

Opracowanie dwuanalitowych sond fluorescencyjnych do detekcji hipoksji w modelach komórkowych

Francesca Canyelles i Font, M.Sc

Streszczenie

Niniejsza praca dotyczy opracowania i charakterystyki sond fluorescencyjnych, które reagują na dwa związki chemiczne jednocześnie, przechodząc ze stanu wygaszonego do stanu fluorescencyjnego (odpowiedź w trybie włącz-wyłącz).

Celem tej pracy było stworzenie stabilnej fluorescencyjnej sondy dwuanalitowej do wizualizacji hipoksji w środowisku komórkowym. Cel ten został osiągnięty przez kompleksowe podejście począwszy od zaprojektowania sond, poprzez syntezę i charakteryzację, aż po walidację tych sond w systemach biologicznych. Zaprojektowanie sond zdolnych do wieloparametrowego wykrywania hipoksji wymagało starannego doboru rdzenia fluoroforu (barwnik hemicyjaninowy) oraz elementów odpowiedzialnych za reakcję na odpowiednie anality docelowe – pH oraz środowisko redukcyjne (aktywność nitroreduktazy) jako biomarkerów hipoksji.

Po fazie projektowej zsyntetyzowano, scharakteryzowano i pomyślnie zwalidowano nowy szkielet fluorescencyjny oparty na hemicyjaninie, **HCy-Jul**, który jest bardziej stabilny i odporny na niespecyficzne działanie środowiska biologicznego niż inne powszechnie stosowane hemicyjaniny. Następnie w oparciu o tę strukturę zsyntetyzowano dwie nowe sondy dwuanalitowe, **NHCy** i **NHCy-C**, scharakteryzowano je w celu potwierdzenia ich struktury i czystości oraz zbadano ich odpowiedź fotofizyczną na docelowe anality. Ostatecznie, opracowane sondy zostały zwalidowane *in vitro* i *in cellulo* w celu określenia ich wydajności, czułości, niezawodności i skuteczności działania w środowisku biologicznym.

Co istotne, sonda **NHCy** umożliwiła skuteczną detekcję hipoksji w komórkach poprzez odpowiedź fluorescencyjną typu "turn-on" na bioredukcję i niskie pH, dwa wyznaczniki hipoksji, jednak śladowa fluorescencja w stanie wyłączonym (powszechna dla większości sond typu "turn-on") ograniczała wiarygodność detekcji. Z drugiej strony, sonda **NHCy-C** wykazała odpowiedź typu „ratiometric” (zmiana stosunku intensywności fluorescencji w dwóch różnych długościach fali) na obecność obu analitów charakterystycznych dla hipoksji,

co pozwoliło na niezawodną detekcję hipoksji w komórkach za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i cytometrii przepływowej.

Koncepcje i metodologie (synteza, charakterystyka spektroskopowa, obrazowanie żywych komórek) opisane w niniejszej pracy umożliwiły opracowanie i walidację nowych sond fluorescencyjnych do niezawodnego, wieloparametrycznego wykrywania hipoksji w modelach komórek nowotworowych. Jest to znaczący postęp w dziedzinie obrazowania komórkowego, ponieważ dwuanalitowa detekcja z wykorzystaniem pojedynczej sondy pozwala na bardziej rozległe i kompleksowe monitorowanie procesów biologicznych zachodzących w komórkach. Ta wiedza jest kluczowa dla lepszego zrozumienia chorób, odkrywania nowych funkcjonalnych biomarkerów i celów molekularnych dla leków oraz walidacji nowych terapii.

Słowa kluczowe: responsywne sondy fluorescencyjne · dwuanalitowe · barwnik hemicyjaninowy · hipoksja · pH · aktywność nitroreduktazy · nowotwór