu utworzenia kokultury komórek nowotworowych z makrofagami zawierającymi badane białko. Na podstawie wcześniejszych pomiarów dotyczących ferrytyny, analizie FCS poddano wariant kokultury z makrofagami inkubowanymi z 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hb-568 oraz 990 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hemoglobiny niewyznakowanej.

Po upływie 4. godzin w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 nie zidentyfikowano mobilnej hemoglobiny. W konsekwencji, nie uzyskano krzywej autokorelacji FCS (Rysunek 3.5.4.B). Badania zatem rozszerzono, analizując komórki nowotworowe techniką FCS po 6. godzinach od utworzenia kokultury. Zweryfikowano tym samym, czy parametr czasu inkubacji ma wpływ na uzyskiwane wyniki. Co ciekawe, pomiary wykonane po 6. godzinach poskutkowały uzyskaniem krzywych autokorelacji FCS. Przypuszcza się zatem, że po dodatkowych dwóch godzinach inkubacji komórek MDA-MB-231 z makrofagami, badane białko zostało uwolnione z endosomów do cytoplazmy. Porównanie przykładowych krzywych autokorelacji FCS uzyskanych po 4. i 6. godzinach przedstawiono na Rysunkach 3.5.4.B i C. Warto podkreślić, że wewnątrzkomórkowe stężenie fluorescencyjnej hemoglobiny umożliwiło prawidłowe pomiary FCS i analizę danych.

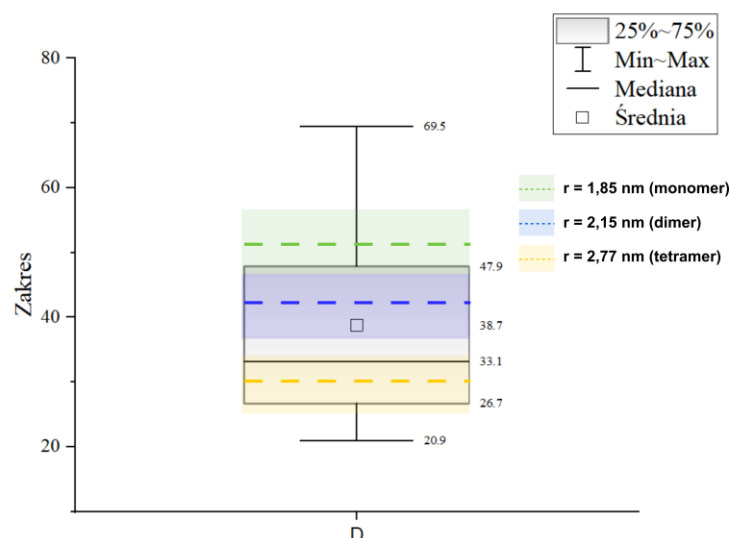


Rysunek 3.5.4. Pomiary FCS komórek MDA-MB-231 inkubowanych z makrofagami THP-1, zawierającymi Hb-568. A) Zdjęcie konfokalne makrofagów wypełnionych fluorescencyjnymi pęcherzykami. B) Brak krzywej autokorelacji FCS (sygnał oscyluje wokół 0) po 4. godzinach inkubacji komórek nowotworowych z makrofagami, potwierdzający brak uwolnienia H-568 z endosomów. C) Przykładowa krzywa autokorelacji FCS uzyskana we wnętrzu komórek raka piersi po 6. godzinach od utworzenia kokultury, opisana modelem dyfuzji dwuskładnikowej normalnej. Dolny panel przedstawia residua – odchylenia danych eksperymentalnych od modelu dopasowania.

Na podstawie krzywych autokorelacji FCS w komórkach MDA-MB-231 zidentyfikowano dwa składniki:

- szybszy składnik odpowiadający dimerowi i tetramerowi białka (oczekiwany współczynnik dyfuzji = $30,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$);
- wolniejszy składnik o dużej zmienności w zakresie współczynnika dyfuzji od $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ do $0,0001 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Należy jednak podkreślić, że rozrzut wyników był duży. W komórkach nowotworowych obecne były zarówno monomery, dimery, jak i tetramery. Interpretując wartości współczynników dyfuzji drugiego składnika, są one charakterystyczne dla struktur błonowych i aktywnego transportu endosomów. Jednak co najistotniejsze, zastosowana metoda pomiarów FCS bezpośrednio we wnętrzu żywych komórek potwierdziła transfer hemoglobiny z makrofagów do komórek MDA-MB-231 poprzez pęcherzyki endosomalne. Średnie współczynniki dyfuzji szybszego składnika obecnego wewnątrz komórek nowotworowych przedstawiono w formie wykresu pudełkowego na Rysunku 3.5.5.



Rysunek 3.5.5. Oligomeryzacja Hb-568 w kokulturze makrofagów THP-1 z komórkami MDA-MB-231: Dystrybucja współczynników dyfuzji uzyskanych w komórkach potrójnie ujemnego raka piersi, wraz z zaznaczeniem oczekiwanych współczynników dyfuzji dla monomeru, dimeru i tetrameru hemoglobiny.

Podsumowanie oligomeryzacji ferrytyny i hemoglobiny po transferze z makrofagów do komórek nowotworowych

W przypadku obu badanych, wyznakowanych fluorescencyjnie, białek terapeutycznych, ferrytyny i hemoglobiny, analizie za pomocą spektroskopii FCS poddano kokultury komórek MDA-MB-231 i makrofagów pochodzących z różnicowania linii THP-1.¹⁰⁷ Aby wyeliminować potencjalny wpływ równowagi ustalającej się wewnątrz komórek między białkiem fluorescencyjnym i niewyznakowanym, na formę oligomeryczną obecną w komórkach, pomiary FCS przeprowadzono dla wariantu, w którym całkowite stężenie badanego białka wyniosło 1 mg/ml. Jest to stężenie, które zastosowano przy inkubacji komórek żernych z badaną cząsteczką, celem jej wprowadzenia do makrofagów.

W wyniku opisanych wyżej badań FCS względem Ft-568, wykazano, że w ludzkich komórkach raka piersi obecne są duże oligomery z medianą współczynnika dyfuzji równą $16,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Wykonując obliczenia bazujące na modelu nanolepkości cytoplazmy komórek MDA-MB-231 ustalono, że przewidywany współczynnik dyfuzji dla 24-meru ferrytyny to $11,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$, a dla monomeru – $123 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Pomiary *in vivo* wykazały, że od 25% do 75% cząsteczek obecnych we wnętrzu komórek to duże oligomery, jednak rozrzut wyników był duży (Rysunek 3.5.3.C). Można zatem stwierdzić, że w komórkach MDA-MB-231 nie dominuje jedna forma oligomeryczna białka ferrytyny, a zakres różnej wielkości oligomerów. Co istotne, w wyniku utworzonej kokultury z makrofagami zawierającymi badane białko nastąpił jego transfer do komórek nowotworowych, co zostało potwierdzone przez obecność sygnału w badaniach FCS. Dodatkowo dzięki przeprowadzonych badaniom ustalono, że w komórkach żernych nie nastąpiła całkowita degradacja ferrytyny, a jedynie częściowa, wywołana prawdopodobnie kwaśnym pH obecnym wewnątrz pęcherzyków endosomalnych,¹⁵¹ za pośrednictwem których następował transport badanego białka.

Zbliżone wyniki uzyskano dla hemoglobiny. Przeprowadzone badania FCS, w przeciwieństwie do doniesień literaturowych, wykazały, że obecna w komórkach żernych THP-1 hemoglobina nie jest całkowicie zdegradowana. Co więcej, wykazano, że następuje transfer badanego białka z makrofagów do obecnych w kokulturze komórek nowotworowych. Uzyskana w wyniku analizy FCS mediana współczynników dyfuzji Hb-568 w cytoplazmie komórek potrójnie ujemnego raka piersi odpowiada formie tetramerycznej badanej hemoglobiny (otrzymana mediana: $33,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$; przewidywany współczynnik dyfuzji wewnątrz komórek = $30,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Jednak, podobnie jak dla ferrytyny, w komórkach nowotworowych obecne były zarówno monomery, dimery, jak i tetramery z uwagi na duży rozrzut wyników. Warto także podkreślić, że czas inkubacji komórek z makrofagami był parametrem decydującym o obecności wolnej hemoglobiny w cytoplazmie MDA-MB-231. Dopiero po 6. godzinach od utworzenia kokultury zaszło uwolnienie Hb-568 z pęcherzyków endosomalnych w stopniu pozwalającym na przeprowadzenie pomiarów FCS, w przeciwieństwie do analizy prowadzonej po 4. godzinach.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że technika FCS z powodzeniem może być stosowana do oceny, która forma oligomeryczna białek dominuje w komórkach nowotworowych. Zarówno ferrytyna jak i hemoglobina, w wyniku obecności w komórkach żernych a następnie ich transferu do komórek nowotworowych nie uległy całkowitej degradacji. Co więcej, w obu przypadkach w cytoplazmie potrójnie ujemnego raka piersi dominowały duże formy oligomeryczne, a częściowy, zaobserwowany rozpad cząsteczek wynikał prawdopodobnie z obniżonej, w stosunku do fizjologicznej, wartości pH wewnątrz pęcherzyków endosomalnych. Dla hemoglobiny, potwierdzeniem obecności pęcherzyków – nośników badanych białek – w komórkach nowotworowych był drugi składnik otrzymany z analizy danych eksperymentalnych FCS.

3.6. Inne przykłady zastosowania techniki FCS do badania losów cząsteczek lub/i ich wnikania do ludzkich, żywych, komórek: barwnik YO-PRO-1 i białko PRMT1

Przeprowadzone dotychczas i opisane powyżej badania dotyczyły związków o potencjale terapeutycznym: zatwierdzonych leków, dinukleotydów hamujących inicjację translacji oraz białek o potencjale terapeutycznym. Jako przykład zastosowania techniki FCS we wnętrzu żywych, pojedynczych komórek nowotworowych do badania losów różnych, nie tylko terapeutycznych, cząsteczek, w tym rozdziale pracy przeanalizowano proces wnikania i ewentualnych interakcji wewnątrzkomórkowych barwnika o nazwie YO-PRO-1. Zgodnie z literaturą, ta dodatnio naładowana cząsteczka ulega związaniu z DNA poprzez interkalację – aromatyczna część barwnika zostaje zlokalizowana między dwoma sąsiadującymi parami zasad DNA. Taki sposób wiązania stabilizuje barwnik w strukturze DNA, czego konsekwencją jest emisja fluorescencji.^{152,153} Uwzględniając powyższe informacje, w ujęciu wnikania, oczekiwanym zjawiskiem będzie akumulacja tej cząsteczki w jądrze komórkowym – miejscu występowania chromatyny. Wiadomo także, że w 2014 roku Sho Fujisawa i inni opisali YO-PRO-1 jako bardzo czuły marker wczesnej apoptozy.¹⁵⁴ Celem badań było zatem

zweryfikowanie, czy YO-PRO-1 wnika do żywych komórek nowotworowych, a jeśli tak, co się z nim dzieje w komórce. Przeprowadzone eksperymenty i uzyskane wyniki stanowią część opublikowanego w *Nanoscale Horizons* artykułu naukowego.¹⁵⁵

W tym rozdziale pracy opisano także przykład aplikacji metody FCS do oceny dystrybucji związku między kompartmentami komórkowymi: cytoplazmą a jądrem komórkowym. Badania przeprowadzono na białku PRMT1, które analizowano po wprowadzeniu do komórek różnych wariantów plazmidów DNA kodujących to białko o określonej formie oligomerycznej. W wyniku transfekcji plazmidem, transkrypcji, a następnie translacji PRMT1 było obecne w komórkach. Opisane w tym rozdziale badania zostały przeprowadzone w ramach współpracy z University of Utah w Stanach Zjednoczonych, skąd otrzymano plazmidy do analiz.

Białko PRMT1 to enzym z rodziny metylotransferaz argininowych, katalizujący metylację reszt argininy w białkach. Jedną z funkcji tego białka jest regulacja transkrypcji genów, przetwarzanie RNA, wpływ na apoptozę komórek czy szlaki sygnałowe.¹⁵⁶ Co ważne, białko to odgrywa ważną rolę kliniczną – wiadomo bowiem, że w wielu typach nowotworów PRMT1 ulega ekspresji w nadmiarze.^{157–159} Z tego względu inhibitory tego białka są szeroko badane jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Opisane poniżej eksperymenty są kluczowe w ujęciu doniesień literaturowych, które dowodzą, że forma oligomeryczna PRMT1 odgrywa kluczową rolę w rozwoju i progresji nowotworów, a uporządkowana oligomeryzacja PRMT1 może potencjalnie promować procesy onkogenne.^{160,161} Niniejsze badania to część szerszej pracy, zawartej w artykule naukowym, będącym w trakcie przygotowywania.

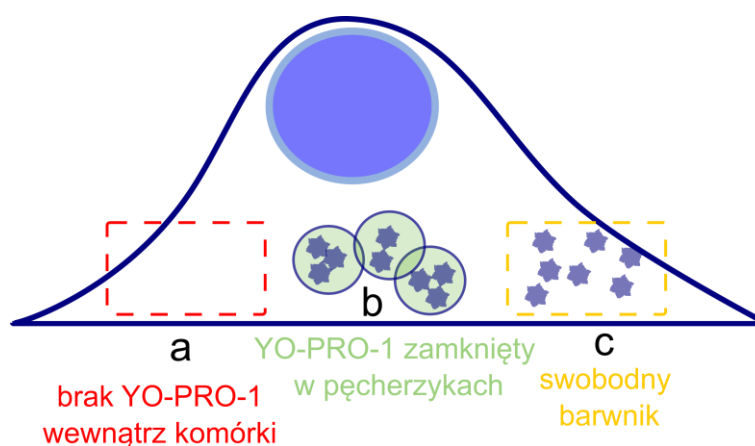
Informacje dotyczące warunków pomiarowych i stosowanych modeli matematycznych do pomiarów i analiz wykonanych w tym rozdziale zamieszczono w Tabeli 3.6.1.

Tabela 3.6.1. Informacje techniczne dotyczące pomiarów wykonanych w Rozdziale 3.6.

Badane cząsteczki	Badane linie komórkowe	Zastosowany model matematyczny <i>in vivo</i>	Informacje dodatkowe
Barwnik YO-PRO-1	MDA-MB-231, HeLa	Opisany wcześniej ¹⁵⁵	<p>Wpływ doksorubicyny i rapamycyny</p> <p>Stężenia leków: 100 nM doksorubicyny, 1 μM rapamycyny;</p> <p>Czas inkubacji: 6 godzin.</p> <p>Stężenie YO-PRO-1: 40 nM;</p> <p>Czas inkubacji z YO-PRO-1 po usunięciu leku: 30 minut.</p>
PRMT1	HeLa	Model dyfuzji normalnej trzyskładnikowej ($\alpha = 1$, $i = 3$ z Równania (2.1.))	

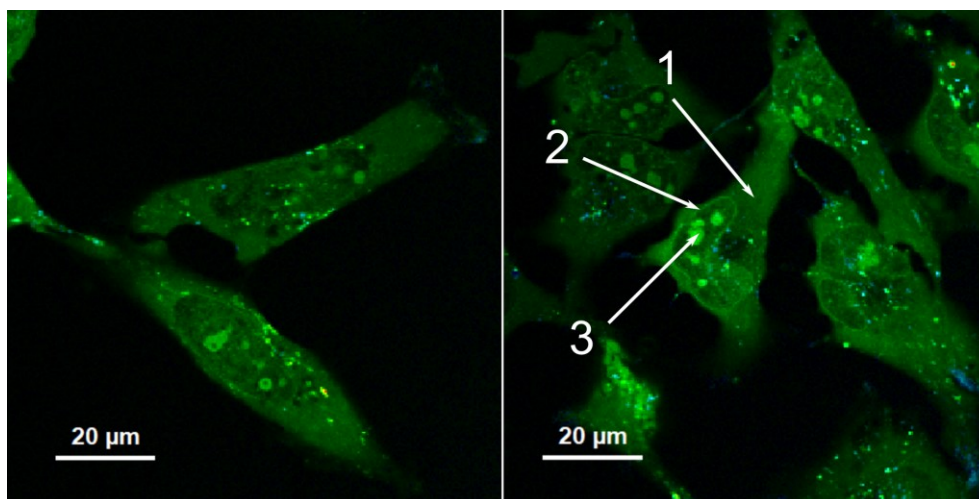
Barwnik YO-PRO-1 wnika do żywych komórek nowotworowych

Schemat komórki obrazujący rozważane losy YO-PRO-1 we wnętrzu komórki przedstawiono poniżej.



Rysunek 3.6.1. Możliwe losy wewnątrzkomórkowe barwnika YO-PRO-1. Oprócz przedstawionych wariantów, możliwe są także interakcje badanej cząsteczki ze składnikami komórkowymi, jak błony, organelle, kwasy nukleinowe.

Badania dotyczące barwnika YO-PRO-1 standardowo rozpoczęto od obrazowania konfokalnego, któremu poddano komórki raka szyjki macicy (HeLa). W tym celu, badaną cząsteczkę dodano do medium hodowlanego otaczającego testowane komórki. Uzyskane obrazy konfokalne (Rysunek 3.6.2.) wykazały, że badana cząsteczka jest pobierana przez żywe komórki. Co więcej, YO-PRO-1 uległ akumulacji w trzech głównych obszarach komórkowych: (1) cytoplazmie, (2) błonie jądrowej i (3) jąderkach (Rysunek 3.6.2.).



Rysunek 3.6.2. Przykładowe obrazy konfokalne komórek HeLa wybarwionych YO-PRO-1. Strzałkami zaznaczono obszary występowania barwnika wewnątrz komórek: 1) cytoplazma, 2) błona jądrowa, 3) jąderka.

Ta jakościowa obserwacja jest sprzeczna z doniesieniami o YO-PRO-1, powszechnie opisywanego jako barwnik kwasów nukleinowych, który interkaluje w struktury podwójnej helisy.^{154,162} Sugeruje to jego akumulację w jądrze komórkowym – miejscu występowania dwuniciowy DNA.

W kolejnym kroku, w oparciu o informacje uzyskane z obrazowania, mgr. inż. Karolina Kucharska wykonała pomiary *ex vivo* (w buforze, ale ze składnikami pochodzenia komórkowego) mające na celu określenie, z jakimi cząsteczkami reaguje badany barwnik. Analizie poddano różne cząsteczki biologiczne, w tym kwasy nukleinowe (tRNA, całkowita pula RNA, mRNA, spinki do włosów DNA i ssDNA), białka, lizat komórkowy oraz wyizolowane z komórek HeLa podjednostki rybosomalne 40S i 80S. W ten sposób ustalano, że YO-PRO-1 reaguje z molekułami RNA. Opisanie danych eksperymentalnych odpowiednim modelem matematycznym, pozwoliło w sposób precyzyjny określić cele wiązania YO-PRO-1: tRNA i rybosomy (rRNA) oraz określić ich promienie hydrodynamiczne (odpowiednio 21 ± 2 nm dla rybosomów i 2 nm dla tRNA).

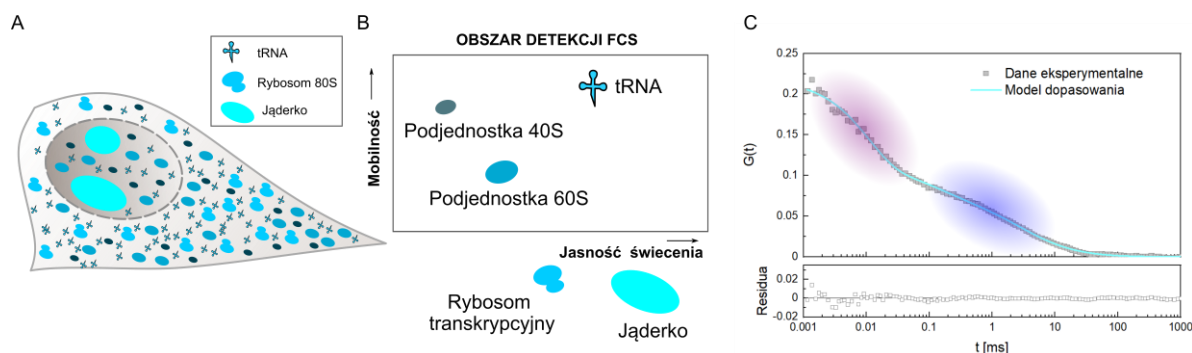
Ilościowe badania FCS wnikania YO-PRO-1 do komórek nowotworowych

○ YO-PRO-1 i komórki raka szyjki macicy

Obrazowanie konfokalne (Rysunek 3.6.2.) wykazało, że barwnik YO-PRO-1 wnika do ludzkich komórek, gromadząc się w trzech obszarach komórkowych: jąderkach, błonie jądrowej oraz cytoplazmie. Poprzez pomiary FCS *ex vivo*, przeprowadzone przez mgr inż. Kucharską i opisane szerzej w jej rozprawie doktorskiej, zidentyfikowano cele wiązania badanego barwnika.

W kolejnym kroku wykonano ilościowe pomiary FCS we wnętrzu żywych komórek raka szyjki macicy. W wyniku pomiarów, uzyskano krzywe autokorelacji FCS w cytoplazmie i jądrze komórkowym żywych komórek HeLa po inkubacji z barwnikiem YO-PRO-1. Kształt krzywych był bardzo zbliżony dla badanych lokalizacji wewnątrzkomórkowych: cytoplazmy i jądra komórkowego. W obu przypadkach wyraźnie zarysowały się dwie części kształtu

krzywych (Rysunek 3.6.3.C). Część krzywej autokorelacji w zakresie czasu od 0,1 do 10 ms jest częścią odpowiadającą dyfuzji wewnątrzkomórkowej translacyjnej,⁹¹ natomiast wyraźny sygnał FCS obecny w czasach krótszych niż 10 μ s sugerował rotacje wykrytych, mobilnych cząsteczek.^{155,163,164} Do danych eksperymentalnych został dopasowany dwuskładnikowy model dyfuzji normalnej z parametrem opisującym dyfuzję rotacyjną. Proces dopasowania danych eksperymentalnych do modelu matematycznego przeprowadziła dr inż. Karina Kwapiszewska. Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanej funkcji matematycznej zostały zamieszczone w materiałach dodatkowych opublikowanej publikacji, opisującej niniejsze wyniki.¹⁵⁵



Rysunek 3.6.3. Składniki wykryte w komórkach HeLa po inkubacji z barwnikiem YO-PRO-1. A) Schematyczne przedstawienie typów rRNA i tRNA obecnych w komórkach barwionych YO-PRO-1. B) Schematyczny wykres obrazujący jasność świecenia i ruchliwość poszczególnych, wybarwionych, cząsteczek, uzasadniający ich wpływ na krzywą autokorelacji FCS. Z uwagi na wiązanie między mRNA (o średnicy ~ 100 nm¹¹³) a rybosomem, transkrypcyjny rybosom jest niewidoczny w obszarze detekcji (skalach czasowych) FCS, podobnie jak jąderko (o średnicy od 500 nm¹⁶⁵). C) Przykładowa krzywa autokorelacji FCS z modelem dopasowania dyfuzji normalnej dwuskładnikowej z parametrem opisującym rotacje. Zastosowano funkcję matematyczną opisaną wcześniej.¹⁵⁵ Na wykresie zaznaczono obszary charakterystyczne dla rotacji (kolor różowy) i translacji (kolor fioletowy).

Dopasowanie odpowiedniego modelu do danych eksperymentalnych pozwoliło zidentyfikować dwa składniki obecne w komórkach barwionych YO-PRO-1. Pierwszy składnik odpowiadał tRNA, najliczniej występującej cząsteczce RNA w komórce (w tym w jądrze komórkowym¹⁶⁶),¹⁶⁷ posiadającej konserwatywne obszary dwuniciowe. Rozmiar tRNA wyniósł 2 nm (zadany na podstawie eksperymentów w buforze). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że rotacje tRNA były zbyt szybkie, aby można je było zaobserwować za pomocą zastosowanej metody badawczej. Drugi składnik, większy, przyjął promień hydrodynamiczny równy $14,6 \pm 1,7$ nm w cytoplazmie oraz $14,8 \pm 1,0$ nm w jądrze komórkowym. Składnik ten swobodnie dyfundował i rotował w obu badanych lokalizacjach. Przyjęto (na podstawie pomiarów *ex vivo*, mgr inż. Karolina Kucharska), że tym składnikiem była duża podjednostka rybosomalna (LSU), która jest największą, niezwiązaną strukturą zawierającą rRNA, obecną zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie.¹⁶⁸ Wykluczono, że składnik ten mógłby odpowiadać całym rybosomom 80S, gdyż nie są swobodnie dyfundującymi cząsteczkami – razem z cząsteczkami mRNA tworzą kompleksy translacyjne.¹⁶⁹ Tym samym wykazano, że rozmiary wyizolowanych podjednostek LSU w buforze i żywych, ludzkich, komórkach są zgodne (Tabela 3.6.2.). Schemat komórki wraz ze wskazaniem składników w niej obecnych po wnikięciu YO-PRO-1 zamieszczono na Rysunku 3.6.3.A.

Chcąc przedyskutować uzyskane wielkości podjednostek rybosomalnych, przeprowadzono analizę literaturową, na podstawie której ustalono, że promień LSU z gatunku *Artemia*

(zmierzony w buforze) wynosi $13,3 \pm 0,3$ nm.¹⁷⁰ Zgodnie z ewolucją rybosomów,¹⁷¹ można oczekiwać, że ludzkie LSU będą większe niż rybosomy bezkręgowców. Zatem, porównując dane literaturowe z promieniem z eksperymentu *ex vivo* ($15,0 \pm 2,7$ nm), uznano, że obiekty o promieniu 14,6 (14,8) nm odpowiadały swobodnym LSU. Co więcej, widoczna na zdjęciach konfokalnych błona jądrowa wybarwiona przez YO-PRO-1 jest prawdopodobnie wynikiem obecności rybosomów na zewnętrznej warstwie błony.¹⁷²

Tabela 3.6.2. Wartości promieni hydrodynamicznych LSU, otrzymane w buforze, komórkach HeLa oraz MDA-MB-231 (z rozróżnieniem na cytoplazmę i jądro komórkowe dla obu linii komórkowych) wraz z frakcją LSU wyrażoną w procentach. Błędy promienia hydrodynamicznego zostały obliczone przy użyciu metody różniczki całkowitej ($N = 10$, każda komórka była mierzona trzykrotnie). Z kolei błędy dla frakcji LSU to odchylenia standardowe.

Badana próbka		Promień hydrodynamiczny LSU [nm]	Frakcja LSU [%]
Bufor (mgr inż. Karolina Kucharska)		15 ± 3	
HeLa	Cytoplazma	15 ± 2	52 ± 5
	Jądro komórkowe	$14,8 \pm 0,9$	75 ± 11
MDA-MB-231	Cytoplazma	17 ± 2	52 ± 14
	Jądro komórkowe	$14,8^*$	64 ± 14

*wartości ustalone na podstawie nanolepkości jądra komórkowego HeLa

○ YO-PRO-1 i komórki potrójnie ujemnego raka piersi

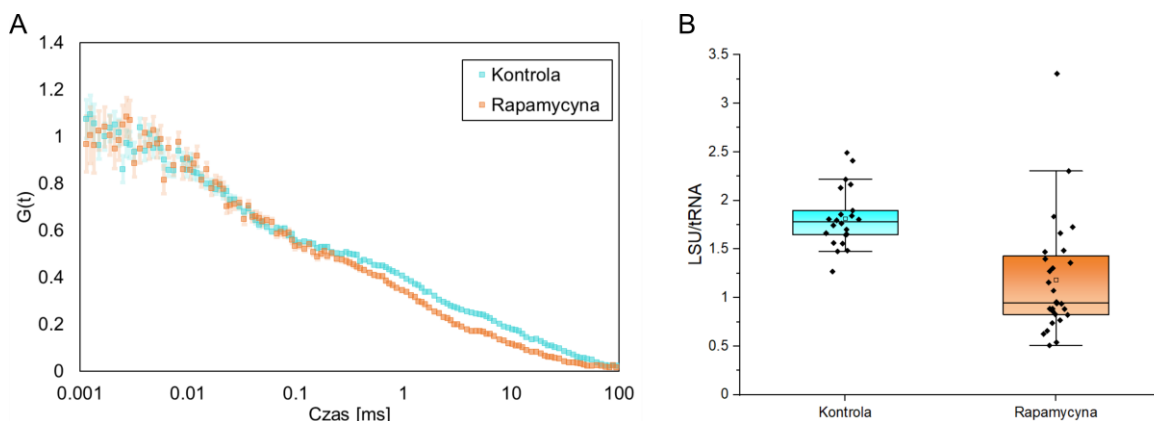
W kolejnym etapie, badania rozszerzono o komórki MDA-MB-231, we wnętrzu których również uzyskano krzywe autokorelacji FCS, o kształcie analogicznym do krzywych otrzymanych w komórkach HeLa. Warto podkreślić, że analiza danych pozwoliła ustalić zgodność wyników obu linii komórkowych (Tabela 3.6.2.). W przypadku cytoplazmy komórek potrójnie ujemnego raka piersi uzyskano nieco większe promienie hydrodynamiczne LSU ($17,1 \pm 1,9$ nm). Wyjaśnieniem może być stosunkowo duża niepewność krzywej nanolepkości cytoplazmy MDA-MB-231 dla próbników większych niż 10 nm (Rozdział 3.1.).¹¹³ Zatem uzyskana niewielka różnica w wielkości LSU mieści się w granicach błędu.

Należy zaznaczyć, że w wyniku wykonanych pomiarów FCS w komórkach obu typów nowotworów nie wykryto obecności innych cząsteczek opartych na kwasach nukleinowych. Warto jednak podkreślić, że chromatynę należy uznać za nieruchomą w skali czasowej eksperymentu FCS (sekundy). Potencjalne pozostałe rodzaje cząsteczek RNA zostały wcześniej wykluczone w trakcie pomiarów w buforze.¹⁵⁵ Brak sygnału emitowanego przez – małą podjednostkę rybosomalną 40S (SSU) jest najprawdopodobniej powiązany z wyższym niż 1:1 stosunkiem swobodnie dyfundującego LSU:SSU.¹⁵⁵ Z zastosowaniem techniki FCS wyznaczono także udział cząsteczek LSU w odniesieniu do tRNA a uzyskane wyniki zamieszczono w Tabeli 3.6.2.

Zwiększona frakcja tRNA w komórkach poddanych działaniu rapamycyny

W ramach badań poddano także analizie wpływ rapamycyny, hamującej biosyntezę rybosomów,¹⁷³ na ilość wybarwionych cząsteczek RNA obecnych w komórkach raka szyjki macicy. Pomiary FCS wykonano zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym. Stosunek frakcji w komórkach kontrolnych (wybarwionych YO-PRO-1, bez działania rapamycyny)

wyniósł 1:0,6 (LSU:tRNA). Z kolei w komórkach podanych działaniu rapamycyny odnotowano zwiększony udział tRNA, w obu lokalizacjach wewnątrzkomórkowych (Rysunek 3.6.4.B). Analogiczny eksperyment wykonano, wykorzystując doksorubicynę jako cząsteczkę hamującą syntezę rybosomów.¹⁷⁴ Jednak w tym przypadku nie zaobserwowano żadnych zmian względem komórek kontrolnych.¹⁵⁵



Rysunek 3.6.4. Wyniki uzyskane z komórek HeLa poddanych 6-godzinemu działaniu rapamycyny. A) Przykładowe krzywe autokorelacji FCS zestawione względem kontroli (komórek wybarwionych YO-PRO-1, bez działania rapamycyny). B) Wykresy pudełkowe dla stosunków frakcji LSU:tRNA względem komórek kontrolnych i komórek poddanych działaniu rapamycyny.

Uzyskana różnica między rapamycyną a doksorubicyną najprawdopodobniej wynika z mechanizmu ich działania na rybosomy. Rapamycyna jest inhibitorem szlaku celu rapamycyny (TOR, z ang. *Target of Rapamycin*). Szlaki te regulują produkcję rybosomów, dostosowując ich zawartość w oparciu o dostępność składników odżywczych i warunki środowiskowe.¹⁷⁵ Zatem w tym przypadku spodziewana jest szybka odpowiedź w liczbie rybosomów po poddaniu komórek działaniu rapamycyny. Z kolei doksorubicyna hamuje biosyntezę rybosomów poprzez inhibicję transkrypcji i degradację białek rybosomalnych. Zatem cząsteczka ta blokuje transkrypcję rybosomalnego RNA, hamując jednocześnie tworzenie rybosomu 80S. W pomiarach FCS obserwowano jedynie LSU, które nie są połączone w rybosomy transkrypcyjne 80S. Zatem zmniejszenie liczby rybosomów, które wystąpiło w komórkach poddanych działaniu doksorubicyny, było najprawdopodobniej kompensowane przez zwiększoną frakcją wolnych rybosomów 60S.¹⁵⁵

Podsumowanie badań wnikania barwnika YO-PRO-1

W wyniku przeprowadzonych badań FCS w połączeniu z obrazowaniem konfokalnym wykazano, że barwnik YO-PRO-1 uważany za nieprzepuszczalny dla żywych komórek:¹⁷⁶

- samodzielnie wnika do żywych raka szyjki macicy oraz potrójnie ujemnego raka piersi, wybarwiając cytoplazmę, jąderka i błonę jądrową,
- może być zastosowany do specyficznego barwienia rRNA i tRNA wewnątrz żywych ludzkich komórek.

Otrzymane współczynniki dyfuzji składników obecnych wewnątrz komórek pozwoliły stwierdzić, że widoczne w obrazowaniu konfokalnym kompleksy z YO-PRO-1 tworzą cząsteczki tRNA i LSU. Co więcej, kompleksy te były obecne zarówno w cytoplazmie, jak i

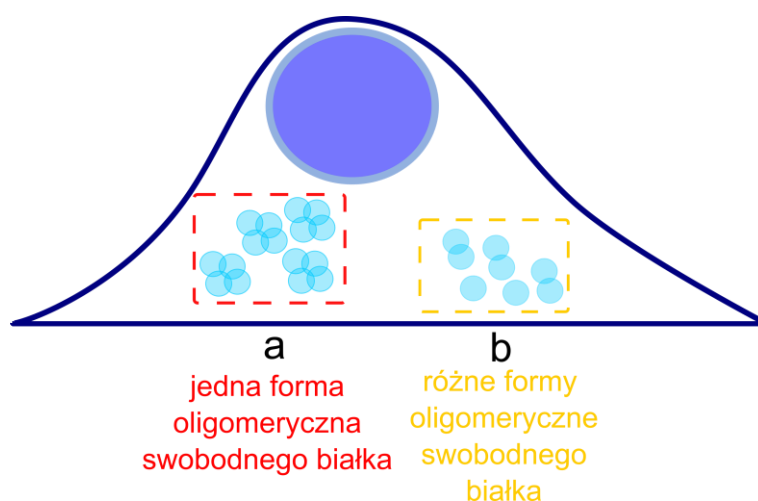
jądrze komórkowym. Warto podkreślić, że zastosowanie ilościowej techniki FCS pozwoliło na wyznaczenie promienia hydrodynamicznego LSU, zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórek nowotworowych. Tym samym po raz pierwszy wewnątrz żywych ludzkich komórek określono rozmiar LSU. Dodatkowo określono stosunek ilości tRNA do niezwiązanych LSU w komórkach obu badanych typów nowotworów.

Na koniec, ilościowe pomiary FCS wnikania YO-PRO-1 rozszerzono o zweryfikowanie wpływu rapamycyny oraz doksorubicyny na ilość składników obecnych w komórkach wybarwionych YO-PRO-1, dowodząc zwiększony udział tRNA pod wpływem rapamycyny.

Podsumowując, stosując technikę FCS we wnętrzu żywych komórek ustalono, co dzieje się z barwnikiem YO-PRO-1 wewnątrz dwóch typów nowotworów kobiecych, a uzyskane wyniki wyłaniają zastosowanie YO-PRO-1 jako selektywnego narzędzia do barwienia tRNA i rybosomów wewnątrzkomórkowo.

Obrazowanie konfokalne komórek zawierających białko PRMT1

Schemat komórki obrazujący rozważane losy badanego białka we wnętrzu komórki przedstawiono poniżej.



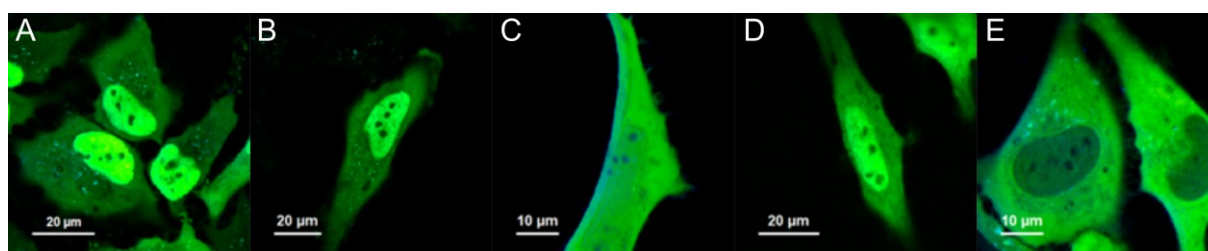
Rysunek 3.6.5. Możliwe losy wewnątrzkomórkowe PRMT1. Oprócz przedstawionych wariantów, możliwe są także interakcje białka ze składnikami komórkowymi, jak błony, organelle, kwasy nukleinowe.

Warianty badanych plazmidów kodujących białko PRMT1 oznaczono od A do E. Każdy analizowany plazmid zawierał sekwencję znacznika fluorescencyjnego EGFP. Oczekiwane formy oligomeryczne PRMT1 dla badanych wariantów plazmidów zestawiono w Tabeli 3.6.3.

Tabela 3.6.3. Przewidywana forma oligomeryczna białka PRMT1 dla każdego badanego plazmidu.

Oznaczenie plazmidu	Oczekiwana forma oligomeryczna
A	tetramer
B	dimer
C	monomer
D	monomer
E	tetramer

Standardowo, w pierwszym kroku przystąpiono do wizualizacji komórek HeLa. Warto w tym miejscu podkreślić, że wszystkie pomiary wewnątrz żywych komórek przeprowadzono 24. godziny po transfekcji – wprowadzeniu określonego plazmidu kodującego białko PRMT1 do komórek. Uzyskane, przykładowe obrazy konfokalne dla każdego badanego wariantu, kodującego różną formę oligomeryczną białka, zamieszczono na Rysunku 3.6.6.



Rysunek 3.6.6. Przykładowe obrazy konfokalne komórek HeLa zawierających białko PRMT1, wyznakowane EGFP. Oczekiwane formy oligomeryczne: A – tetramer, B – dimer, C – monomer, D – monomer, E – tetramer.

Jak widać na zdjęciach konfokalnych, obrazowanie w sposób jakościowy wykazało różną ilość badanego białka w cytoplazmie i jądrze komórkowym względem poszczególnych wariantów.

Przewidywana mobilność oligomerów PRMT1

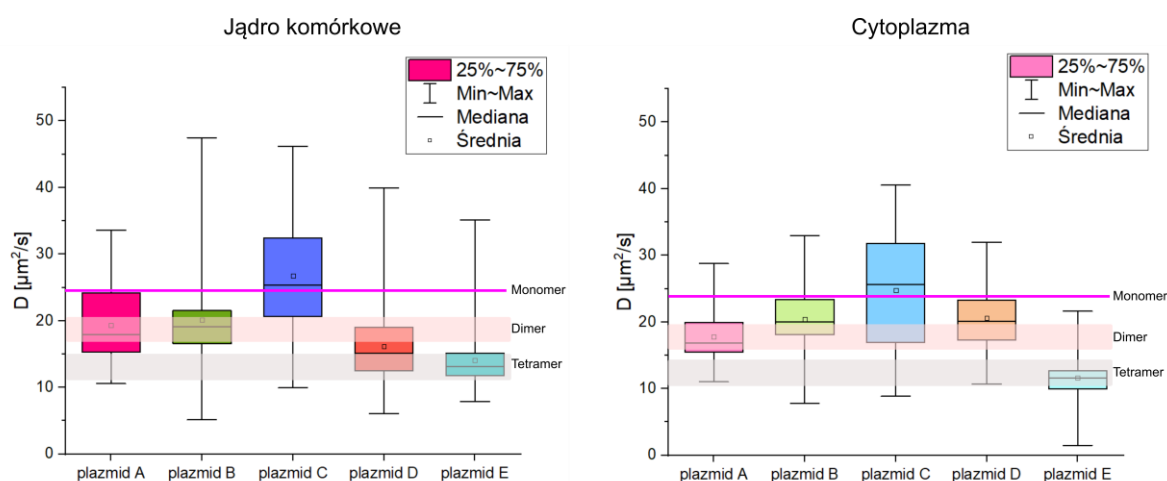
Analogicznie do badań opisanych w poprzednich rozdziałach niniejszej pracy, przed przystąpieniem do badań FCS we wnętrzu komórek nowotworowych, wyznaczono rozmiary wszystkich pięciu analizowanych wariantów (symulacja dynamiki Browna przeprowadzona przez dr Pawła Żuka¹¹³) oraz obliczono przewidywane na podstawie modelu nanolepkości zależnego od skali długości przewidywane współczynniki dyfuzji dla wszystkich oligomerów PRMT1. Z uwagi na analizę dystrybucji białka między kompartmentami komórkowymi, obliczenia wykonano dla cytoplazmy⁹¹ i jądra komórkowego.⁸² Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 3.6.4.

Tabela 3.6.4. Przewidywane współczynniki dyfuzji oligomerów PRMT1 dla cytoplazmy i jądra komórek HeLa w temperaturze 36 °C. Podane zakresy wartości wynikają z uwzględnionych w symulacjach możliwych różnych proporcji znacznika EGFP do białka PRMT1.

Oligomer	Promień hydrodynamiczny, r_p [nm] (na podstawie symulacji dynamiki Browna, dr inż. Paweł Żuk)	$D_{\text{cytoplazma}}$ [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	$D_{\text{jądro komórkowe}}$ [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
Monomer	3,58	24,0	24,6
Dimer	4,05 - 4,57	16,1 - 19,6	17,0 - 20,4
Tetramer	4,99 - 6,13	9,8 - 13,9	11,3 - 15,0

Ilościowe pomiary FCS białka PRMT1 we wnętrzu żywych komórek

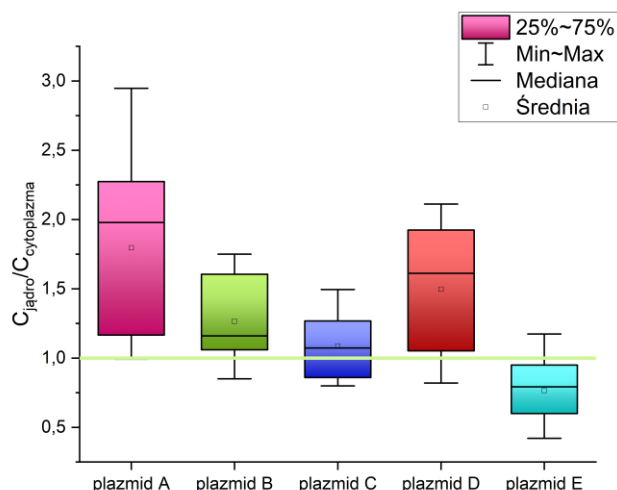
W kolejnym kroku, analogicznie do eksperymentów opisanych w poprzednich rozdziałach, przystąpiono do ilościowych pomiarów FCS wewnątrz żywych, pojedynczych komórek linii HeLa z rozróżnieniem na jądro komórkowe i cytoplazmę. Dla każdego wariantu plazmidu otrzymano krzywe autokorelacji FCS, które opisano modelem dyfuzji normalnej, dwuskładnikowej. Współczynniki dyfuzji pierwszego składnika odpowiadały wartościom poszczególnych oligomerów PRMT1. Natomiast drugi składnik o współczynniku dyfuzji mniejszym od $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ był charakterystyczny dla wiązania badanego białka ze składnikami wewnątrzkomórkowymi.^{91,106} Współczynniki dyfuzji szybszych składników porównano z przewidywanymi i przedstawiono na Rysunku 3.6.7. Uzyskane wartości zinterpretowano jako efektywne współczynniki dyfuzji mieszanin oligomerów.



Rysunek 3.6.7. Współczynniki dyfuzji mieszanin oligomerów PRMT1 w cytoplazmie i jądrze komórek HeLa. Dane eksperymentalne (wykresy pudełkowe) porównano z wartościami przewidywanymi, obliczonymi na podstawie modelu nanolepkkości zależnego od skali długości (Tabela 3.6.4.).

Dystrybucja PRMT1 między jądrem komórkowym a cytoplazmą

Po dopasowaniu modelu matematycznego do danych eksperymentalnych FCS – krzywych autokorelacji – przystąpiono do ilościowej oceny rozmieszczenia białka PRMT1 między jądrem komórkowym a cytoplazmą. Dla obu tych kompartmentów komórkowych wyznaczono stężenia wewnątrzkomórkowe, stosując Równania (3.1.) i (3.2.). Analizę przeprowadzono dla wszystkich wariantów, oznaczonych od A do E. Uzyskane wyniki zestawiono w formie graficznej na Rysunku 3.6.8. Ilościowe dane jednoznacznie potwierdziły wcześniejszą ocenę jakościową przeprowadzoną za pomocą obrazowania. Warianty A, B i D akumulują się w jądrze komórkowym, natomiast wariant E przeważa w cytoplazmie. Co ciekawe, wariant C swobodnie dyfunduje między cytoplazmą a jądrem - stężenia białka PRMT1 były bardzo zbliżone w obu badanych kompartmentach komórkowych.



Rysunek 3.6.8. Stosunki stężenia białka PRMT1 w jądrze komórkowym do jego stężenia w cytoplazmie, uzyskane w komórkach transfekowanych różnymi wariantami plazmidów (A-E). Jasnozielona linia odpowiada zrównaniu stężeń w cytoplazmie i jądrze komórkowym.

Podsumowanie ilościowych pomiarów białka PRMT1

Względem pięciu, otrzymanych w ramach współpracy naukowej z University of Utah, plazmidów kodujących różne formy oligomeryczne białka PRMT1 przeprowadzono jakościową (obrazowanie konfokalne) i ilościową analizę ich dystrybucji między kompartmentami komórkowymi linii HeLa: jądrem i cytoplazmą.

Krokiem poprzedzającym ilościową ocenę dystrybucji było dopasowanie odpowiedniego modelu matematycznego do otrzymanych krzywych autokorelacji FCS. Zastosowanie funkcji opisującej dyfuzję normalną dwuskładnikową (zarówno dla jądra komórkowego jak i cytoplazmy) umożliwiło identyfikację obecności składnika odpowiadającego mieszaninie oligomerów PRMT1 oraz składnika charakteryzującego wiązanie badanego białka z komponentami wewnątrzkomórkowymi. W ten sposób wykazano, że dla plazmidu A, dla którego oczekiwaną formą oligomeryczną był tetramer PRMT1, w obu badanych kompartmentach dominował dimer. Tetramer przeważał z kolei w wariancie E, co jest zgodne z oczekiwaniami. Założenia były zbliżone do danych eksperymentalnych także dla plazmidu C. Z kolei dla plazmidu D (oczekiwany monomer), w cytoplazmie dominował dimer i monomer, natomiast w jądrze komórkowym tetramer i dimer.

Na podstawie krzywych autokorelacji FCS opisanych modelem matematycznym dla każdego badanego wariantu wyznaczono stężenia wewnątrzkomórkowe PRMT1 w jądrze i cytoplazmie komórek raka szyjki macicy. Pomiary ilościowe potwierdziły wyniki uzyskane w sposób jakościowy za pomocą obrazowania konfokalnego. Warianty A, B, D, a więc plazmidy kodujące PRMT1 w formie oligomerycznej z istotnym udziałem dimeru (jak wykazały pomiary FCS) ulegały akumulacji w jądrze komórkowym. Z kolei wariant E, dla którego dominującym oligomerem był tetramer, przeważał w cytoplazmie, a wariant C (monomer) był równomiernie rozmieszczony między cytoplazmą a jądrem komórkowym. Wydaje się zatem, że forma oligomeryczna białka PRMT1 koreluje z jego preferowaną lokalizacją wewnątrzkomórkową.

Przeprowadzone pomiary ilościowe FCS potwierdziły użyteczność i stosowalność tej techniki do badania oligomeryzacji białek, ale także do oceny ich dystrybucji między kompartmentami komórkowymi (przy zastosowaniu odpowiedniego modelu nanolepkkości). W ujęciu funkcji komórkowej badanego enzymu, jej powiązania z lokalizacją wewnątrzkomórkową oraz wpływu formy oligomerycznej PRMT1 na rozwój i proliferację nowotworów, uzyskane wyniki wydają się być wstępem do dalszych eksperymentów nad zastosowaniem tego białka w opracowywaniu potencjalnych terapii przeciwnowotworowych.

3.7. Reżim splątania łańcuchów polimeru jako kluczowy parametr powodzenia dostarczania wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem szoku osmotycznego

Dotychczas w niniejszej rozprawie opisano wnikanie cząsteczek, które z założenia powinny przenikać do komórek samodzielnie. Jednak zdecydowana większość badań biologicznych, biochemicznych czy biomedycznych wymaga wprowadzenia do komórki związku, który nie jest przez nią pobierany. W tym rozdziale pracy zbadano zatem proces dostarczania wewnątrzkomórkowego cząsteczek za pomocą szoku osmotycznego, próbując ustalić, co jest parametrem decydującym o powodzeniu tego procesu. W tym celu zbadano szereg roztworów koloidalnych, zawierających różne polimery osmotycznie czynne w różnych stężeniach. Dla najbardziej i najmniej skutecznych roztworów hipertonicznych przeprowadzono analizę reologiczną. Skuteczność każdego testowanego wariantu hipertonicznego oceniano przy użyciu techniki FCS, uzupełnionej o obrazowanie konfokalne. Uzyskane wyniki zostały opatentowane (patent Nr 242705) w Polskim Urzędzie Patentowym, a także opisane w publikacji naukowej.¹⁰³

Nieskuteczne połączenie PEG 1 kDa z sacharozą – wariant 1.

Badanie rozpoczęto od sprawdzenia roztworu hipertonicznego, znanego jako dostępny przez pewien czas na rynku produkt InfluxTM, składający się z PEG 1 kDa [240 g/L] i sacharozy [1,17 M]. Skuteczność tego wariantu badano na dwóch typach próbników: konjugatach TRITC-dekstranu i nanocząstkach krzemionkowych pokrytych PEG. Ciśnienie osmotyczne wariantu wynosiło 4,4 MPa.¹⁷⁷

Analizę skuteczności tego połączenia hipertonicznego, jak i kolejnych, przeprowadzono z zastosowaniem dwóch podejść:

- 1) jakościowo, przeprowadzając obrazowanie konfokalne pozwalające na potwierdzenie lub wykluczenie obecności próbника wewnątrz komórek;
- 2) ilościowo poprzez pomiary FCS identyfikujące próbnik fluorescencyjny na podstawie czasu dyfuzji.

Na etapie obrazowania konfokalnego, od którego rozpoczęto eksperymenty, odnotowano brak obu typów próbników (polimerów i nanocząstek) w cytoplazmie komórek MDA-MB-231.¹⁷⁸ Przechodząc do pomiarów FCS, nie otrzymano krzywej autokorelacji. Tym samym

potwierdzono, że dostarczanie próbników do komórek potrójnie ujemnego raka piersi za pomocą testowanego wariantu 1. było nieskuteczne. Analizę rozszerzono o linię HeLa (komórki raka szyjki macicy). W tym przypadku procedura szoku osmotycznego okazała się skuteczna wobec małych próbników wprowadzanych do komórek (TRITC-dekstranów), ale zakończyła się niepowodzeniem w przypadku większych (nanocząstek).¹⁷⁸ Na podstawie otrzymanych wyników, wytypowano linię MDA-MB-231 do dalszych pomiarów jako modelową i bardziej wymagającą w kwestii dostarczania komórkowego szoku osmotycznym.

Uzyskane wyniki stoją w opozycji do doniesień literaturowych,¹⁰² jednak odnotowana niespójność jest powiązana z typem badanych komórek. Wiadomo, że skład błony komórkowej jest ściśle związany z charakterystyką komórek.¹⁷⁹ Tak więc struktura błony komórek MDA-MB-231 może wpływać na jej przepuszczalność, a tym samym dostarczanie cząsteczek za pośrednictwem szoku osmotycznego.

Zamiana PEG 1 kDa na dekstran 70 kDa – wariant 2.

W trakcie przeprowadzanych badań, próbnikami wprowadzanymi do komórek były, wraz z plazmidami i białkami, TRITC-dekstrany oraz nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG. Zgodnie z literaturą,¹⁸⁰ wodne roztwory PEG i dekstranu tworzą dwie oddzielne fazy o różnych gęstościach. Chcąc sprawdzić, czy to zjawisko może mieć wpływ na efektywność wprowadzania do ludzkich komórek konkretnych próbników, zastąpiono PEG dekstranem 70 kDa, w połączeniu z sacharozą. Badano wariant składający się z dekstranu 70 kDa w stężeniu 116 g/L i sacharozy w stężeniu 1,36 M.

Z zastosowaniem tego połączenia hipertonicznego, analizowano skuteczność na tych samych rodzajach próbników, co dla wariantu testowano jako pierwszy, a więc na TRITC-dekstranach i nanocząstkach krzemionkowych. W pierwszym etapie, obrazowanie konfokalne wykazało obecność wszystkich badanych związków w cytoplazmie komórek MDA-MB-231. Co więcej, pomiary FCS potwierdziły wysoką skuteczność tego wariantu. Dane eksperymentalne (krzywe autokorelacji) zostały opisane modelem dyfuzji anomalnej jednoskładnikowej ($\alpha < 1$, $i = 1$ z Równania (2.1.)) z uwagi na omówioną wcześniej polidispersyjność badanych próbników.⁸⁸ Następnie, stosując Równanie (1.2.), celem obliczenia współczynników dyfuzji, i bazując na krzywej nanolepkości cytoplazmy zależnej od skali,^{81,82,91} porównano wartości współczynników uzyskane z pomiarów w komórkach względem współczynników oczekiwanych dla każdego badanego próbника. Zgodność obu współczynników potwierdziła, że wykrywany sygnał fluorescencji pochodzi od badanych związków.¹⁷⁸

Połączenie osmotycznie czynnego dekstranu 70 kDa z sacharozą było skuteczne w wewnątrzkomórkowym dostarczaniu nie tylko dekstranów, ale także nanocząstek krzemionkowych pokrytych PEG. Zatem teza o tworzeniu się dwóch faz PEG-dekstran nie wyjaśnia różnicy między skutecznościami wariantów 1. i 2. Jako możliwe wyjaśnienie analizowano również potencjalne zmiany w stężeniach jonów, prowadzące do lokalnych zmian właściwości błony komórkowej. Opisane dotychczas badania literaturowe¹⁸¹ dowodzą, że PEG kompleksuje jony i zmienia siłę jonową buforu. Autorzy cytowanej pracy sprawdzili także, w jaki sposób obecność osmotycznego dekstranu 70 kDa w stężeniu 10% w/w i PEG 1 kDa w

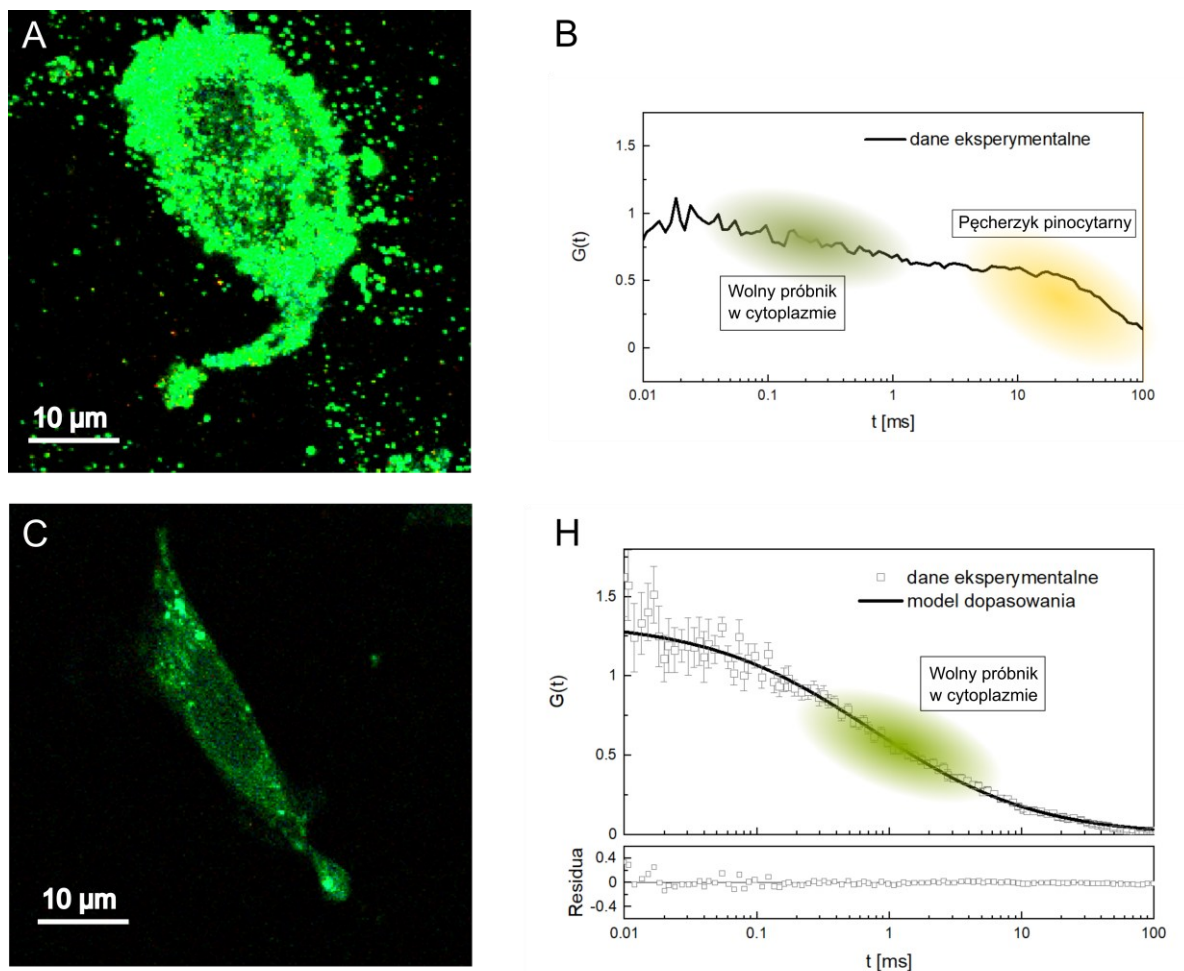
stężeniu 20% w/w wpływa na zależną od siły jonowej stałą równowagi tworzenia kompleksu DNA.¹⁸¹ Nie zaobserwowano znaczących zmian. Zatem bazując na doniesieniach literaturowych, w niniejszej rozprawie przyjęto, że kompleksowanie jonów nie odgrywa znaczącej roli w procesie dostarczania wewnątrzkomórkowego.

Sacharoza nie decyduje o powodzeniu dostarczania wewnątrzkomórkowego – wariant 3. i 4.

W ramach badań analizie poddano dwa kolejne warianty, celem ustalenia wpływu obecności sacharozy w medium budującym ciśnienie osmotyczne na powodzenia procesu dostarczania cząsteczek do ludzkich komórek. Pomiary wykonano dla:

- 1) medium hipertonicznego zawierającego samą sacharozę w stężeniu 1,17 mol/L (wariant 3.);
- 2) medium hipertonicznego składającego się z samego dekstranu osmotycznego 70 kDa w stężeniu 116 g/L (wariant 4.)

Przykładowe zdjęcia konfokalne i krzywe autokorelacji FCS uzyskane dla wariantu 3. i 4. przedstawiono na Rysunku 3.7.1. Stężenia sacharozy (wariant 3.) i dekstranu 70 kDa (wariant 4.) zostały wybrane na podstawie testowanego wcześniej wariantu 1. Eksperymenty przeprowadzono dla TRITC-dekstranów 20 kDa i 155 kDa. W przypadku obu wariantów, próbники były obecne w cytoplazmie komórek MDA-MB-231. Jednak dla wariantu 3. zawierającego samą sacharozę odnotowano dużą frakcję pęcherzykach pinocytarnych, których obecność przekładała się bezpośrednio na kształty uzyskanych krzywych autokorelacji FCS. Prawidłowa krzywa powinna zbiegać się do 0 dla czasów powyżej 10 ms. Brak tej właściwości dla otrzymanych danych eksperymentalnych potwierdziła obecność dużej liczby pęcherzyków. Uniemożliwiło to tym samym zastosowanie modelu dopasowania dyfuzji anomalnej jednoskładnikowej. Zatem sama sacharoza stosowana bez polimeru osmotycznie czynnego nasiliła proces wnikania próbników na drodze pinocytozy, jednak nie implikowała zwiększonego uwalniania związków z pęcherzyków do cytoplazmy komórek, a tym samym większego stężenia wewnątrzkomórkowego wolnego próbника. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi.^{182,183} Wiadomo bowiem, że sacharoza działa jako czynnik wzmagający wakuolizację. Zatem w wyniku badań wariantów 3. i 4. potwierdzono, że obecność polimeru jest niezbędna dla powodzenia procesu dostarczania, rozumianego jako uwolnienie próbника z pęcherzyków do cytoplazmy.



Rysunek 3.7.1. Efektywność wariantów 3. i 4. (A, B) Obrazowanie konfokalne komórek MDA-MB-231 i krzywa autokorelacji FCS po użyciu samej sacharozy (wariant 3.). Sacharoza indukuje proces tworzenia pęcherzyków wewnątrzkomórkowych.^{182,183} Do opisanie danych zastosowano dwuskładnikowy, anomalny model dyfuzji ($\alpha < 1$, $i = 2$ z Równania (2.1.)). (C, D) Obrazowanie konfokalne komórek MDA-MB-231 i krzywa autokorelacji FCS po zastosowaniu samego dekstranu osmotycznie czynnego 70 000 Da. Do danych eksperymentalnych dopasowano jednoskładnikowy model dyfuzji anomalnej ($\alpha < 1$, $i = 1$ z Równania (2.1.)).

Dla porównania, pęcherzyków pinocytarnych nie zaobserwowano, zarówno w obrazowaniu jak i pomiarach FCS, dla wariantu 4. zawierającego sam dekstran 70 kDa.¹⁷⁸ Z zastosowaniem dekstranu 70 kDa [116 g/L], sprawdzono również, czy procedura szoku osmotycznego jest toksyczna dla komórek. Otrzymana żywotność komórek HeLa oraz MDA-MB-231 była na poziomie 100%.¹⁷⁸ Wykazano zatem, że dostarczanie cząsteczek za pośrednictwem szoku osmotycznego jest nieszkodliwe dla komórek.

Reżim splątania łańcuchów polimerowych jako parametr krytyczny dla dostarczania wewnątrzkomórkowego

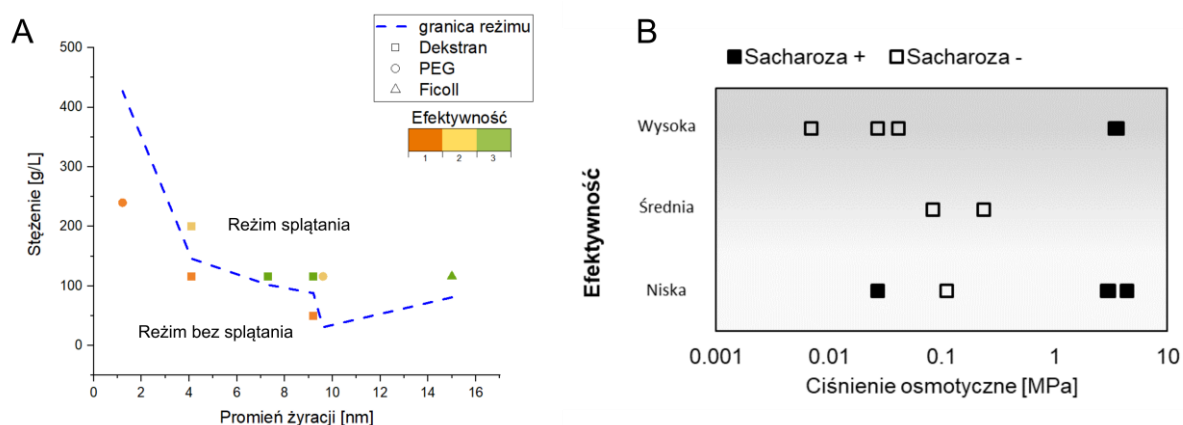
Opisane powyżej wyniki wzbudziły wiele pytań, dlatego eksperymenty rozszerzono o kolejne warianty medium hipertonicznego, składającego się z różnych rodzajów polimerów o różnej masie cząsteczkowej i/lub sacharozy. Jako jednostki stężenia polimerów osmotycznych użyto [g/L]. Skuteczność każdego wariantu była analizowana jak poprzednio, poprzez obrazowanie konfokalne i pomiary FCS. Podsumowanie wszystkich wariantów zamieszczono w Tabeli 3.7.1.

Tabela 3.7.1. Podsumowanie wszystkich badanych wariantów roztworów hipertonicznych, z uwzględnieniem rodzaju polimeru budującego ciśnienie osmotyczne, jego stężenia, masy cząsteczkowej, obecności lub braku sacharozy oraz oceny skuteczności danego wariantu. Uwzględniono również testowane linie komórkowe i próbniki badane dla każdego wariantu.

Skład medium hipertonicznego	Ciśnienie osmotyczne medium hipertonicznego [MPa]	Efektywność (0 - niska, 1 - średnia, 2 - wysoka)	Testowane linie komórkowe	Testowane próbki
PEG 1 kDa [240 g/L] + sacharoza [1,17 M]	4,4 ¹⁷⁷	0	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
Dekstran 70 kDa [116 g/L] + sacharoza [1,36 M]	3,4	2	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
			HeLa	TRITC-dekstrany
Dekstran 70 kDa [50 g/L] + sacharoza [0,008 M]	0,027	0	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
Ficoll® 400 kDa [640 g/L] + sacharoza [1,36 M]	3,6	2	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany
PEG 35 kDa [116 g/L] + sacharoza [1,17 M]	3,0	0	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
Sacharoza [1,17 M]	2,9	0	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany
Dekstran 70,000 Da [116 g/L]	0,027	2	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG, cząsteczki DNA
			HeLa	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG, cząsteczki DNA
			Fibroblasty	TRITC-dekstrany
			A549	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG, cząsteczki DNA
			HEK 293	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
			Hep G2	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
			U2-OS	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG, cząsteczki DNA

			MCF-7	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG, białka
Dekstran 40 kDa [116 g/L]	0,041	2	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
Dekstran 10 kDa [116 g/L]	0,11	0	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
Dekstran 10 kDa [200 g/L]	0,237	1	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
PEG 35 kDa [116 g/L]	0,084	1	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG
Ficoll® 400 kDa [116 g/L]	0,007	2	MDA-MB-231	TRITC-dekstrany, nanocząstki krzemionkowe pokryte PEG

Bazując na uzyskanych wynikach dla wszystkich przetestowanych wariantów potwierdzono hipotezę, że obecność sacharozy nie jest kluczowa dla powodzenia dostarczania związków do cytoplazmy ludzkich komórek. Spośród pięciu roztworów hipertonicznych zawierających sacharozę, trzy były nieskuteczne. Z drugiej strony, media pozbawione sacharozy okazały się skuteczne w pięciu z sześciu przypadków. Należy również podkreślić, że kolejnym parametrem, który nie decydował o skuteczności było ciśnienie osmotyczne. Mimo, że siłą napędzoną badanego procesu jest ciśnienie, w niniejszej rozprawie nie odnotowano zależności między wartościami ciśnienia osmotycznego a efektywnością (Rysunek 3.7.2.B). Zakres ciśnienia osmotycznego skutecznych roztworów hipertonicznych wyniósł 0,007 - 3,6 MPa.



Rysunek 3.7.2. Reżim splątania łańcuchów polimerowych jako parametr krytyczny dla powodzenia procesu wprowadzania związków do ludzkich komórek. A) Zależność stężenia polimeru osmotycznego w funkcji jego promienia żyrcji. B) Zależność efektywności uwalniania związków z pęcherzyków wewnątrzkomórkowych od ciśnienia osmotycznego (całkowitego ciśnienia osmotycznego polimeru i sacharozy) oraz zawartości sacharozy. Jak widać ani ciśnienie osmotyczne, ani obecność sacharozy nie są parametrami determinującymi efektywność uwalniania związków z pęcherzyków pinocytarnych.

Aby ustalić, co jest parametrem decydującym o powodzeniu procesu dostarczania wewnątrzkomórkowego, w kolejnym kroku określono geometrię badanych roztworów

polimerowych. Dla każdego z wariantów, za pomocą Równania (3.4.) obliczono stężenia graniczne splątania cząsteczek polimerów.¹⁸⁴

$$R_H = R_g \left(\frac{\frac{4}{3} \pi C R_g^3 N_A}{M_w} \right)^{-\beta}$$

Równanie (3.4.)

gdzie R_H to promień hydrodynamiczny polimeru, R_g – promień żyrcji polimeru, C oznacza graniczne stężenie splątania, N_A to liczba Avogadro, M_w - masa cząsteczkowa polimeru, a $\beta = v/(1-3v)$ odpowiada wykładnikowi Flory'ego, który charakteryzuje ruch polimeru w danym rozpuszczalniku i przyjmuje wartości: $v = 0,60$ ¹⁸⁴ dla wody w przypadku PEG, dekstranu i Ficoll®.¹⁷⁸

W reżimie splątania, łańcuchy polimeru nakładają się na siebie, przeciwnie do obszaru bez splątania, w którym cząsteczki polimeru swobodnie dyfundują jako oddzielne, zwarte kule.¹⁸⁴ Na podstawie uzyskanych wyników i przeprowadzonej analizy wykazano, że zastosowanie polimeru (PEG, dekstranu lub Ficoll®) w reżimie splątania jest wyznacznikiem sukcesu procesu dostarczania związków do wnętrza komórek. Warto zaznaczyć, że najskuteczniejsze roztwory hipertoniczne miały najniższe wartości ciśnienia osmotycznego. Z drugiej strony, media hipertoniczne zawierające sacharozę były skuteczne tylko wtedy, gdy opierały się na obecności dużych polimerach (jak dekstran 70 kDa i Ficoll® 400 kDa). Przyjęto zatem, że polimer, który jest wystarczająco duży może zrekompensować obecność sacharozy w medium. Warto przyjrzeć się także wariantowi medium hipertonicznego zawierającego tylko PEG 35 kDa w stężeniu 116 g/L. To połączenie wykazało skuteczność tylko względem wprowadzania do komórek nanocząstek pokrytych PEG.

Na podstawie uzyskanych wyników przypuszczano, że za efektywność dostarczania cząsteczek do wnętrza komórek odpowiadają dwa procesy: (1) ilość próbnika zamkniętego w pęcherzyku i (2) efektywność pęknięcia pęcherzyka w medium hipotonicznym. Proces (1) został zbadany i nie odnotowano istotnych różnic.¹⁷⁸ Zatem proces (2) wydaje się być kluczowym i zapewnianym najprawdopodobniej przez wystarczająco dużą różnicę ciśnień wytworzoną na granicy pęcherzyk-cytoplazma. Badania wykazały, że ta różnica jest bezpośrednio skorelowana ze stężeniem polimeru. To stężenie z kolei implikuje reżim splątania łańcuchów polimerowych, które w tym zakresie stężeń nakładają się na siebie i wzajemnie przenikają.¹⁸⁴ Warto zaznaczyć, że reżim splątania wydaje się być determinantą zapobiegającą ucieczce pojedynczych cząsteczek polimeru z pęcherzyka podczas napływu wody.

Przeprowadzono badania pozwoliły także dowieść, że rozmiar polimeru osmotycznego ma kluczowe znaczenie podczas dostarczania wewnątrzkomórkowego. Najwyższą skuteczność odnotowano dla polimerów o promieniu żyrcji większym niż 6 nm (w zakresie wariantów w reżimach splątania, Rysunek 3.7.2.A). Parametr ten może być kluczowy podczas napływu wody do pęcherzyka pinocytarnego. Polimery o promieniach mniejszych niż 6 nm, takie jak PEG 1 kDa o promieniu żyrcji 1,2 nm, prawdopodobnie opuszczają pęcherzyk. W rezultacie wewnątrz pęcherzyka nie będzie generowane wystarczające ciśnienie, czego efektem będzie

utrzymanie integralności pęcherzyka. Zatem wariant PEG 1 kDa wzbogacony sacharozą był nieskuteczny z dwóch powodów: cząsteczki PEG 1 kDa były zbyt małe, a ich stężenie było zbyt niskie.

Warto także przeanalizować otrzymane wyniki pod kątem stopnia rozgałęzienia przebadanych polimerów osmotycznie czynnych. PEG jest polimerem liniowym.¹⁸⁵ Z kolei Ficoll® to najbardziej rozgałęziony polimer ze wszystkich badanych.¹⁸⁶ Można więc przypuszczać, że liniowość PEG jest dodatkowym wyjaśnieniem jego niskiej skuteczności. Liniowa cząsteczka może bowiem wydostać się z pęcherzyka, podobnie jak sacharoza, przez rozluźnioną błonę komórkową podczas napływu wody. Z drugiej strony, wynik uzyskany dla PEG 35 kDa bez i z sacharozą sugeruje, że wyjaśnienie jest bardziej skomplikowane. Sam PEG 35 kDa był skuteczny tylko w przypadku dostarczania nanocząstek pokrytych PEG. Można więc przypuszczać, że same nanocząstki generują wystarczająco wysokie ciśnienie osmotyczne, aby wywołać rozerwanie pęcherzyków. Jednak ten sam polimer, PEG 35 kDa, uzupełniony o sacharozę był nieskuteczny dla wszystkich testowanych próbników. Analizując kolejne polimery, dekstran jest bardziej rozgałęzionym polimerem od PEG. W związku z tym, nie powinien wydostawać się przez błonę pęcherzyka w drugim etapie procesu, gdy woda wpływa do komórki i pęcherzyków. Jednak uzyskane wyniki dowodzą, że dekstran 10 kDa lub największy przebadany dekstran 70 kDa stosowany w zbyt niskim stężeniu był całkowicie nieefektywny.

Na komentarz zasługują także ładunki elektryczne badanych polimerów. PEG jest polimerem pozbawionym ładunku, podczas gdy dekstran i Ficoll® są obecnie uważane za słabo naładowane ujemnie.^{185,187} Jeśli jednak ładunek miałby być czynnikiem decydującym o powodzeniu całego procesu, to dla przykładu dekstran 70 kDa w reżimie bez splątania byłby skuteczny. Wydaje się więc, że struktura chemiczna polimeru nie ma decydującego wpływu na skuteczność dostarczania cząsteczek do komórek szokiem osmotycznym.

Podsumowując, można wnioskować, że to reżim splątania, a więc odpowiednio wysokie stężenie polimeru osmotycznie czynnego jest wyznacznikiem skuteczności. Warto jednak pamiętać, że czynniki takie jak rozgałęzienie polimeru (jego kształt), hydrofilowość czy ładunek elektryczny mogą również nieznacznie wpływać na powodzenie procesu dostarczania.

Sugerowany mechanizm wnikania cząsteczek do ludzkich komórek szokiem osmotycznym

Na podstawie opisanych wyżej wyników sugerowany i spodziewany jest następujący mechanizm dostarczania wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem szoku osmotycznego:¹⁷⁸

1) gdy komórka zostaje umieszczona w roztworze hipertonicznym, woda z niej wypływa, aby wyrównać ciśnienie osmotyczne. Następuje pinocytoza. Pęcherzyki pinocytarne zawierają składniki medium hipertonicznego: zarówno małe cząsteczki (sacharoza), jak i makrocząsteczki (polimer i wprowadzany do komórek próbnik).

2) gdy komórka zostaje przeniesiona do środowiska hipotonicznego, cytoplazma - ze względu na właściwości błony komórkowej - również staje się roztworem hipotonicznym (w przeciwieństwie do zawartości pęcherzyka).

3) na granicy pęcherzyk pinocytarny - cytoplazma powstaje różnica ciśnień osmotycznych. W rezultacie woda wpływa do pęcherzyka. W pierwszym etapie tego procesu struktura dwuwarstwy fosfolipidowej ulega rozluźnieniu - małe cząsteczki (takie jak sacharoza) zamknięte w pęcherzyku mogą zostać uwolnione do cytoplazmy. Ten etap ma kluczowe znaczenie dla powodzenia procesu dostarczania.

4) jeśli cząsteczki (w tym polimer osmotycznie czynny) pozostające w pęcherzyku utrzymują wystarczająco wysokie ciśnienie osmotyczne, dalszy napływ wody do pęcherzyka spowoduje pęknięcie błony i uwolnienie całej zawartości pęcherzyka do cytoplazmy.

Podsumowanie dostarczania wewnątrzkomórkowego szokiem osmotycznym

W ramach niniejszej rozprawy zgłębiono kwestię efektywności dostarczania cząsteczek do żywych, ludzkich, komórek szokiem osmotycznym. Wykazano, że metoda FCS z powodzeniem może zostać zastosowana do oceny skuteczności dostarczania wewnątrzkomórkowego na poziomie pojedynczej komórki i pojedynczej cząsteczki. W trakcie badań przeanalizowano szereg roztworów hipertonicznych, różniących się typem badanego polimeru osmotycznie czynnego, jego wielkością, ciśnieniem osmotycznym i brakiem lub obecnością sacharozy. Uzyskane wyniki wykazały, że efektywność dostarczania cząsteczek do ludzkich komórek wzrasta wraz ze wzrostem wielkości polimeru budującego ciśnienie osmotyczne, ale przede wszystkim wraz z wejściem w reżim splątania łańcuchów polimerowych. Co więcej, wykluczono wpływ sacharozy na powodzenie procesu dostarczania - sacharoza jest czynnikiem wzmagającym pinocytozę, ale nie jest zaangażowana w lizę osmotyczną pęcherzyków pinocytarnych. To splątanie łańcuchów polimerowych w roztworze hipertonicznym okazało się parametrem zapewniającym rozerwanie pęcherzyka i dostarczenie pożądanej cząsteczki do wnętrza komórki.

Dodatkowo, na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano mechanizm procesu dostarczania cząsteczek z zastosowaniem szoku osmotycznego. Warto podkreślić, że splątanie łańcuchów polimerowych obecnych w pęcherzyku zapobiega uwalnianiu pojedynczych cząsteczek, a tym samym zwiększa szansę na przerwanie ciągłości błony pęcherzyka. W ramach badań przedstawiono przykłady mediów hipertonicznych w reżimie splątania, które skutecznie dostarczyły różne próbki (od małych polimerów po plazmidy) do różnych typów komórek. Podsumowując, badania te są przykładem, że zrozumienie parametrów fizycznych jest ściśle związane z wynikiem biologicznym.

Opisane w tym rozdziale wyniki stanowiły wstęp do opracowania zoptymalizowanego odczynnika o nazwie Cell-IN, który jest przedmiotem komercjalizacji prowadzonej w Instytucie Chemii Fizycznej PAN.

4. Końcowe wnioski

Internalizacja określonej cząsteczki do wnętrza ludzkich komórek może być zjawiskiem pożądanym lub nie. W ujęciu terapii celowanych, kluczowe znaczenie ma lokalizacja celu molekularnego badanej molekuly. W przypadkach, gdy docelowa struktura molekularna występuje wewnątrzkomórkowo, skuteczność terapii wymaga jego aktywnej internalizacji. Z kolei, gdy celem działania leku są struktury obecne na zewnątrz komórek – jak ma to miejsce w przypadku wielu przeciwciał monoklonalnych – pozostanie cząsteczki w przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest nie tylko wystarczające, lecz wręcz preferowane. Z tego względu lokalizacja celu molekularnego determinuje konieczność internalizacji, która z kolei ma bezpośredni wpływ na skuteczność danego związku terapeutycznego.

Biorąc pod uwagę znaczenie procesu internalizacji, w niniejszej pracy przeprowadzono badania nad wnikaniem różnych typów cząsteczek, obejmujących leki, dinukleotydy, białka oraz barwniki. Dla każdej z tych grup, wykazano, że technika FCS zastosowana we wnętrzu pojedynczych, żywych komórek nowotworowych pozwala na ilościową, precyzyjną charakterystykę wnikania wewnątrzkomórkowego cząsteczek. Do tak szczegółowej analizy niezbędne jest dysponowanie informacją o rozmiarach badanych cząsteczek i przewidywanych składników wewnątrzkomórkowych oraz o nanolepkości wnętrza komórkowego zależnej od skali długości – cząsteczki o różnych rozmiarach doświadczają innego oporu hydrodynamicznego wewnątrz komórek.

Charakterystyka wnikania i losów różnych cząsteczek we wnętrzu żywych komórek za pomocą techniki FCS obejmowała określenie:

- mechanizmu wnikania: transport aktywny, endocytoza konstytutywna, dyfuzja bierna, transport za pośrednictwem makrofagów;
- efektywności wnikania molekuly zdefiniowanej jako stosunek jej stężenia wewnątrzkomórkowego do stężenia na zewnątrz (w medium otaczającym badane komórki);
- formy występowania cząsteczki we wnętrzu komórek: stan swobodnie dyfundujący, związanie z celem molekularnym (jak na przykład leku olaparib z białkiem PARP1), oddziaływanie z komponentami wewnątrzkomórkowymi, lokalizację w strukturze pęcherzykowej, czy ocenę stanu oligomeryzacji;
- stężeń wewnątrzkomórkowych poszczególnych, wykrytych form występowania;
- dystrybucji cząsteczki między jądrem komórkowym a cytoplazmą, dysponując modelem nanolepkości dla każdego z tych kompartmentów komórkowych;
- rotacji lub jego braku celu wewnątrzkomórkowego badanego związku, na przykładzie rotacji podjednostki rybosomalnej związanej z YO-PRO-1.

Dodatkowo, zastosowanie innych technik analitycznych (jak obrazowanie konfokalne, testy cytotoksyczności, wyznaczenie stałej równowagi kompleksu w buforze (*in vitro*), analiza proteomiczna) oraz rozszerzenie zakresu eksperymentów o inne cząsteczki, czy dodatkowe linie komórkowe, umożliwiło uzyskanie szerszych informacji o konkretnej, badanej cząsteczce. Przykładowo w ten sposób wykazano, że efekt terapeutyczny olaparibu wydaje się być skorelowany z ilością białka BRCA1 – szlaku odpowiedzi komórkowej na naprawę uszkodzeń

DNA, aktywowanego po zablokowaniu białka PARP1. Im wyższa ekspresja BRCA1 w komórkach, tym słabszy efekt cytotoksyczny. Z kolei dla bewacizumabu rozszerzone badania dowiodły, że lek ten nie jest pobierany przez komórki nowotworowe chętniej od neutralnej dla nich molekuly – znakowanego dekstranu.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono także eksperymenty dotyczące metody wprowadzania różnych typów cząsteczek do wnętrza ludzkich komórek przez zastosowanie różnicy ciśnień osmotycznych. Bowiem w sytuacjach, gdy cząsteczka terapeutyczna – dla której internalizacja jest warunkiem skuteczności działania – nie przenika samodzielnie przez błonę komórkową, konieczne jest zastosowanie technik wspomagających jej transport do przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Uzyskane w pracy wyniki pozwoliły na ustalenie, co jest parametrem decydującym o powodzeniu dostarczania wewnątrzkomórkowego poprzez aplikację szoku osmotycznego. Jako efekt wykonanych eksperymentów opracowano odczynnik Cell-IN – prostą, szybką, uniwersalną i bezpieczną dla komórek technologię przekraczania bariery błony komórkowej.

5. Podsumowanie

W ramach badań przeprowadzonych w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że:

Rozdział 3.1. (strony 61-64)

- nanolepkość cytoplazmy komórek potrójnie ujemnego raka piersi linii MDA-MB-231 można opisać Równaniem (1.5.), a więc modelem w skali nanoskopowej zależnym od skali długości.

Rozdział 3.2. (strony 64-81)

- lek o nazwie olaparib, działający wewnątrzkomórkowo i ulegający związaniu do białka PARP1, wnika do komórek potrójnie ujemnego raka piersi oraz raka szyjki macicy;
- stopień akumulacji olaparibu wewnątrzkomórkowo jest skorelowany z ilością białka PARP1. Im więcej PARP1, tym większe stężenie olaparibu w komórkach.
- białko PARP1 występuje w cytoplazmie komórek potrójnie ujemnego raka piersi oraz raka szyjki macicy;
- efekt terapeutyczny olaparibu wydaje się być skorelowany z ilością białka BRCA1 – szlaku odpowiedzi komórkowej na naprawę uszkodzeń DNA, aktywowanego po zablokowaniu białka PARP1. Im wyższa ekspresja BRCA1 w komórkach, tym słabszy efekt cytotoksyczny.

Rozdział 3.3. (strony 81-98)

- bewacizumab, lek działający zewnątrzkomórkowo i ulegający związaniu do czynnika VEGF, internalizuje do komórek potrójnie ujemnego raka piersi oraz raka szyjki macicy;
- transport bewacizumabu do komórek nowotworowych jest przypadkowy i zachodzi na drodze endocytozy konstytutywnej;
- bewacizumab nie jest pobierany przez komórki nowotworowe chętniej od neutralnej dla nich cząsteczki – znakowanego dekstranu;
- stopień internalizacji bewacizumabu przez badane w pracy komórki nowotworowe jest około 100 000 razy mniejszy w porównaniu do olaparibu działającego wewnątrzkomórkowo.

Rozdział 3.4. (strony 98-103)

- terapeutyczne dinukleotydy m^7GpppA -FAM-FA oraz m^7GpppA -FAM-Chol wnikają do komórek potrójnie ujemnego raka piersi;
- domniemany mechanizm transportu obu badanych konjugatów to transport aktywny.

Rozdział 3.5. (strony 103-112)

- w wyniku transferu ferrytyny i hemoglobiny przez makrofagi do komórek potrójnie ujemnego raka piersi, oba białka są obecne w formie wolnej w komórkach nowotworowych;

- wewnątrz makrofagów nie zachodzi całkowita degradacja zarówno hemoglobiny jak i ferrytyny, a w komórkach nowotworowych występują różne formy oligomeryczne obu białek.

Rozdział 3.6. (strony 112-123)

- barwnik YO-PRO-1 wnika do żywych komórek potrójnie ujemnego raka piersi oraz raka szyjki macicy;
- YO-PRO-1 wewnątrzkomórkowo selektywnie wybarwia tRNA oraz rRNA;
- zakodowane na poszczególnych, badanych wariantach plazmidów DNA białko PRMT1 wykazuje zróżnicowane stopnie oligomeryzacji;
- różne warianty oligomeryczne białka PRMT1 charakteryzują się odmienną dystrybucją pomiędzy kompartmentami komórkowymi raka szyjki macicy: jądrem i cytoplazmą (na podstawie stężeń wewnątrzkomórkowych).

Rozdział 3.7. (strony 123-131)

- parametrem decydującym o powodzeniu procesu dostarczania wewnątrzkomórkowego różnych związków szokiem osmotycznym jest zastosowanie polimeru budującego ciśnienie osmotyczne w reżimie splątania łańcuchów polimerowych;
- sacharoza obecna w medium hipertonicznym nie jest składnikiem determinującym skuteczność dostarczania związków do komórek różnicą ciśnień osmotycznych, podobnie jako wartość ciśnienia osmotycznego;
- etapem kluczowym dostarczania wewnątrzkomórkowego szokiem osmotycznym jest pęknięcie pęcherzyków pinocytarnych. Proces ten zachodzi, gdy składniki obecne wewnątrz pęcherzyka generują wystarczające ciśnienie osmotyczne, prowadząc do jego rozerwania pod napływem wody.

6. Bibliografia

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229-263. doi:10.3322/caac.21834
2. Guida F, Kidman R, Ferlay J, et al. Global and regional estimates of orphans attributed to maternal cancer mortality in 2020. *Nat Med.* 2022;28(12):2563-2572. doi:10.1038/s41591-022-02109-2
3. Won K-A, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol.* 2020;57(6):1245-1261. doi:10.3892/ijo.2020.5135
4. Aysola K, Desai A, Welch C, et al. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hered Genet.* 2013;2013(1):1-7. doi:10.4172/2161-1041.s2-001
5. Xiong N, Wu H, Yu Z. Advancements and challenges in triple-negative breast cancer: a comprehensive review of therapeutic and diagnostic strategies. *Front Oncol.* 2024;14(1405491):1-11. doi:10.3389/fonc.2024.1405491
6. Zagami P, Carey LA. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *npj Breast Cancer.* 2022;8(1):1-10. doi:10.1038/s41523-022-00468-0
7. Dietze EC, Sistrunk C, Miranda-Carboni G, O'Regan R, Seewaldt VL. Triple-negative breast cancer in African-American women: disparities versus biology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;15(4):248-254. doi:10.1038/nrc3896
8. Siddharth S, Sharma D. Racial disparity and triple-negative breast cancer in African-American women: A multifaceted affair between obesity, biology, and socioeconomic determinants. *Cancers (Basel).* 2018;10(12):1-19. doi:10.3390/cancers10120514
9. Li Y, Su P, Wang Y, et al. Impact of histotypes on preferential organ-specific metastasis in triple-negative breast cancer. *Cancer Med.* 2020;9(3):872-881. doi:10.1002/cam4.2759
10. Mahmoud R, Ordóñez-Morán P, Allegrucci C. Challenges for Triple Negative Breast Cancer Treatment: Defeating Heterogeneity and Cancer Stemness. *Cancers (Basel).* 2022;14(17):1-15. doi:10.3390/cancers14174280
11. Jallah JK, Dweh TJ, Anjankar A, Palma O. A Review of the Advancements in Targeted Therapies for Breast Cancer. *Cureus.* 2023;2(10). doi:10.7759/cureus.47847
12. Erasmo Orrantia-Borunda, Patricia Anchondo-Nuñez, Lucero Evelia Acuña-Aguilar, Francisco Octavio Gómez-Valles, Claudia Adriana Ramírez-Valdespino. Subtypes of Breast Cancer. *Breast Cancer.* Published online 2022:31-42.
13. Shaath H, Elango R, Alaje NM. Molecular classification of breast cancer utilizing long non-coding rna (Lncrna) transcriptomes identifies novel diagnostic lncrna panel for triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(21). doi:10.3390/cancers13215350
14. Chmielewski G, Gózdź S. Diagnostics and systemic treatment of triple-negative breast cancer: discoveries of the past, challenges for the future. *Med Stud.* 2024;40(1):75-81. doi:10.5114/ms.2024.137605
15. Lipinski M, Parks DR, Rouse R V., Herzenberg LA. Human trophoblast cell-surface

- antigens defined by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(8 I):5147-5150. doi:10.1073/pnas.78.8.5147
16. Zaman S, Jadid H, Denson AC, Gray JE. Targeting trop-2 in solid tumors: Future prospects. *Onco Targets Ther*. 2019;12:1781-1790. doi:10.2147/OTT.S162447
 17. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):16824-16837. doi:10.1002/jcp.28358
 18. Frydenlund N, Mahalingam M. PD-L1 and immune escape: insights from melanoma and other lineage-unrelated malignancies. *Hum Pathol*. 2017;66:13-33. doi:10.1016/j.humpath.2017.06.012
 19. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(9):810-821. doi:10.1056/nejmoa1910549
 20. Cameron D, Brown J, Dent R, et al. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): Primary results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(10):933-942. doi:10.1016/S1470-2045(13)70335-8
 21. Friedberg EC, Castrillon DH, Galindo RL, Wharton KA. *New-Opathies: An Emerging Molecular Reclassification of Human Disease*; 2012. doi:10.1142/8196
 22. Pascal JM. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2018;71:177-182. doi:10.1016/j.dnarep.2018.08.022
 23. Tangutoori S, Baldwin P, Sridhar S. PARP inhibitors: A new era of targeted therapy. *Maturitas*. 2015;81(1):5-9. doi:10.1016/j.maturitas.2015.01.015
 24. Nagy L, Rauch B, Balla N, et al. Olaparib induces browning of in vitro cultures of human primary white adipocytes. *Biochem Pharmacol*. 2019;167:76-85. doi:10.1016/j.bcp.2019.06.022
 25. Robson ME, Tung N, Conte P, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2019;30(4):558-566. doi:10.1093/annonc/mdz012
 26. <https://www.cdc.gov/cancer/dataviz>.
 27. Galicia-Carmona T, Arango-Bravo EA, Coronel-Martínez JA, et al. Advanced, recurrent, and persistent cervical cancer management: in the era of immunotherapy. *Front Oncol*. 2024;14(1392639). doi:10.3389/fonc.2024.1392639
 28. Mann M, Singh VP, Kumar L. Cervical cancer: a tale from HPV infection to PARP inhibitors. *Genes Dis*. 2023;10(4):1445-1456. doi:10.1016/j.gendis.2022.09.014
 29. Peters S, Kerr KM, Stahel R. PD-1 blockade in advanced NSCLC: A focus on pembrolizumab. *Cancer Treat Rev*. 2018;62:39-49. doi:10.1016/j.ctrv.2017.10.002
 30. Chung HC, Ros W, Delord JP, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in previously treated advanced cervical cancer: Results from the phase II KEYNOTE-158 study. *J Clin Oncol*. 2019;37(17):1470-1478. doi:10.1200/JCO.18.01265
 31. Krishna A, Sathya M, Mukesh S, et al. Efficacy and safety of EGFR inhibitor gefitinib in recurrent or metastatic cervical cancer: a preliminary report. *Med Oncol*.

2023;40(7):1-6. doi:10.1007/s12032-023-02070-1

32. Nogueira-Rodrigues A, Moralez G, Grazziotin R, et al. Phase 2 trial of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Cancer*. 2014;120(8):1187-1193. doi:10.1002/cncr.28471
33. Kimmitt R, Vieira M. Research Synthesis : Costs of Pharmaceutical R&D. Published online 2020:1-34.
34. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ*. 2016;47:20-33. doi:10.1016/j.jhealeco.2016.01.012
35. MacDonald L, Baldini G, Storrie B. Does Super Resolution Fluorescence Microscopy Obsolete Previous Microscopic Approaches to Protein Co-localization? *Methods Mol Biol*. 2015;1270:255–275. doi:10.1007/978-1-4939-2309-0
36. Agarwal A, Tripathi P, Tripathi S, Jain N. Fluorescence Imaging: Applications in Drug Delivery Research. *Curr Drug Targets*. 2008;9(10):895-898. doi:10.2174/138945008785909275
37. Diesner SC, Wang XY, Jensen-Jarolim E, Untersmayr E, Gabor F. Use of lectin-functionalized particles for oral immunotherapy. *Ther Deliv*. 2012;3(2):277-290. doi:10.4155/tde.11.146
38. Friend DR. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(2 SPEC. ISS.):247-265. doi:10.1016/j.addr.2004.08.011
39. White NS, Errington RJ. Fluorescence techniques for drug delivery research: Theory and practice. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(1 SPEC. ISS.):17-42. doi:10.1016/j.addr.2004.08.003
40. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(2):145-160. doi:10.1038/nrd1632
41. Chen Y, Li T. Cellular Uptake Mechanism of Paclitaxel Nanocrystals Determined by Confocal Imaging and Kinetic Measurement. *AAPS J*. 2015;17(5):1126-1134. doi:10.1208/s12248-015-9774-0
42. Pavaloiu R-D, Sha'At F, Sha'At M, Nechifor G. Intracellular Uptake Study of Polymeric Nanoparticles Loaded with Cardiovascular Drugs Using Confocal Laser Scanning Microscopy. Published online 2021:140. doi:10.3390/ecsoc-24-08427
43. Torchilin VP, Levchenko TS, Rammohan R, Volodina N, Papahadjopoulos-Sternberg B, D'Souza GGM. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):1972-1977. doi:10.1073/pnas.0435906100
44. St Croix CM, Shand SH, Watkins SC. Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems. *Biotechniques*. 2005;39(6 Suppl). doi:10.2144/000112089
45. Lu Y, Jabbari P, Mukhamedshin A, Zvyagin A V. Fluorescence lifetime imaging in drug delivery research. *Adv Drug Deliv Rev*. 2025;218(January):115521. doi:10.1016/j.addr.2025.115521
46. Krafft C, Belay B, Bergner N, et al. Advances in optical biopsy-correlation of malignancy and cell density of primary brain tumors using Raman microspectroscopic

- imaging. *Analyst*. 2012;137(23):5533-5537. doi:10.1039/c2an36083g
47. Huang J, Zong C, Shen H, Cao Y, Ren B, Zhang Z. Tracking the intracellular drug release from graphene oxide using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Nanoscale*. 2013;5(21):10591-10598. doi:10.1039/c3nr03264g
 48. Kuhar N, Sil S, Verma T, Umapathy S. Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials. *RSC Adv*. 2018;8(46):25888-25908. doi:10.1039/c8ra04491k
 49. Chandra A, Kumar V, Garnaik UC, et al. Unveiling the Molecular Secrets: A Comprehensive Review of Raman Spectroscopy in Biological Research. *ACS Omega*. Published online 2024. doi:10.1021/acsomega.4c00591
 50. Farhane Z, Bonnier F, Casey A, Byrne HJ. Raman micro spectroscopy for in vitro drug screening: Subcellular localisation and interactions of doxorubicin. *Analyst*. 2015;140(12):4212-4223. doi:10.1039/c5an00256g
 51. Edwards BS, Sklar LA. Flow cytometry: Impact on early drug discovery. *J Biomol Screen*. 2015;20(6):689-707. doi:10.1177/1087057115578273
 52. McKinnon KM. Flow cytometry: an overview. *Curr Protoc Immunol*. 2019;120(5.1.):1-11. doi:10.1007/978-94-017-0623-0_1
 53. Jepras R, Ludbrook S. Evolution of flow cytometry as a drug screening platform. *Drug Discov World Spring*. 2013;14(2):43-50.
 54. Khanna I. Drug discovery in pharmaceutical industry: Productivity challenges and trends. *Drug Discov Today*. 2012;17(19-20):1088-1102. doi:10.1016/j.drudis.2012.05.007
 55. Brittain GC, Gulnik S. A rapid method for quantifying cytoplasmic versus nuclear localization in endogenous peripheral blood leukocytes by conventional flow cytometry. *Cytom Part A*. 2017;91(4):351-363. doi:10.1002/cyto.a.23103
 56. Guo P, Huang J, Moses-Gardner A, Smith ER, Moses MA. Quantitative Analysis of Different Cell Entry Routes of Actively Targeted Nanomedicines Using Imaging Flow Cytometry. *Cytom Part A*. 2019;95(8):843-853. doi:10.1002/cyto.a.23848
 57. Van Der Meer AD, Vermeul K, Poot AA, Feijen J, Vermes I. Flow cytometric analysis of the uptake of low-density lipoprotein by endothelial cells in microfluidic channels. *Cytom Part A*. 2010;77(10):971-975. doi:10.1002/cyto.a.20937
 58. Ofir-Birin Y, Abou karam P, Rudik A, Giladi T, Porat Z, Regev-Rudzki N. Monitoring extracellular vesicle cargo active uptake by imaging flow cytometry. *Front Immunol*. 2018;9(MAY):8-10. doi:10.3389/fimmu.2018.01011
 59. Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, et al. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part Fibre Toxicol*. 2013;32:1-9.
 60. Zhang Y, Hansen JK, Xiang L, et al. A flow cytometry method to quantitate internalized immunotoxins shows that taxol synergistically increases cellular immunotoxins uptake. *Cancer Res*. 2010;70(3):1082-1089. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2405
 61. Caccia M, Nardo L, Santoro R, Schaffhauser D. Silicon Photomultipliers and SPAD

- imagers in biophotonics: Advances and perspectives. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip.* 2019;926(October 2018):101-117. doi:10.1016/j.nima.2018.10.204
62. Sauer M, Hofkens J, Enderlein J. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011.
 63. Schwille P. Fluorescence Correlation Spectroscopy and Its Potential for Intracellular Applications. *Cell Biochem Biophysics.* 2001;34.
 64. Kim SA, Heinze KG, Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Nat Methods.* 2007;4(11):963-973. doi:10.1038/nmeth1104
 65. Macháň R, Wohland T. Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems. *FEBS Lett.* 2014;588(19):3571-3584. doi:10.1016/j.febslet.2014.03.056
 66. Zhang D, Manna M, Wohland T, Kraut R. Alternate raft pathways cooperate to mediate slow diffusion and efficient uptake of a sphingolipid tracer to degradative and recycling compartments. *J Cell Sci.* 2009;122(20):3715-3728. doi:10.1242/jcs.051557
 67. Gerken M, Krippner-Heidenreich A, Steinert S, et al. Fluorescence correlation spectroscopy reveals topological segregation of the two tumor necrosis factor membrane receptors. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2010;1798(6):1081-1089. doi:10.1016/j.bbamem.2010.02.021
 68. Bancaud A, Huet S, Daigle N, Mozziconacci J, Beaudouin J, Ellenberg J. Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J.* 2009;28(24):3785-3798. doi:10.1038/emboj.2009.340
 69. Hihara S, Pack CG, Kaizu K, et al. Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells. *Cell Rep.* 2012;2(6):1645-1656. doi:10.1016/j.celrep.2012.11.008
 70. Avilov S V., Moisy D, Munier S, Schraidt O, Naffakh N, Cusack S. Replication-Competent Influenza A Virus That Encodes a Split-Green Fluorescent Protein-Tagged PB2 Polymerase Subunit Allows Live-Cell Imaging of the Virus Life Cycle. *J Virol.* 2012;86(3):1433-1448. doi:10.1128/jvi.05820-11
 71. Broderick R, Ramadurai S, Tóth K, et al. Cell cycle-dependent mobility of Cdc45 determined in vivo by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *PLoS One.* 2012;7(4). doi:10.1371/journal.pone.0035537
 72. Cui Y, Cho IH, Chowdhury B, Irudayaraj J. Real-time dynamics of methyl-CpG-binding domain protein 3 and its role in DNA demethylation by fluorescence correlation spectroscopy. *Epigenetics.* 2013;8(10):1089-1100. doi:10.4161/epi.25958
 73. Vukojević V, Papadopoulos DK, Terenius L, Gehring WJ, Rigler R. Quantitative study of synthetic Hox transcription factor-DNA interactions in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(9):4093-4098. doi:10.1073/pnas.0914612107
 74. Caballero-George C, Sorkalla T, Jakobs D, et al. Fluorescence correlation spectroscopy in drug discovery: Study of Alexa532-endothelin 1 binding to the endothelin ETA receptor to describe the pharmacological profile of natural products. *Sci World J.* 2012;2012:1-7. doi:10.1100/2012/524169

75. Rose RH, Briddon SJ, Hill SJ. A novel fluorescent histamine H₁ receptor antagonist demonstrates the advantage of using fluorescence correlation spectroscopy to study the binding of lipophilic ligands. *Br J Pharmacol*. 2012;165(6):1789-1800. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01640.x
76. Nguyen TA, Sarkar P, Veetil J V., Koushik S V., Vogel SS. Fluorescence polarization and fluctuation analysis monitors subunit proximity, stoichiometry, and protein complex hydrodynamics. *PLoS One*. 2012;7(5). doi:10.1371/journal.pone.0038209
77. Shivaraju M, Unruh JR, Slaughter BD, Mattingly M, Berman J, Gerton JL. Cell-cycle-coupled structural oscillation of centromeric nucleosomes in yeast. *Cell*. 2012;150(2):304-316. doi:10.1016/j.cell.2012.05.034
78. Hayakawa EH, Furutani M, Matsuoka R, Takakuwa Y. Comparison of protein behavior between wild-type and G601S hERG in living cells by fluorescence correlation spectroscopy. *J Physiol Sci*. 2011;61(4):313-319. doi:10.1007/s12576-011-0150-2
79. Mourão MA, Hakim JB, Schnell S. Connecting the dots: The effects of macromolecular crowding on cell physiology. *Biophys J*. 2014;107(12):2761-2766. doi:10.1016/j.bpj.2014.10.051
80. Ellis RJ. Macromolecular crowding: Obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(10):597-604. doi:10.1016/S0968-0004(01)01938-7
81. Kwapiszewska K, Szczepański K, Kalwarczyk T, et al. Nanoscale Viscosity of Cytoplasm Is Conserved in Human Cell Lines. *J Phys Chem Lett*. 2020;11(16):6914-6920. doi:10.1021/acs.jpclett.0c01748
82. Bubak G, Kwapiszewska K, Kalwarczyk T, et al. Quantifying Nanoscale Viscosity and Structures of Living Cells Nucleus from Mobility Measurements. *J Phys Chem Lett*. 2021;12(1):294-301. doi:10.1021/acs.jpclett.0c03052
83. Liang L, Wang X, Xing D, Chen T, Chen WR. Noninvasive determination of cell nucleoplasmic viscosity by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2009;14(2):024013. doi:10.1117/1.3088141
84. Erdel F, Baum M, Rippe K. The viscoelastic properties of chromatin and the nucleoplasm revealed by scale-dependent protein mobility. *J Phys Condens Matter*. 2015;27(6):64115. doi:10.1088/0953-8984/27/6/064115
85. Hertzog M, Erdel F. The Material Properties of the Cell Nucleus: A Matter of Scale. *Cells*. 2023;12(15). doi:10.3390/cells12151958
86. Stamenović D. Rheological behavior of mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(22):3592-3605. doi:10.1007/s00018-008-8292-y
87. Molines AT, Garner RM, Chang F, Theriot J. Nanorheology reveals intra- and inter-cellular heterogeneity in cytoplasm viscosity. *Biophys J*. 2022;121(3):121a. doi:10.1016/j.bpj.2021.11.2091
88. Kalwarczyk T, Kwapiszewska K, Szczepanski K, et al. Apparent Anomalous Diffusion in the Cytoplasm of Human Cells: The Effect of Probes' Polydispersity. *J Phys Chem B*. 2017;121(42):9831-9837. doi:10.1021/acs.jpcb.7b07158
89. Kalwarczyk T, Ziębacz N, Bielejewska A, et al. Comparative Analysis of Viscosity of Complex Liquids and Cytoplasm. *Nano Lett*. 2011;11(5):2157-2163.

90. Kalwarczyk T, Sozanski K, Ochab-Marcinek A, et al. Motion of nanoprobe in complex liquids within the framework of the length-scale dependent viscosity model. *Adv Colloid Interface Sci.* 2015;223:55-63. doi:10.1016/j.cis.2015.06.007
91. Kwapiszewska K, Kalwarczyk T, Michalska B, et al. Determination of oligomerization state of Drp1 protein in living cells at nanomolar concentrations. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-019-42418-0
92. Barber MA. A Technic for the Inoculation of Bacteria and Other Substances into Living Cells. *J Infect Dis.* 1911;8(3):348-360. <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/8.3.348>
93. Stewart MP, Langer R, Jensen KF. Intracellular delivery by membrane disruption: Mechanisms, strategies, and concepts. *Chem Rev.* 2018;118(16):7409-7531. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00678
94. Uchida M, Li XW, Mertens P, Alpar HO. Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(8):754-764. doi:10.1016/j.bbagen.2009.05.013
95. Zhang D, Das DB, Rielly CD. Potential of microneedle-assisted micro-particle delivery by gene guns: A review. *Drug Deliv.* 2014;21(8):571-587. doi:10.3109/10717544.2013.864345
96. McKnight TE, Melechko A V., Hensley DK, Mann DGJ, Griffin GD, Simpson ML. Tracking gene expression after DNA delivery using spatially indexed nanofiber arrays. *Nano Lett.* 2004;4(7):1213-1219. doi:10.1021/nl049504b
97. Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Intracellular delivery of quantum dots for live cell labeling and organelle tracking. *Adv Mater.* 2004;16(12):961-966. doi:10.1002/adma.200306111
98. Stapulionis R. Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 1999;48(1):249-254. doi:10.1016/S0302-4598(98)00206-2
99. Gabriel B, Teissie J. Generation of reactive-oxygen species induced by electroporation of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability. *Eur J Biochem.* 1994;223(1):25-33. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18962.x
100. Vatteroni L, Piras A, Simi S, et al. Analysis of electroporation-induced genetic damages in V79/AP4 Chinese hamster cells. *Mutat Res Mutagen Relat Subj.* 1993;291(3):163-169. doi:10.1016/0165-1161(93)90156-T
101. Meaking WS, Edgerton J, Wharton CW, Meldrum RA. Electroporation-induced damage in mammalian cell DNA. *BBA - Gene Struct Expr.* 1995;1264(3):357-362. doi:10.1016/0167-4781(95)00177-8
102. Okada CY, Rechsteiner M. Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytotic vesicles. *Cell.* 1982;29(1):33-41. doi:10.1016/0092-8674(82)90087-3
103. Karpińska A, Zgorzelska A, Kwapiszewska K, Hołyst R. Entanglement of polymer chains in hypertonic medium enhances the delivery of DNA and other biomacromolecules into cells. *J Colloid Interface Sci.* 2022;627:270-282. doi:10.1016/j.jcis.2022.07.040

104. Chadha R, Kalminskii G, Tierney AJ, et al. Effect of Loading Method on a Peptide Substrate Reporter in Intact Cells. *Anal Chem.* 2018;90(19):11344-11350. doi:10.1021/acs.analchem.8b02111
105. Aoki M, Ishii T, Kanaoka M, Kimura T. RNA interference in immune cells by use of osmotic delivery of siRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(2):326-333. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.191
106. Kleczewska N, Sikorski PJ, Warminska Z, et al. Cellular delivery of dinucleotides by conjugation with small molecules: targeting translation initiation for anticancer applications. *Chem Sci.* 2021;12(30):10242-10251. doi:10.1039/d1sc02143e
107. Braniewska A, Skorzynski M, Sas Z, et al. A novel process for transcellular hemoglobin transport from macrophages to cancer cells. *Cell Commun Signal.* 2024;22(1):570. doi:10.1186/s12964-024-01929-8
108. Pilz M, Kwapiszewska K, Kalwarczyk T, Bubak G, Nowis D, Hołyst R. Transport of nanoprobe in multicellular spheroids. *Nanoscale.* 2020;12(38):19880-19887. doi:10.1039/d0nr01986k
109. Zhou Y, Bielec K, Pasitsuparoad P, Hołyst R. Single-molecule brightness analysis for the determination of anticancer drug interactions with DNA. *Analyst.* 2020;145:6600-6606. doi:10.1039/d0an01108h
110. Bielec K, Bubak G, Kalwarczyk T, Hołyst R. Analysis of Brightness of a Single Fluorophore for Quantitative Characterization of Biochemical Reactions. *J Phys Chem B.* 2020;124(10):1941-1948. doi:10.1021/acs.jpcc.0c00770
111. Li J, Turesson M, Haglund CA, Cabane B, Skepö M. Equation of state of PEG/PEO in good solvent. Comparison between a one-parameter EOS and experiments. *Polymer (Guildf).* 2015;56:205-213. doi:10.1016/j.polymer.2015.10.056
112. Rad S, Gao J, Meiselman HJ, Baskurt OK, Neu B. Depletion of high molecular weight dextran from the red cell surface measured by particle electrophoresis. *Electrophoresis.* 2009;30(3):450-456. doi:10.1002/elps.200800318
113. Karpńska A, Pilz M, Buczkowska J, et al. Quantitative analysis of biochemical processes in living cells at a single-molecule level: A case of olaparib-PARP1 (DNA repair protein) interactions. *Analyst.* 2021;146(23):7131-7143. doi:10.1039/d1an01769a
114. Wright PK, Jones SB, Arden N, et al. 17 β -estradiol regulates giant vesicle formation via estrogen receptor- α in human breast cancer cells. *Oncotarget.* 2014;5(10):3055-3065.
115. Vizio D Di, Morello M, Dudley AC, et al. Large Oncosomes in Human Prostate Cancer Tissues and in the Circulation of Mice with Metastatic Disease. *Am J Pathol.* 2012;181(5):1573-1584. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.030
116. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):619-624. doi:10.1038/ncb1725
117. Minciacchi VR, You S, Spinelli C, et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget.* 2015;6(13):11327-11341.

118. Johanson G. Modeling of Disposition. In: *Comprehensive Toxicology: Second Edition*. Vol 1-14. ; 2010:153-177. doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.00108-1
119. Keung MY, Wu Y, Badar F, Vadgama J V. Response of Breast Cancer Cells to PARP Inhibitors Is Independent of BRCA Status. *J Clin Med*. 2020;9(4):940. doi:10.3390/jcm9040940
120. Kukolj E, Kaufmann T, Dick AE, Zeillinger R, Gerlich DW, Slade D. PARP inhibition causes premature loss of cohesion in cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(61):103931-103951. doi:10.1101/153932
121. Borodavka A, Singaram SW, Stockley PG, Gelbart WM, Ben-Shaul A, Tuma R. Sizes of Long RNA Molecules Are Determined by the Branching Patterns of Their Secondary Structures. *Biophys J*. 2016;111(10):2077-2085. doi:10.1016/j.bpj.2016.10.014
122. Hopkins TA, Shi Y, Rodriguez LE, et al. Mechanistic dissection of PARP1 trapping and the impact on in vivo tolerability and efficacy of PARP inhibitors. *Mol Cancer Res*. 2015;13(11):1465-1477. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0191-T
123. Molenaar C, Abdulle A, Gena A, Tanke HJ, Dirks RW. Poly(A)+ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells. *J Cell Biol*. 2004;165(2):191-202. doi:10.1083/jcb.200310139
124. Katz ZB, English BP, Lionnet T, et al. Mapping translation “hot-spots” in live cells by tracking single molecules of mRNA and ribosomes. *Elife*. 2016;5:1-16. doi:10.7554/elife.10415
125. Domagala P, Huzarski T, Lubinski J, Gugala K, Domagala W. PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: Possible implications for PARP-1 inhibitor therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(3):861-869. doi:10.1007/s10549-011-1441-2
126. Donizy P, Pietrzyk G, Halon A, et al. Nuclear-cytoplasmic PARP-1 expression as an unfavorable prognostic marker in lymph node-negative early breast cancer: 15-year follow-up. *Oncol Rep*. 2014;31(4):1777-1787. doi:10.3892/or.2014.3024
127. Von Minckwitz G, Müller BM, Loibl S, et al. Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2150-2157. doi:10.1200/JCO.2010.31.9079
128. ProteomicDB powered by SAP HANA.
129. Gilabert M, Launay S, Ginestier C, et al. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP1) overexpression in human breast cancer stem cells and resistance to olaparib. *PLoS One*. 2014;9(8):6-11. doi:10.1371/journal.pone.0104302
130. Colicchia V, Petroni M, Guarguaglini G, et al. PARP inhibitors enhance replication stress and cause mitotic catastrophe in MYCN-dependent neuroblastoma. *Oncogene*. 2017;36(33):4682-4691. doi:10.1038/onc.2017.40
131. Rojo F, García-Parra J, Zazo S, et al. Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer. *Ann Oncol*. 2012;23(5):1156-1164. doi:10.1093/annonc/mdr361

132. Karpinska A, Magiera G, Kwapiszewska K, Hołyst R. Cellular Uptake of Bevacizumab in Cervical and Breast Cancer Cells Revealed by Single-Molecule Spectroscopy. *J Phys Chem Lett.* 2023;14(5):1272-1278. doi:10.1021/acs.jpcclett.2c03590
133. Deissler HL, Lang GK, Lang GE. Internalization of bevacizumab by retinal endothelial cells and its intracellular fate: Evidence for an involvement of the neonatal Fc receptor. *Exp Eye Res.* 2016;143:49-59. doi:10.1016/j.exer.2015.10.007
134. Borchers L, Roider J, Klettner A. Differences in Uptake and Intracellular Fate between Bevacizumab and Aflibercept after Repetitive Long-Term Treatment in the Retinal Pigment Epithelium. *Ophthalmic Res.* 2021;64(3):369-388. doi:10.1159/000511960
135. Emlet DR, Brown KA, Kociban DL, et al. Response to trastuzumab, erlotinib, and bevacizumab, alone and in combination, is correlated with the level of human epidermal growth factor receptor-2 expression in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(10):2664-2674. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0079
136. EL-Hajjar L, Jalaaliddine N, Shaito A, et al. Bevacizumab induces inflammation in MDA-MB-231 breast cancer cell line and in a mouse model. *Cell Signal.* 2019;53:400-412. doi:10.1016/j.cellsig.2018.11.007
137. Chang DP, Burra S, Day ES, et al. Long-Term Stability of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor (a-VEGF) Biologics Under Physiologically Relevant Conditions and Its Impact on the Development of Long-Acting Delivery Systems. *J Pharm Sci.* 2020;110(2):860-870. doi:10.1016/j.xphs.2020.09.043
138. PDB database. doi:10.2210/pdb6BFT/pdb
139. Ochab-Marcinek A, Hołyst R. Scale-dependent diffusion of spheres in solutions of flexible and rigid polymers: Mean square displacement and autocorrelation function for FCS and DLS measurements. *Soft Matter.* 2011;7(16):7366-7374. doi:10.1039/c1sm05217a
140. Miedema DM, Kushwaha VS, Denisov D V., et al. Correlation imaging reveals specific crowding dynamics of kinesin motor proteins. *Phys Rev X.* 2017;7(4):1-12. doi:10.1103/PhysRevX.7.041037
141. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. W.W. Norton & Co; 2002.
142. Hsu VW, Lee SY, Yang J-S. The evolving understanding of COPI vesicle formation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(5):360-364. doi:10.1038/nrm2663
143. Spang A. Retrograde traffic from the golgi to the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(a013391):1-10. doi:10.1101/cshperspect.a013391
144. Müller-Greven G, Carlin CR, Burgett ME, et al. Macropinocytosis of Bevacizumab by Glioblastoma Cells in the Perivascular Niche Affects their Survival. *Clin Cancer Res.* 2018;23(22):7059–7071. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0249
145. Choi D-K, Bae J, Shin S-M, Shin J-Y, Kim S, Kim Y-S. A general strategy for generating intact, full-length IgG antibodies that penetrate into the cytosol of living cells. *MAbs.* 2014;6(6):1402-1414. doi:10.4161/mabs.36389
146. Lu Y, Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54:675-693.

147. Irby D, Du C, Li F. Lipid-Drug Conjugate for Enhancing Drug Delivery. *Mol Pharm.* 2017;14(5):1325-1338. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b01027
148. Seitz JD, Vineberg JG, Herlihy E, Park B, Melief E, Ojima I. Design, Synthesis and Biological Evaluation of a Highly-Potent and Cancer Cell Selective Folate-Taxoid Conjugate. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(9):2187–2194. doi:10.1016/j.bmc.2015.02.057
149. Tu Z, Timashev P, Chen J, Liang X. Ferritin-based drug delivery system for tumor therapy. *BMEMat.* 2023;1(e12022):1-10. doi:10.1002/bmm2.12022
150. Huang Y-X, Wu Z-J, Huang B-T, Luo M. Pathway and mechanism of pH dependent human hemoglobin tetramer-dimer-monomer dissociations. *PLoS One.* 2013;8(11):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0081708
151. Hu Y-B, Dammer EB, Ren R-J, Wang G. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 2015;4(18):1-10. doi:10.1186/s40035-015-0041-1
152. Marie D, Vaulot D, Partensky F. Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(5):1649-1655. doi:10.1128/aem.62.5.1649-1655.1996
153. Netzel TL, Nafisi K, Zhao M, Lenhard JR, Johnson I. Base-Content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields, and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-Strand DNA: Photophysical Properties of Monomeric and Bichromophoric DNA Stains. *J Phys Chem.* 1995;99(51):17936-17947.
154. Fujisawa S, Romin Y, Barlas A, et al. Evaluation of YO-PRO-1 as an early marker of apoptosis following radiofrequency ablation of colon cancer liver metastases. *Cytotechnology.* 2014;66(2):259-273. doi:10.1007/s10616-013-9565-3
155. Magiera A, Kucharska K, Kalwarczyk T, Haniewicz P, Kwapiszewska K, Hołyst R. Measurement of large ribosomal subunit size in cytoplasm and nucleus of living human cells. *Nanoscale Horizons.* 2025;10:388-400. doi:10.1039/d4nh00214h
156. Thiebaut C, Eve L, Poulard C, Le Romancer M. Structure, activity, and function of prmt1. *Life.* 2021;11(11):1-23. doi:10.3390/life11111147
157. Liu H, Chen X, Wang P, et al. PRMT1-mediated PGK1 arginine methylation promotes colorectal cancer glycolysis and tumorigenesis. *Cell Death Dis.* 2024;15(2). doi:10.1038/s41419-024-06544-6
158. Ku B, Eisenbarth D, Baek S, et al. PRMT1 promotes pancreatic cancer development and resistance to chemotherapy. *Cell Reports Med.* 2024;5(3):101461. doi:10.1016/j.xcrm.2024.101461
159. Martinez S, Sentis S, Poulard C, Trédan O, Le Romancer M. Role of PRMT1 and PRMT5 in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2024;25(16). doi:10.3390/ijms25168854
160. Rossi V, Nielson SE, Ortolano A, et al. Oligomerization of protein arginine methyltransferase 1 and its effect on methyltransferase activity and substrate specificity. *Protein Sci.* 2024;33(8):1-18. doi:10.1002/pro.5118
161. Price OM, Thakur A, Ortolano A, et al. Naturally occurring cancer-associated mutations disrupt oligomerization and activity of protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1). *J Biol Chem.* 2021;297(5):101336. doi:10.1016/j.jbc.2021.101336

162. Flors C. Photoswitching of monomeric and dimeric DNA-intercalating cyanine dyes for super-resolution microscopy applications. *Photochem Photobiol Sci.* 2010;9(5):643-648. doi:10.1039/b9pp00119k
163. Oura M, Yamamoto J, Ishikawa H, Mikuni S, Fukushima R, Kinjo M. Polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy for studying structural properties of proteins in living cell. *Sci Rep.* 2016;6(August):1-7. doi:10.1038/srep31091
164. Aragón SR, Pecora R. Fluorescence correlation spectroscopy and Brownian rotational diffusion. *Biopolymers.* 1975;14(1):119-137. doi:10.1002/bip.1975.360140110
165. Jackson DA. The Cell Nucleus: Biogenesis, Structure, and Function. In: Robert A. Meyers, ed. *Meyers: Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Epigenetic Regulation and Epigenomics*. Second. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011. doi:10.1002/3527600906.mcb.200300097.pub2
166. Kirchner S, Ignatova Z. Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nat Rev Genet.* 2015;16(2):98-112. doi:10.1038/nrg3861
167. Chatterjee K, Nostramo RT, Wan Y, Hopper AK. tRNA dynamics between the nucleus, cytoplasm and mitochondrial surface: Location, location, location. *Biochim Biophys Acta.* 2018;1861(4):373-386. doi:10.1016/j.bbagr.2017.11.007.tRNA
168. Liang X, Zuo MQ, Zhang Y, et al. Structural snapshots of human pre-60S ribosomal particles before and after nuclear export. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-14. doi:10.1038/s41467-020-17237-x
169. Yoshikawa H, Larance M, Harney DJ, et al. Efficient analysis of mammalian polysomes in cells and tissues using ribo mega-SEC. *Elife.* 2018;7:1-26. doi:10.7554/eLife.36530
170. Nieuwenhuysen P, Clauwaert J. Physicochemical characterization of ribosomal particles from the eukaryote *Artemia*. *J Biol Chem.* 1981;256(18):9626-9632. doi:10.1016/s0021-9258(19)68808-3
171. Bowman JC, Petrov AS, Frenkel-Pinter M, Penev PI, Williams LD. Root of the Tree: The Significance, Evolution, and Origins of the Ribosome. *Chem Rev.* 2020;120(11):4848-4878. doi:10.1021/acs.chemrev.9b00742
172. Cooper G. *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates; 200AD.
173. Pestov DG, Shcherbik N. Rapid Cytoplasmic Turnover of Yeast Ribosomes in Response to Rapamycin Inhibition of TOR. *Mol Cell Biol.* 2012;32(11):2135-2144. doi:10.1128/mcb.06763-11
174. Burger K, Mühl B, Harasim T, et al. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem.* 2010;285(16):12416-12425. doi:10.1074/jbc.M109.074211
175. Ren M, Qiu S, Venglat P, et al. Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2011;155(3):1367-1382. doi:10.1104/pp.110.169045
176. Idziorek T, Estaquier J, De Bels F, Ameisen JC. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J Immunol Methods.* 1995;185(2):249-258. doi:10.1016/0022-1759(95)00172-7

177. Money NP. Osmotic Pressure of Aqueous Polyethylene Glycols. *Plant Physiol.* 1989;91(2):766-769. doi:10.1104/pp.91.2.766
178. Karpinska A, Zgorzelska A, Kwapiszewska K, Hołyst R. Entanglement of polymer chains in hypertonic medium enhances the delivery of DNA and other biomacromolecules into cells. *J Colloid Interface Sci.* 2022;627:270-282.
179. He M, Guo S, Li Z. In situ characterizing membrane lipid phenotype of breast cancer cells using mass spectrometry profiling. *Sci Rep.* 2015;5(11298):1-13. doi:10.1038/srep11298
180. Sakuta H, Fujimoto T, Yamana Y, Hoda Y, Tsumoto K, Yoshikawa K. Aqueous / Aqueous Micro Phase Separation : Construction of an Artificial Model of Cellular Assembly. *Front Chem.* 2019;7(44):1-7. doi:10.3389/fchem.2019.00044
181. Bielec K, Kowalski A, Bubak G, Witkowska Nery E, Hołyst R. Ion Complexation Explains Orders of Magnitude Changes in the Equilibrium Constant of Biochemical Reactions in Buffers Crowded by Nonionic Compounds. *J Phys Chem Lett.* 2022;13(1):112-117. doi:10.1021/acs.jpcllett.1c03596
182. Munro TR. Sucrose-induced vacuolation in living Chinese hamster fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1968;52(2-3):392-400. doi:10.1016/0014-4827(68)90480-1
183. Helip-Wooley A, Thoene JG. Sucrose-induced vacuolation results in increased expression of cholesterol biosynthesis and lysosomal genes. *Exp Cell Res.* 2004;292(1):89-100. doi:10.1016/j.yexcr.2003.09.003
184. Wiśniewska A, Sozański K, Kalwarczyk T, et al. Scaling of activation energy for macroscopic flow in poly(ethylene glycol) solutions: Entangled - Non-entangled crossover. *Polymer (Guildf).* 2014;55(18):4651-4657. doi:10.1016/j.polymer.2014.07.029
185. Karimi Z, Karimi L, Shokrollahi H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Mater Sci Eng C.* 2013;33(5):2465-2475. doi:10.1016/j.msec.2013.01.045
186. Bohrer MP, Patterson GD, Carroll PJ. Hindered Diffusion of Dextran and Ficoll in Microporous Membranes. *Macromolecules.* 1984;17(6):1170-1173. doi:10.1021/ma00136a011
187. Wang Y, Dubin PL. Observation of Ficoll charge using size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A.* 1998;800(2):181-185. doi:10.1016/S0021-9673(97)01125-4