



POLITECHNIKA RZESZOWSKA
im. Ignacego Łukasiewicza
WYDZIAŁ CHEMICZNY
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki



PRACA DOKTORSKA

NOWE KOMPLEKSY 3-HYDROKSYFLAWONU Z JONAMI METALI,
ICH CHARAKTERYSTYKA I WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE

mgr inż. Anna Miłoś

Promotor:
dr hab. Aleksandra Bocian, prof. PRz

Promotor pomocniczy:
dr Ewa Ciszkowicz

Rzeszów, 2026

*Chciałabym serdecznie podziękować
Pani Promotor, dr hab. Aleksandra Bocian, prof. PRz,
za opiekę naukową oraz cenne wskazówki,
które miały istotny wpływ na realizację niniejszej pracy.*

*Szczególnie wdzięczna jestem
Pani Promotor Pomocniczej, dr Ewie Ciszkowicz,
za nieocenione wsparcie, zaangażowanie oraz pomoc
na każdym etapie prowadzonych badań.*

*Dziękuję również wszystkim osobom, z którymi miałam
przyjemność współpracować w trakcie realizacji badań,
w szczególności **Pani dr Elżbiecie Woźnickiej**
za bezcenną pomoc w analizie wyników oraz okazaną życzliwość,
a także **Pani mgr Katarzynie Leckiej-Szlachcie**
za wsparcie w pracy laboratoryjnej.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję przede wszystkim do
moich Najbliższych
za cierpliwość, wyrozumiałość i ogromne wsparcie emocjonalne,
które towarzyszyło mi w trakcie powstawania tej pracy.*

Spis treści

Wykaz skrótów	5
Wstęp	7
1 Przegląd literatury	9
1.1 Flawonoidy – struktura, klasyfikacja i aktywność biologiczna	9
1.2 3-hydroksyflawon	16
1.2.1 Aktywność biologiczna 3-hydroksyflawonu i jego pochodnych	17
1.2.2 Modyfikacja właściwości flawonoidów po kompleksowaniu z jonami metali	19
1.2.3 Kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami metali	22
1.3 Mechanizmy śmierci komórkowej	25
1.3.1 Apoptoza	26
1.3.2 Nekroza	29
1.3.3 Nekroza wtórna	29
1.3.4 Nekroptoza	30
1.3.5 Autofagia	30
1.4 Nowotwory jako problem kliniczny	31
1.4.1 Ogólne informacje o nowotworach	31
1.4.2 Rak prostaty	32
1.4.3 Charakterystyka wybranych linii komórkowych	33
1.5 Problem narastającej oporności bakterii	36
1.6 Metody stosowane w charakterystyce związków oraz ocenie ich aktywności biologicznej	38
1.6.1 Metody charakterystyki strukturalnej	38
1.6.2 Wybrane metody badania aktywności przeciwutleniającej	42
1.6.3 Wybrane metody badania aktywności przeciwbakteryjnej	43
1.6.4 Wybrane metody badania cytotoksyczności	44
2 Cel i zakres pracy	46
3 Część doświadczalna	47
3.1 Wykaz stosowanych odczynników	47
3.2 Aparatura	48
3.3 Materiał biologiczny	49
3.4 Metody badawcze	50
3.4.1 Synteza kompleksów jonów metali z flawonoidami	50
3.4.2 Charakterystyka uzyskanych kompleksów	51
3.4.3 Badanie właściwości przeciwutleniających	54
3.4.4 Badanie właściwości przeciwbakteryjnych	55

3.4.4.1	Minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC).....	55
3.4.5	Badanie aktywności cytotoksycznej kompleksów	57
3.4.5.1	Prowadzenie hodowli linii komórkowych	58
3.4.5.2	Testy cytotoksyczności	60
3.4.5.3	Ocena kinetyki wzrostu komórek po usunięciu związków	62
3.4.5.4	Test <i>ApoTox-GloTM Triplex Assay</i>	63
3.4.5.5	Test <i>RealTime-GloTM Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay</i>	64
4	Analiza i dyskusja wyników.....	68
4.1	Charakterystyka kompleksów	69
4.1.1	Skład pierwiastkowy uzyskanych kompleksów	70
4.1.2	Analiza termiczna.....	71
4.1.3	Spektroskopia UV-Vis	76
4.1.4	Spektroskopia fluorescencyjna.....	77
4.1.5	Spektroskopia w podczerwieni.....	81
4.1.6	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego	86
4.1.7	Spektrometria mas.....	88
4.2	Badanie właściwości przeciwutleniających	92
4.3	Badanie właściwości przeciwbakteryjnych.....	95
4.4	Badanie cytotoksyczności związków	100
4.4.1	Wyniki testu z czerwiecią obojętną	100
4.4.2	Ocena kinetyki wzrostu komórek po usunięciu związków	107
4.4.3	Wyniki testu <i>ApoTox-GloTM Triplex Assay</i>	109
4.4.4	Wyniki testu <i>RealTime-GloTM Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay</i>	112
5	Podsumowanie.....	116
6	Spis tabel	118
7	Spis rysunków	118
8	Literatura	121
	Streszczenie.....	152
	Abstract.....	154
	Wykaz dorobku naukowego.....	155

Wykaz skrótów

3HF – 3-hydroksyflawon

Co(II)-3HF – kompleks 3-hydroksyflawonu z jonami kobaltu(II)

DMEM – zmodyfikowane podłoże Dulbecco Eagle'a (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMSO – dimetylosulfotlenek

DPBS – bufor fosforanowy Dulbecco (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*)

DPPH• – rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowy

DSC – różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. *differential scanning calorimetry*)

EDTA – kwas wersenowy

EMEM – minimalne podłoże podstawowe Eagle'a (ang. *Eagle's Minimum Essential Medium*)

ESIPT – wewnątrzcząsteczkowy transfer protonu w stanie wzbudzonym (ang. *excited-state intramolecular proton transfer*)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

FT-IR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier transformed infrared spectroscopy*)

IC₅₀ – stężenie powodujące zahamowanie w 50% (ang. *half-maximal inhibitory concentration*)

MBC – minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. *minimum bactericidal concentration*)

MHA – podłoże agarowe Mueller-Hinton (ang. *Mueller-Hinton Agar*)

MHB – płynne podłoże Mueller-Hinton (ang. *Mueller-Hinton Broth*)

MIC – minimalne stężenie hamujące (ang. *minimum inhibitory concentration*)

Mn(II)-3HF – kompleks 3-hydroksyflawonu z jonami manganu(II)

Na₂EDTA – wersenian disodowy

NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*)

NR – test wychwytu czerwieni obojętnej (ang. *neutral red uptake assay*)

PS – fosfatydyloseryna (ang. *phosphatidylserine*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

TGA – termograwimetria (ang. *thermogravimetric analysis*)

UV-Vis – spektroskopia w zakresie ultrafioletu i światła widzialnego (ang. *ultraviolet-visible spectroscopy*)

Zn(II)-3HF – kompleks 3-hydroksyflawonu z jonami cynku(II)

Wstęp

Flawonoidy stanowią jedną z najliczniejszych i najbardziej zróżnicowanych grup naturalnych związków polifenolowych, szeroko rozpowszechnionych w świecie roślin. Ich znaczenie biologiczne wynika zarówno z pełnionych funkcji fizjologicznych, jak i z udokumentowanego wpływu na organizmy zwierzęce i ludzkie. Jako metabolity wtórne, związki te uczestniczą w regulacji wzrostu i rozwoju roślin, a także w ochronie komórek roślinnych przed stresem oksydacyjnym, promieniowaniem UV oraz czynnikami patogennymi. Odpowiadają również za nadanie roślinom barwy i smaku. Z uwagi na dowiedzione działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i przeciwbakteryjne stanowią one obiecujący punkt wyjścia w projektowaniu nowych strategii terapeutycznych.

Szczególne miejsce w tej grupie zajmują flawonole, których struktura chemiczna sprzyja wysokiej reaktywności oraz zdolności do oddziaływań z biomolekułami. Jednym z najprostszych przedstawicieli tej klasy jest 3-hydroksyflawon (3HF), który stanowi podstawową jednostkę strukturalną wielu flawonoli występujących w naturze. Obecność grupy hydroksylowej w pozycji C3 oraz karbonylowej w pozycji C4 nadaje tej cząsteczce zdolność do chelatowania jonów metali, a także wpływa na jej właściwości spektroskopowe. Dzięki tym cechom 3HF jest interesującym ligandem w chemii koordynacyjnej oraz związkiem o potencjale biologicznym.

Z licznych doniesień wynika, że 3-hydroksyflawon wykazuje wielokierunkową aktywność biologiczną. W szczególności podkreśla się jego właściwości cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych, związane z indukcją apoptozy, modulacją cyklu komórkowego oraz wpływem na kluczowe szlaki sygnałowe regulujące przeżycie komórek. Ponadto związek ten wykazuje zdolność do hamowania produkcji reaktywnych form tlenu, co wskazuje na jego potencjał przeciwutleniający.

Jednym z intensywnie rozwijanych kierunków badań jest modyfikacja właściwości flawonoidów poprzez kompleksowanie z jonami metali. Obecność donorowych atomów tlenu w ich strukturze umożliwia tworzenie związków koordynacyjnych, których właściwości fizykochemiczne i biologiczne mogą różnić się istotnie od właściwości wolnych ligandów. W wielu przypadkach wykazano, że kompleksowanie prowadzi do poprawy biodostępności oraz wzmocnienia aktywności biologicznej. Szczególne znaczenie mają w tym kontekście jony metali biologicznie istotnych, takich jak kobalt,

mangan i cynk. Pierwiastki te uczestniczą w licznych procesach enzymatycznych i regulacyjnych, a ich homeostaza jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Choć liczba badań nad kompleksami flawonoidów stale rośnie, w literaturze nadal widoczny jest niedobór danych dotyczących kompleksów 3-hydroksyflawonu z wybranymi jonami metali (w szczególności kobaltu, manganu i cynku), zwłaszcza w kontekście ich kompleksowej charakterystyki biologicznej. Dostępne prace koncentrują się głównie na aspektach strukturalnych i teoretycznych analizach układów powstających w roztworach, pomijając szczegółową ocenę aktywności biologicznej *in vitro*.

Pomimo znaczącego postępu w zakresie diagnostyki i terapii, choroby nowotworowe oraz infekcje bakteryjne pozostają jednymi z wiodących wyzwań współczesnej medycyny. Głównymi barierami w skuteczności leczenia pozostają: wysoka toksyczność stosowanych leków, postępująca lekooporność mikroorganizmów oraz niewystarczająca selektywność działania, co skłania do poszukiwania nowych związków o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym. Istotnym przykładem jest rak gruczołu krokowego, który w zaawansowanym stadium wykazuje oporność na standardowe metody leczenia. Mając na uwadze powyższe przesłanki oraz niedostatek danych literaturowych, uzasadnione wydaje się zbadanie właściwości biologicznych nowych kompleksów 3-hydroksyflawonu z wybranymi jonami metali. Weryfikacja ich potencjału, opierająca się na ocenie aktywności przeciwbakteryjnej, badaniu profilu cytotoksycznego oraz określeniu ogólnego typu indukowanej śmierci komórkowej, pozwala na wstępną charakterystykę tych związków i ocenę ich przydatności w dalszych badaniach.

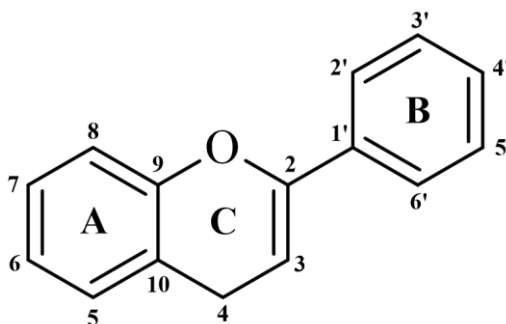
1 Przegląd literatury

1.1 Flawonoidy – struktura, klasyfikacja i aktywność biologiczna

Flawonoidy to bardzo obszerna i zróżnicowana grupa związków polifenolowych, będących metabolitami wtórnymi roślin. Obecnie zidentyfikowano ponad 10 tysięcy różnych flawonoidów, a wraz z rozwojem technik izolacyjnych i analitycznych ich liczba stale rośnie [1]. Są szeroko rozpowszechnione w świecie roślin, ich bogatym źródłem w diecie są warzywa, zioła oraz produkty zbożowe. Występują również w niektórych napojach, takich jak herbata czy czerwone wino. Proces ich syntezy i gromadzenie zachodzą w różnych organach roślinnych, m.in w owocach, kwiatach, liściach czy nasionach [2,3].

Flawonoidy pełnią w roślinach szereg istotnych funkcji. Odpowiadają między innymi za nadanie barwy kwiatom i owocom, co ma kluczowe znaczenie w procesie zapylania i rozprzestrzeniania nasion. Mogą również nadawać smak i zapach, co ma na celu zarówno przyciąganie zapylaczy, jak i odstraszenie drapieżników. Pełnią także funkcję fungicydów i insektycydów [4]. Uczestniczą w regulacji wzrostu i rozwoju roślin, biorąc udział m.in. w modulacji transportu auksyn. W warunkach stresu środowiskowego (takich jak susza, niekorzystna temperatura czy promieniowanie UV) następuje zwiększona akumulacja flawonoidów, które wykazują zdolność do wychwytywania reaktywnych form tlenu, chroniąc komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [5,6]. Dzięki dużej różnorodności strukturalnej mogą wiązać się z wieloma biomolekułami, a także wpływać na funkcjonowanie licznych szlaków enzymatycznych [7].

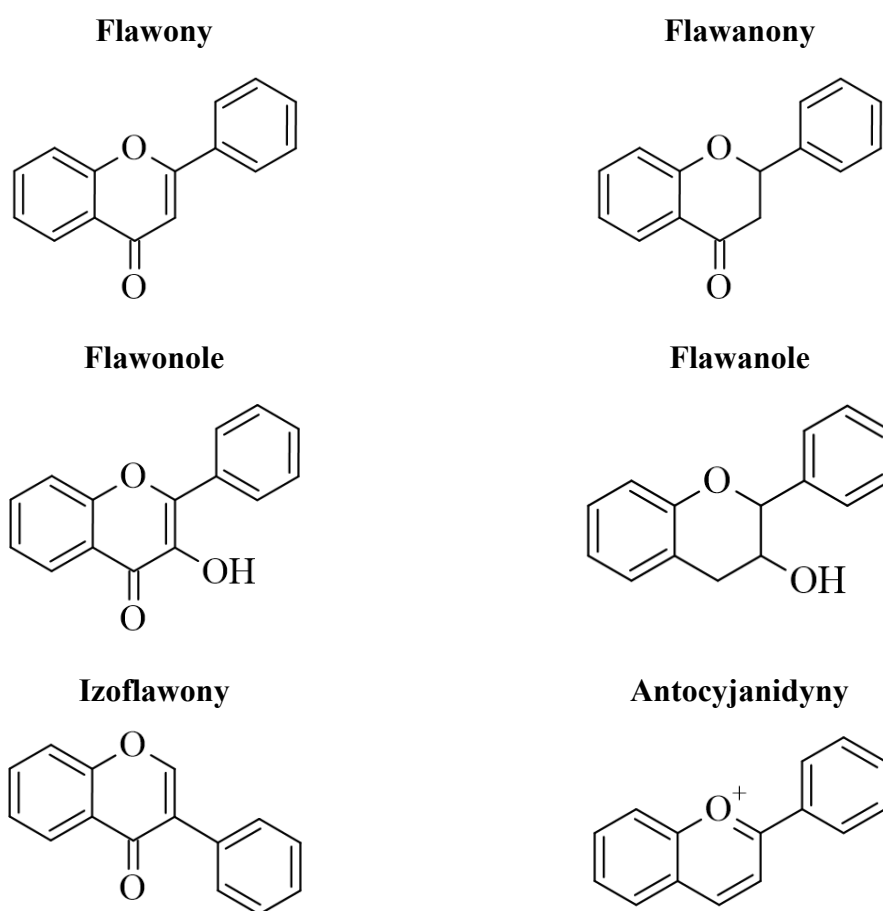
Podstawą budowy flawonoidów jest szkielet węglowy C₆–C₃–C₆, złożony z dwóch pierścieni aromatycznych (oznaczanych jako pierścienie A i B), połączonych trzema atomami węgla, tworzącymi heterocykliczny pierścień C (Rys. 1) [1].



Rys. 1. Podstawowy szkielet węglowy flawonoidów (2-fenylochromen) wraz z numeracją atomów węgla i oznaczeniem pierścieni. Opracowanie własne w programie ChemSketch 2024.2.0 w oparciu o [8].

Zróźnicowanie strukturalne flawonoidów wynika przede wszystkim z liczby i położenia podstawników, stopnia utlenienia pierścienia C oraz obecności reszt cukrowych. Większość flawonoidów występuje w naturze w postaci glikozydów, co wpływa na ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne, w tym zwiększa ich rozpuszczalność i stabilność, ale jednocześnie może ograniczać ich bezpośrednią aktywność biologiczną w porównaniu z aglikonami [9]. Flawonoidy są syntezowane w roślinach w szlaku fenylopropanoidowym. Ich bioprekursorem jest aminokwas L-fenylalanina, który pod wpływem enzymu amoniakolizy fenyloalaninowej ulega przekształceniu do 4-kumaroilo-CoA. Częsteczka ta ulega następnie kondensacji z trzema cząsteczkami malonylo-CoA, co prowadzi do powstania chalkonu, stanowiącego prekursor wielu flawonoidów [10].

Ze względu na rodzaj i położenie podstawników, flawonoidy można podzielić na sześć głównych klas, w tym flawony, flawanony, flawonole, flawanole, izoflawony oraz antocyjanidyny (Rys. 2).



Rys. 2. Główne klasy flawonoidów, opracowanie własne w programie ChemSketch 2024.2.0 w oparciu o [3].

Flawony posiadają układ 2-fenylchromen-4-onu i charakteryzują się obecnością podwójnego wiązania C2=C3 oraz grupy karbonylowej przy węglu C4 w pierścieniu C. Występują najczęściej w postaci 7-*O*-glikozydów, a znaleźć je można głównie w liściach, kwiatach i owocach wielu roślin, takich jak seler, pietruszka i czerwona papryka. Do tej klasy należą m.in. apigenina i luteolina [11]. Flawanony różnią się od flawonów brakiem podwójnego wiązania w pierścieniu C, który ma układ nasycony. Występują głównie w owocach cytrusowych, a do przedstawicieli tej klasy zalicza się m.in. naringeninę i hesperetinę [12]. Flawonole są pochodnymi flawonów, zawierają dodatkową grupę hydroksylową w pozycji C3. Obecność jednocześnie podwójnego wiązania, grupy karbonylowej oraz grupy hydroksylowej zwiększa ich reaktywność i potencjał antyoksydacyjny, przez co klasa ta jest najczęściej analizowana pod kątem aktywności biologicznej i właściwości przeciwutleniających. Są szeroko rozpowszechnione w owocach i warzywach, przedstawicielami tej klasy są m.in. kwercetyna i kemferol [3,12]. Flawanole, określane również jako katechiny, różnią się od pozostałych klas brakiem podwójnego wiązania w pierścieniu C, a także grupy karbonylowej przy węglu C4. Pierścień C często podstawiony jest wieloma grupami hydroksylowymi, co wpływa na silne właściwości antyoksydacyjne. Do tej grupy zaliczyć można na przykład katechinę i epikatechinę, występujące m.in. w herbacie i kakao [3,13]. Izoflawony wyróżniają się spośród innych klas odmiennym położeniem pierścienia B, który przyłączony jest do atomu węgla C3 pierścienia C. Powszechnie gromadzą się w roślinach strączkowych, a ich głównymi źródłami są soja i produkty sojowe, lucerna i ciecierzycy. Izoflawony wykazują silne działanie estrogenne, mogą przyczyniać się do zachowania równowagi hormonalnej u kobiet. Do najlepiej poznanych należą genisteina i daidzeina [1,14]. Ostatnią z głównych klas są antocyjanidyny, związki fitochemiczne w formie aglikonów, odpowiedzialne za fioletowe, czerwone i niebieskie zabarwienie owoców i kwiatów. Ich struktura charakteryzuje się obecnością kationu flawyliowego o silnie sprzężonym układzie elektronowym, a obecność ładunku odróżnia je od innych klas flawonoidów. W naturze związki te najczęściej występują w postaci glikozydów, określanymi jako antocyjany. Jest to bardzo zróżnicowana grupa, do tej pory zidentyfikowano ponad 650 związków. Przedstawicielami tej klasy są cyjanidyna oraz delfinidyna, stosowane m.in. jako barwniki do żywności [1,14].

W ostatnich latach stale rośnie zainteresowanie związkami flawonoidowymi, co związane jest z ich szerokim spektrum aktywności biologicznej. Liczne badania wskazują, że flawonoidy wykazują istotne działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, antimutagenne, przeciwnowotworowe oraz przeciwbakteryjne, a dzięki ich obecności w diecie maleje ryzyko wystąpienia chorób przewlekłych, w tym chorób układu krążenia, neurodegeneracyjnych oraz schorzeń związanych ze stanem zapalnym [15,16].

Antyoksydanty pełnią istotną rolę w utrzymaniu homeostazy redoks organizmu, chroniąc komórki przed wyniszczającym działaniem reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Nadmierna produkcja tych cząsteczek skutkuje uszkodzeniem DNA, białek oraz lipidów, co prowadzi między innymi do rozwoju procesów zapalnych, mutagenezy i chorób cywilizacyjnych [17]. Mechanizm działania przeciwutleniaczy polega w głównej mierze na neutralizacji wolnych rodników poprzez przekazanie elektronu lub atomu wodoru. Prowadzi to do stabilizacji ROS i przerwania reakcji utleniania. Zdolność flawonoidów do wygaszania reaktywnych form tlenu związana jest z obecnością sprzężonych wiązań podwójnych, grup hydroksylowych, a także grupy karbonylowej w pozycji C4, które umożliwiają delokalizowanie wolnego elektronu [15,17]. Wykazano, że liczba i położenie podstawników mają istotny wpływ na potencjał przeciwutleniający. Obecność dodatkowych grup hydroksylowych oraz brak glikozydacji w pozycji C3 zwiększają aktywność antyoksydacyjną, przy czym szczególnie korzystne jest położenie podstawników w pozycji *orto* [18]. Aktywność przeciwutleniająca związków flawonoidowych potwierdzana jest zarówno w testach chemicznych (na przykład testem z użyciem rodnika 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazylowego DPPH^{*}), jak i w modelach komórkowych. Ekstrakty z werbezyny (*Verbesina sphaerocephala*), bogate w związki fenolowe i flawonoidy, w których zidentyfikowano m.in. rutynę, wykazały zdolność do wymiatania wolnych rodników i zwiększania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego [19], a ekstrakty z liści liliowca rdzawego (*Hemerocallis fulva*), w których składzie wykazano obecność m.in. rutyny, izokwercetyny oraz katechiny, dodatkowo zmniejszały poziom ROS w modelach stresu oksydacyjnego indukowanego H₂O₂ w komórkach HaCaT, jednocześnie nie wykazując cytotoksyczności [20]. W badaniach *in vivo* zauważono obniżenie poziomu dialdehydu malonowego i tlenku azotu, będących markerami stresu oksydacyjnego, a także wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, m.in. dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, co wskazuje na ochronne

działanie flawonoidów epikatechiny, epigalokatechiny, procyjanidyny B2, kwercetyny, taksyfoliny oraz rutyny w warunkach stresu oksydacyjnego [18].

Stan zapalny jest złożoną reakcją organizmu wobec działania czynników chemicznych, fizycznych lub biologicznych. Po rozpoznaniu obcego bodźca przez komórki układu odpornościowego następuje uruchomienie szlaków prozapalnych, co skutkuje uwolnieniem cytokin, chemokin oraz innych mediatorów odpowiedzi zapalnej, a utrzymująca się ekspozycja może doprowadzić do przewlekłej reakcji zapalnej [21]. Badania eksperymentalne wykazały, że flawonoidy mogą hamować odpowiedź zapalną. Ekstrakt z liści strączyńca oskrzydłonego (*Senna alata*) istotnie zmniejszał obrzęk łapy w modelu szczurzym, ograniczając rozwój stanu zapalnego indukowanego karageniną, a autorzy powiązali ten efekt z wysoką całkowitą zawartością flawonoidów (TFC, ang. *total flavonoid content*) w ekstrakcie [22]. Ten sam model indukowanej odpowiedzi zapalnej zastosowano w badaniu przeciwzapalnej aktywności flawonoidu fustyny, wyizolowanej z ekstraktu z perukowca podolskiego (*Cotinus coggygria*) [23]. Ekstrakt metanolowy z kwiatów fiołka wonnego (*Viola odorata*) wykazywał zależną od dawki aktywność przeciwzapalną i cytotoksyczność w badaniach *in vitro*, co również przypisano wysokiej zawartości flawonoidów i innych polifenoli, w tym 7-*O*-glikozydu apigeniny, katechiny i rutyny [24].

Flawonoidy posiadają również właściwości antymutagenne, co zostało potwierdzone zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo*. Ekstrakty uzyskane z sumaka lakowego (*Rhus verniciflua*), z których wyizolowano m.in. takie flawonoidy jak sulfuretyna, fisetyna, fustyna i garbanzol, posiadały zdolność do hamowania mutagenności aflatoksyny B1, silnego kancerogenu. Efekt ten był związany z wychwytywaniem reaktywnych, elektrofilowych metabolitów pośrednich powstających w wyniku aktywacji mutagenu [25]. Podobnie ekstrakty z huby pospolitej (*Fomes fomentarius*), bogate w związki fenolowe i flawonoidy oraz z goździków (*Dianthus* spp.), zawierające m.in. rutynę i florydzynę, ograniczały częstość występowania mutacji indukowanych związkami chemicznymi, takimi jak azydek sodu czy 4-nitro-*o*-fenylenodiamina [26,27]. Dodatkowo udowodniono, że niektóre flawonoidy, takie jak kwercetyna, rutyna, apigenina czy diosmina, wykazują działanie genoprotekcyjne u myszy po zastosowaniu promieniowania jonizującego, przy czym obecność grup hydroksylowych w pozycjach C5 i C7 pierścienia A, a także grupy katecholowej w pierścieniu B wzmacnia ten efekt [28].

Liczne badania *in vitro* i *in vivo* wskazują, że flawonoidy posiadają wielokierunkową aktywność przeciwnowotworową, która wynika z oddziaływania na procesy związane z przeżyciem komórek nowotworowych [29]. Ich mechanizm działania oparty jest przede wszystkim na hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych oraz indukcji śmierci komórkowej, a także modulacji cyklu komórkowego i kluczowych szlaków sygnałowych związanych z przeżyciem komórek. W modelu raka wątrobowokomórkowego apigenina skutecznie zmniejszała proliferację komórek i promowała ich śmierć zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, a mechanizm jej działania wiązano m.in. z modulacją ekspresji mikroRNA i genów związanych ze szlakami kinaz MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) oraz PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*) [30]. Podobne działanie wykazała naryngenina, hamując proliferację, inwazyjność i migrację komórek raka wątroby i wykazując silne działanie proapoptyczne [31]. W badaniach na modelach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, ang. *non-small-cell lung carcinoma*) kemferol hamował proliferację i indukował autofagię przez hamowanie szlaku Met/PI3K/AKT/mTOR¹, najczęściej aktywowanego szlaku sygnałowego w ludzkich nowotworach [32]. W komórkach tego samego typu nowotworu sylibinina, poprzez modulację szlaków EGFR/JAK2/STAT5² oraz PI3K/AKT, hamowała angiogenezę, migrację i inwazyjność komórek [33]. Flawonoidy mogą również działać synergistycznie z rutynowo stosowanymi substancjami terapeutycznymi, zwiększając ich skuteczność. W mysim modelu raka trzustki, uzyskanym przez podskórne wszczepienie komórek linii Capan-1, połączenie kwercetyny i kurkuminy skutecznie hamowało wzrost nowotworu, a skojarzenie z cisplatyną skutkowało jeszcze większą redukcją masy guza oraz zwiększeniem obszaru nekrozy [34]. Działanie synergistyczne wykazała również luteolina, która w połączeniu z oksaliplatyną w zwierzęcym modelu raka jelita grubego znacząco zwiększała ekspresję markerów apoptozy PARP (ang. *poly(ADP-ribose) polymerase*) i p53 [35].

Flawonoidy wykazują wielokierunkową aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, wpływając na procesy związane z wirulencją i przeżywalnością komórek. Jednym z istotnych mechanizmów działania jest zaburzenie integralności błony komórkowej. Potencjał przeciwbakteryjny flawonoidów często związany jest z lipofilowością i płaską budową cząsteczek, które ułatwiają związkom

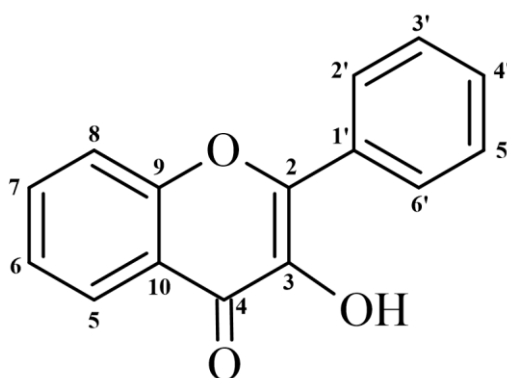
¹ (ang. *mesenchymal-epithelial transition factor / protein kinase B / mechanistic target of rapamycin*)

² (ang. *epidermal growth factor receptor / Janus kinase 2 / signal transducer and activator of transcription 5*)

wnikanie do dwuwarstwy lipidowej. Wykazano na przykład, że bajkaleina zwiększała przepuszczalność błony cytoplazmatycznej oraz zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych, co potęgowało skuteczność doksocykliny wobec szczepów wielolekoopornych [36]. Genisteina z kolei indukowała u *Escherichia coli* wytwarzanie tlenku azotu, który prowadził do depolaryzacji błony oraz uszkodzeń DNA [37]. Innym istotnym mechanizmem działania przeciwbakteryjnego jest modulacja mechanizmów oporności oraz hamowanie tworzenia biofilmu bakteryjnego. Wykazano, że naringina zmniejszała produkcję egzopolisacharydów i alginianu, czyli składników macierzy biofilmu uczestniczących w adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni oraz ich wzajemnej agregacji. Prowadziło to do ograniczenia zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy z rodzaju *Pseudomonas*, a także częściowej degradacji już istniejących struktur [38]. Flawonoidy mogą również neutralizować czynniki zjadliwości bez bezpośredniego zabijania samych bakterii, co sprzyja zmniejszeniu presji selekcyjnej prowadzącej do powstawania oporności. Kwercetyna w modelach zwierzęcych wykazała zdolność do wiązania się z koagulazą, hamując jej aktywność, co skutecznie chroniło przed zakażeniami odcewnikowymi wywołanymi przez *Staphylococcus aureus* [39]. Ograniczenie wirulencji zaobserwowano również po zastosowaniu hesperetyny, która hamowała ekspresję genów związanych z ruchliwością i adhezją u *Helicobacter pylori*, uniemożliwiając szczepowi kolonizację [40]. Badania synergistycznych interakcji związków flawonoidowych z antybiotykami (na przykład katechiny z tetracykliną oraz glabrydyny z norfloksacyną) wykazały, że związki te mogą znacznie obniżyć minimalne stężenia hamujące antybiotyków (MIC, ang. *minimum inhibitory concentration*), zwiększając ich skuteczność nawet wobec opornych szczepów [41,42].

1.2 3-hydroksyflawon

3-hydroksyflawon (3HF) jest najprostszym przedstawicielem klasy flawonoli, zbudowanym z dwóch pierścieni aromatycznych (A i B) połączonych heterocyklicznym pierścieniem benzopironu (Rys. 3). W jego strukturze obecna jest grupa hydroksylowa w pozycji C3 i grupa karbonylowa w pozycji C4, co umożliwia tworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego między nimi, a także warunkuje zdolność do chelatowania jonów metali. 3HF nie występuje w naturze w postaci wolnej, ale jest podstawową cząsteczką strukturalną wielu flawonoli występujących w roślinach [43].



Rys. 3. Struktura chemiczna 3-hydroksyflawonu wraz z numeracją atomów węgla.

Opracowanie własne w programie ChemSketch 2024.2.0 w oparciu o [44].

Klasyczną metodą otrzymywania flawonoli, w tym 3-hydroksyflawonu, jest reakcja Algar-Flynn-Oyamanda, polegająca na cyklizacji odpowiednich 2'-hydroksychalkonów w środowisku zasadowym [45]. Modyfikacje tej procedury, w tym jednoetapowa metoda zaproponowana przez Gonduz i wsp., umożliwiły zwiększenie wydajności procesu i skrócenie czasu reakcji [46]. Alternatywą dla syntezy chemicznej są przemiany mikrobiologiczne, z wykorzystaniem szczepów grzybów takich jak *Aspergillus niger* czy *Penicillium chermesinum*, umożliwiające selektywne hydroksylowanie szkieletu flawonoidowego [47].

3-hydroksyflawon wykazuje zdolność do wewnątrzcząsteczkowego transferu protonu w stanie wzbudzonym (ESIPT, ang. *excited-state intramolecular proton transfer*). Proces ten prowadzi do powstania dwóch form emisyjnych: normalnej enolowej (N*) oraz tautomerycznej ketonowej (T*), obserwowanych na widmie jako dwa osobne pasma emisji [48]. Na przebieg procesu ESIPT duży wpływ ma środowisko cząsteczki. W rozpuszczalnikach niepolarnych dominuje emisja formy ketonowej,

natomiast w rozpuszczalnikach polarnych i protonowych intensywniejsza jest emisja formy normalnej, co umożliwia wykorzystanie stosunku intensywności pasm N^*/T^* w badaniach ratiometrycznych. Oprócz oddziaływania z cząsteczkami rozpuszczalnika, na przebieg procesu ES IPT może również wpływać interakcja z różnymi biomolekułami, a także koordynacja z jonami metali. Dzięki tym właściwościom, 3-hydroksyflawon może być wykorzystywany jako sonda fluorescencyjna do monitorowania zmian środowiska, w tym badania różnych procesów i wykrywania cząsteczek i jonów [49]. Na tej podstawie opracowano m.in. ratiometryczny sensor do wykrywania ludzkiej karboksylesterazy 2. Sonda ta ulega hydrolizie pod wpływem badanego enzymu, co prowadzi do uwolnienia 3HF i wyraźnej zmiany widma emisji [50]. Zaprojektowano również boronianowe pochodne 3-hydroksyflawonu przeznaczone do detekcji anionu nadtlenoazotynowego ($ONOO^-$), reaktywnej formy azotu powstającej w warunkach stresu oksydacyjnego, której nadmiar związany jest w procesami neurodegeneracyjnymi, w tym z chorobą Alzheimera [51]. W badaniach analitycznych wykorzystano również zdolność 3HF do tworzenia kompleksów, opracowano między innymi sondę do wykrywania anionów fluorkowych i octanowych opartą na kompleksie 3-hydroksyflawonu z glinem, a także czuły chemosensor fluorescencyjny do oznaczania kationów miedzi i cynku [52,53]. Tworzenie kompleksów z jonami cynku zostało również wykorzystane do selektywnego oznaczania tego pierwiastka w próbkach wody pitnej, szamponów do włosów oraz produktów farmaceutycznych, a także do obrazowania jego jonów wewnątrz komórek nowotworowych [54,55]. Ponadto 3-hydroksyflawon wykazuje powinowactwo do białek, wiążąc się m.in. z albuminą surowicy bydlęcej, a układ oparty na takim kompleksie został wykorzystany do oznaczania pepsyny [56].

1.2.1 Aktywność biologiczna 3-hydroksyflawonu i jego pochodnych

3-hydroksyflawon, dzięki swojej strukturze chemicznej, wykazuje szeroki zakres aktywności biologicznych. Związek ten zwraca szczególną uwagę badaczy ze względu na swoją aktywność antyoksydacyjną i cytotoksyczność, a w literaturze istnieje wiele doniesień o jego właściwościach przeciwnowotworowych. Jego zdolność do hamowania proliferacji komórek i indukcji apoptozy wynika z wpływu na kluczowe szlaki sygnałowe. W badaniach na komórkach ludzkiego kostniakomięsaka zaobserwowano, że 3HF hamuje wzrost komórek nowotworowych, co związane jest m.in. z aktywacją ekspresji białka ZAK β (ang. *Zipper sterile-alpha-motif kinase beta*), skutkującą aktywacją szlaku apoptozy zależnego od kinazy JNK (ang. *C-Jun N-terminal kinase*) [57].

Wykazano również, że związek ten oddziałuje na procesy mitotyczne w komórkach nowotworowych poprzez inhibicję kinazy Aurora B, będącej jednym z kluczowych regulatorów podziałów komórkowych, co prowadzi do skutecznego zahamowania proliferacji komórek [58]. Aktywność 3-hydroksyflawonu związana jest również z modulowaniem szlaków sygnałowych związanych ze stanem zapalnym. Dowiedziono, że może on hamować produkcję prostaglandyny E₂, co jest wynikiem zahamowania kaskady kinaz aktywowanych mitogenami MAPK oraz ekspresji cyklooksygenazy-2. W konsekwencji prowadzi to do zahamowania proliferacji komórek indukowanej epidermalnym czynnikiem wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*) [59]. Właściwości cytotoksyczne potwierdzono również w badaniach porównawczych z innymi flawonoidami. W eksperymencie przeprowadzonym na komórkach nowotworowych i śródbłonna zaobserwowano, że 3HF wykazuje znacznie silniejsze działanie cytotoksyczne niż jeden z najczęściej badanych flawonoidów, jakim jest kwercetyna. W badanych liniach komórkowych zauważono znaczne obniżenie przeżywalności komórek i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₂/M, związane z indukcją apoptozy [60]. Poza bezpośrednim działaniem cytotoksycznym, 3-hydroksyflawon wykazuje również potencjał w terapiach skojarzonych z innymi lekami. Jednoczesne zastosowanie 3HF i imatynibu doprowadziło do znacznego wzrostu liczby komórek ulegających apoptozie w linii komórek białaczki odpornej na ten lek, a efekt ten związany był z aktywacją kaspaz i obniżeniem poziomu onkoproteiny fosfo-Bcr/Abl (ang. *breakpoint cluster region / Abelson*), odpowiedzialnej za niekontrolowane namnażanie komórek krwi [61]. Odmienny efekt działania 3HF zaobserwowano w przypadku komórek prawidłowych. Wykazano, że poprzez oddziaływanie na szlak sygnałowy ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) może on pozytywnie wpływać na proliferację, przeżywalność oraz różnicowanie komórek na etapie embriogenezy, znacząco poprawiając rozwój zarodków *in vitro* w modelu świni [62]. Oprócz aktywności przeciwnowotworowej, 3-hydroksyflawon wykazuje również właściwości antyoksydacyjne. W badaniach przeprowadzonych na komórkach nabłonna kanalików nerkowych wykazano, że związek ten chronił komórki przed szkodliwym działaniem nikotyny. Mechanizm działania polegał na hamowaniu produkcji ROS i aktywacji szlaku PKA/CREB³, prowadzącego do zwiększonej ekspresji mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej, będącej kluczowym enzymem antyoksydacyjnym [63].

³ (ang. *protein kinase A / cAMP responsive element-binding protein*)

Znaczny potencjał biologiczny 3-hydroksyflawonu sprawił, że stał się on punktem wyjścia do projektowania licznych nowych pochodnych o zmodyfikowanych właściwościach. Badania nad syntetycznymi analogami 3HF potwierdziły, że wybrane związki z tej grupy indukowały apoptozę i hamowały proliferację komórek raka jelita grubego w badaniach *in vitro* i *in vivo*, działając jako inhibitory deacetylazy histonowej HDAC8, pełniącej istotną rolę w regulacji ekspresji genów w komórkach nowotworowych [64]. Ponadto Znati i wsp. zaprojektowali 46 nowych pochodnych 3HF, które następnie przebadali pod kątem aktywności przeciwnowotworowej. W badaniach tych wykazano, że niektóre ze związków pochodnych wykazały wysoką cytotoksyczność wobec komórek raka jelita grubego oraz raka jajnika, jednocześnie wykazując zdolność do hamowania aktywności enzymu 15-lipooksygenazy, biorącego udział w procesach zapalnych [65].

1.2.2 Modyfikacja właściwości flawonoidów po kompleksowaniu z jonami metali

Istotnym kierunkiem badań nad flawonoidami jest modyfikacja ich struktury i właściwości poprzez kompleksowanie z jonami metali. Ze względu na obecność w strukturze grup funkcyjnych zdolnych do koordynacji kationów metali, w szczególności grupy karbonylowej oraz grup hydroksylowych, związki te stanowią doskonałe ligandy. W zależności od położenia i liczby podstawników, wiązanie koordynacyjne może powstawać w różnych miejscach cząsteczki, w szczególności pomiędzy grupami 4-karbonylową i grupą hydroksylową w pozycji C3 lub C5 [66]. Przebieg kompleksowania zależy nie tylko od budowy liganda i właściwości metalu, ale również od warunków środowiska, takich jak pH, temperatura czy rodzaj rozpuszczalnika. W warunkach laboratoryjnych kompleksy syntetyzuje się najczęściej poprzez połączenie alkoholowego lub wodnego roztworu flawonoidu z roztworem soli danego metalu, a następnie dodanie roztworu zasady, mającego na celu deprotonację grup hydroksylowych i ułatwienie koordynacji metalu [67]. Kompleksowanie flawonoidów z jonami metali może znacznie modyfikować właściwości związków wyjściowych. Często obserwuje się poprawę właściwości biologicznych, w tym aktywności przeciwnowotworowej, a także zmianę właściwości fizykochemicznych, takich jak rozpuszczalność, stabilność i biodostępność w porównaniu z wolnym ligandem [68].

W poszukiwaniu nowych związków biologicznie aktywnych, bardzo duże znaczenie ma dobór odpowiedniego atomu centralnego. Wśród licznych pierwiastków szczególną uwagę przyciągają metale pełniące istotne role biologiczne w organizmie ludzkim, takie jak kobalt, mangan oraz cynk. Kobalt jest pierwiastkiem śladowym, będącym atomem centralnym witaminy B₁₂ (kobalaminy), która jest kluczowa w procesie syntezy DNA oraz do zachowania prawidłowego funkcjonowania układu krwiotwórczego i nerwowego. Ciekawą właściwością jonów Co(II) jest ich zdolność do naśladowania stanu niedotlenienia (hipoksji), głównie poprzez stabilizację czynnika indukowanego niedotlenieniem (HIF-1 α , ang. *hypoxia inducible factor-1 α*), sprawiając, że komórki zachowują się tak, jakby znajdowały się w środowisku o niskiej zawartości tlenu. Prowadzi to do aktywacji genów związanych z angiogenezą i jest kluczowym mechanizmem regeneracji tkanek. Oznacza to, że kompleksowanie z jonami kobaltu może nie tylko zmieniać aktywność wolnego liganda, ale także stymulować procesy związane z tworzeniem nowych naczyń krwionośnych [69]. Mangan jest kluczowym mikroelementem, pełniącym rolę w utrzymaniu równowagi redoks w komórkach. Jest kofaktorem licznych metaloenzymów, w tym dysmutazy ponadtlenkowej (Mn)SOD (ang. *manganese superoxide dismutase*) znajdującej się w mitochondriach. Enzym ten katalizuje przemianę chemiczną anionorodnika ponadtlenkowego O₂⁻ do tlenu i nadtlenu wodoru, co chroni komórki przed stresem oksydacyjnym. Zaburzenia homeostazy manganu, a co za tym idzie funkcjonowania (Mn)SOD, powiązane są z rozwojem wielu chorób, m.in. progresją otyłości, dysfunkcji układu sercowo-naczyniowego, schorzeń neurodegeneracyjnych oraz nowotworów [70]. Kolejnym niezwykle ważnym mikroelementem jest cynk, pełniący funkcję regulatorową i strukturalną w wielu procesach biologicznych. Szacuje się, że jest komponentem ponad 3 tysięcy białek, w tym licznych enzymów i czynników transkrypcyjnych. Jest elementem budulcowym tak zwanych „palców cynkowych”, czyli motywów strukturalnych białek odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów. Ze względu na szerokie spektrum działania, wychwyty jonów cynku, ich dystrybucja, magazynowanie i wydalanie podlegają ścisłej kontroli. Zaburzenia homeostazy cynku związane są z patogenezą wielu chorób przewlekłych, w tym nowotworów, cukrzycy, choroby Alzheimera oraz innych chorób wynikających z wieku. Cynk pełni bardzo ważną rolę w komórkach prostaty, jego prawidłowy poziom jest niezbędny do właściwego funkcjonowania tego gruczołu. Wykazano, że w komórkach raka prostaty stężenie cynku znacznie spada, co jest związane z obniżeniem ekspresji transporterów cynku, a zjawisko to koreluje z postępem złośliwości nowotworu [71].

W literaturze naukowej istnieje wiele doniesień dowodzących, że kompleksowanie flawonoidów z wyżej wymienionymi jonami metali może prowadzić do zmian ich aktywności biologicznej. Zauważono na przykład, że połączenie chryzyny z jonami kobaltu skutkowało wzmocnieniem potencjału przeciwutleniającego poprzez zwiększenie zdolności wychwytywania wolnych rodników, a aktywność otrzymanych kompleksów była porównywalna do działania kwasu askorbinowego [72]. Zaobserwowano również, że kompleks luteoliny z jonami manganu wykazuje zwiększoną aktywność przeciwutleniającą i przeciwbakteryjną w porównaniu z ligandem, a także posiada zdolność do obniżenia poziomu glukozy we krwi. W badaniach tych zauważono także, że zarówno luteolina, jak i jej kompleks z manganem wykazują zdolność do hamowania aktywności oksydazy ksantynowej, przy czym po kompleksowaniu efekt ten jest silniejszy [73]. Znaczne wzmocnienie potencjału antyoksydacyjnego w porównaniu z wolnym ligandem udokumentowano również dla kompleksu kemferolu z jonami cynku. Efekt ten był szczególnie zauważalny dla kompleksu o stechiometrii 1:1, a tłumaczono go między innymi zwiększeniem kwasowości grup fenolowych, co ułatwiało ich deprotonację w reakcjach neutralizacji rodników [74]. Ponadto wykazano, że kompleksowanie z jonami cynku może znacząco zmienić aktywność biologiczną kwercetyny. W badaniach przeprowadzonych przez Lee i wsp. otrzymano kompleks utworzony przy udziale grupy 4-karbonylowej i 3-hydroksylowej, który wykazał silniejsze działanie cytotoksyczne względem komórek raka pęcherza moczowego, skuteczniej indukując apoptozę i hamując migrację komórek [75]. Z kolei Nakamura i wsp. otrzymali kompleks kwercetyny z cynkiem, w którym koordynacja obejmowała również grupy hydroksylowe z pierścienia B. W badaniach przeprowadzonych na liniach komórkowych raka jelita grubego (HCT116) oraz raka wątroby (HepG2) kompleks ten wykazał zwiększoną skuteczność przeciwnowotworową w stosunku do samej kwercetyny, silniej hamując proliferację komórek i indukując apoptozę. Zauważono również zwiększony wewnątrzkomórkowy wychwyty zarówno kwercetyny, jak i jonów cynku, co wskazuje na poprawę biodostępności po kompleksowaniu [76].

1.2.3 Kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami metali

3-hydroksyflawon, ze względu na swoją budowę, wykazuje zdolność do tworzenia stabilnych związków koordynacyjnych z jonami różnych metali, w szczególności metali przejściowych oraz metali ciężkich. W literaturze przedstawiono szereg kompleksów, które były badane pod kątem właściwości biologicznych, takich jak aktywność antyoksydacyjna, przeciwbakteryjna czy przeciwnowotworowa. Wykazano na przykład, że związki koordynacyjne 3-hydroksyflawonu z platyną(II) charakteryzowały się zwiększoną aktywnością cytotoksyczną wobec linii komórek glejaka (U87) i raka piersi (MCF-7) niż sam ligand [77]. Interesujące wyniki otrzymano również dla arenowych pochodnych 3-hydroksyflawonu z rutenem(II), które analizowano pod kątem stabilności, cytotoksyczności i potencjalnych oddziaływań z DNA i aminokwasami. Otrzymane związki wykazały wysoką cytotoksyczność wobec linii komórek raka jajnika (CH1), raka jelita grubego (SW480) oraz niedrobnokomórkowego raka płuca (A549), a działanie to powiązano z zahamowaniem aktywności topoizomerazy II α [78]. W literaturze opisano również alkynylowe kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami złota(I), które poprzez hamowanie aktywności cyklooksygenazy-1 i -2, a także reduktazy tioredoksyny i reduktazy glutationu, wykazały aktywność przeciwko komórkom linii gruczolakoraka okrężnicy Caco-2, MCF-7 oraz HepG2 [79]. Otrzymano również kompleksy renu(I), które w badaniach *in vitro* wykazały cytotoksyczność wobec komórek raka szyjki macicy (HeLa) porównywalną do powszechnie stosowanej cisplatyny, przy jednoczesnej niższej toksyczności wobec prawidłowych komórek nabłonka siatkówki (RPE-1), co sugeruje pewną selektywność biologiczną [80].

Przykładem związków o odmiennych właściwościach są kompleksy bizmutu(III) z flawonoidami, w tym z 3-hydroksyflawonem. Badania przeprowadzone przez Burke i wsp. dowiodły, że kompleksy skutecznie działały przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym, a ich aktywność biologiczna była ściśle zależna od struktury [81]. Oprócz aktywności przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej, badano również właściwości antyoksydacyjne pochodnych 3HF. Przykładem jest zsyntezowany kompleks 3-hydroksyflawonu z wanadem(V), którego aktywność antyutleniającą potwierdzono w warunkach *in vivo* w modelu cukrzycy indukowanej streptozotocyną u szczurów. Związek ten ograniczał stres oksydacyjny wywołany hiperglikemią i prowadził do poprawy funkcjonowania komórek β trzustki [82].

W literaturze znaleźć można również prace, w których badacze otrzymali kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami metali przejściowych w stanie stałym, jednak ich uwaga skupiła się na aspektach strukturalnych, fizykochemicznych i mechanistycznych, a nie na pogłębionym badaniu aktywności biologicznej. Przykładem mogą być kompleksy z jonami miedzi(II), badane pod kątem modelowania centrów aktywnych enzymów. Ich struktury potwierdzono krystalograficznie, a następnie przeprowadzono pomiary kinetyczne, które wykazały, że otrzymane związki mogą uczestniczyć w reakcjach utleniania flawonolanów w obecności tlenu cząsteczkowego [83,84]. Podobne wyniki uzyskano dla kompleksu z niklem(II), którego strukturę wyznaczono metodą dyfrakcji rentgenowskiej. W badaniach modelowych wykazano, że kompleks może reagować z O₂ w sposób przypominający działanie 2,3-dioksygenazy kwercetyny [85]. Z kolei kompleks 3-hydroksyflawonu z jonami żelaza(III) wykazał aktywność nukleazową, ponieważ po związaniu z małym rowkiem DNA i redukcji jonu metalu generował reaktywne formy tlenu, co prowadziło do oksydacyjnego uszkodzenia nici DNA [86].

W literaturze dostępnych jest niewiele doniesień dotyczących kompleksów 3-hydroksyflawonu z jonami kobaltu oraz cynku, brak jest z kolei informacji na temat kompleksów z manganem. Większość badań skupia się na analizach strukturalnych i teoretycznych układów powstających w roztworach, z pominięciem szczegółowej oceny aktywności biologicznej *in vitro*.

W przypadku kobaltu przeprowadzono badania dotyczące zdolności 3HF do chelatowania jego jonów. Celem analiz była weryfikacja potencjału tego flawonoidu do wyłapywania kobaltu uwalnianego z endoprotez, który w nadmiernym stężeniu może wykazywać toksyczność. W tym celu wykorzystano metody spektroskopowe, które potwierdziły możliwość koordynacji metalu w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Badania wykazały również, że 3HF nieznacznie hamował powstawanie rodników hydroksylowych w reakcji Fentona wywołanej jonami Co²⁺ [87].

Więcej uwagi poświęcono kompleksom 3-hydroksyflawonu z jonami cynku. W badaniach prowadzonych przez zespół Cornard i wsp., a następnie kontynuowanych przez Lapouge i wsp. kompleksy syntezowano metodą stosunku molowego (stosując stałe stężenie roztworu liganda, zmienne stężenie roztworu chlorku cynku). Wykazano, że w roztworze metanolu powstaje kompleks o stechiometrii 1:1, co potwierdzono metodą Joba. Analizy spektroskopowe połączone z obliczeniami kwantowo-chemicznymi potwierdziły, że jony cynku wiążą się przez grupy 3-hydroksylową i 4-karbonylową [88,89].

Analiza widm masowych wykazała, że kompleksy 3HF z cynkiem mogą powstawać również w stechiometrii 2:1 oraz 3:2. Jednocześnie w tym samym badaniu widma spektroskopowe potwierdziły powstanie w roztworze kompleksu o stechiometrii 1:1. Autorzy wskazali, że obserwowane różnice mogą być wynikiem kondensacji i krystalizacji analitu na powierzchni stalowej płytki podczas pomiarów spektrometrycznych, co może prowadzić do powstania kompleksów o strukturze innej niż w roztworze [90]. Podobne obserwacje przedstawili Sarowar i wsp., którzy badali oddziaływania 3-hydroksyflawonu z jonami metali przy wykorzystaniu spektrometrii mas połączonej z analizatorem typu Orbitrap. W widmach masowych zaobserwowali jony odpowiadające kompleksom z cynkiem o różnym stosunku ligand:metal, między innymi 1:1 (jon $[L-H+Zn]^+$), 2:1 (jon $[2L-H+Zn]^+$), 2:2 (jon $[2L-3H+2Zn]^+$) oraz 3:2 (jon $[3L-3H+2Zn]^+$), co wskazuje na możliwość powstawania związków o zróżnicowanej stechiometrii w fazie gazowej [91]. Warto również wspomnieć o badaniach teoretycznych dotyczących układów 3-hydroksyflawonu z jonami różnych metali, w tym jonów cynku. Obliczenia kwantowo-chemiczne wskazują, że proces kompleksowania modyfikuje strukturę elektronową cząsteczki, a koordynacja zachodzi najczęściej przez zdeprotonowany układ 3-hydroksy-4-karbonylowy. Stabilność kompleksów zależy od warunków środowiska reakcji, a także od rodzaju jonu metalu [92]. W nowszych badaniach opisano kompleks 3-hydroksyflawonu z cynkiem, powstający w roztworze, który wykorzystano do opracowania spektrofotometrycznej metody oznaczania tego flawonoidu. Analizy dowiodły, że w środowisku wodno-metanolowym powstaje stabilny kompleks o stechiometrii 2:1, który następnie badano pod kątem aktywności antyoksydacyjnej. Otrzymany związek wykazał się zwiększonym potencjałem przeciwutleniającym w porównaniu z wolnym ligandem [93]. W literaturze opisano jeden przypadek kompleksu 3HF z cynkiem otrzymanego w postaci ciała stałego, dla którego analizy spektroskopowe i spektrometria mas potwierdziły stechiometrię 1:1. Badania *in vivo* potwierdziły brak ostrej toksyczności, a podanie doustne szczurom z cukrzycą indukowaną streptozotocyną prowadziło do obniżenia poziomu glukozy we krwi, poprawy wydzielania insuliny oraz poprawy parametrów związanych z funkcjonowaniem nerek i wątroby. Działanie przeciwcukrzycowe kompleksu było porównywalne do działania gliklazydu, standardowego leku przeciwcukrzycowego [94].

1.3 Mechanizmy śmierci komórkowej

W każdym żywym organizmie wielokomórkowym zachodzą naturalne procesy regulacji liczby komórek, obejmujące zarówno ich proliferację, jak i eliminację. Ich precyzja jest niezbędna do utrzymania homeostazy tkanek oraz prawidłowego funkcjonowania organizmu. Śmierć komórkowa umożliwia usuwanie komórek uszkodzonych, zbędnych lub potencjalnie niebezpiecznych, a także pełni istotną rolę w regulacji procesów rozwojowych, odpowiedzi na stres komórkowy i infekcje [95]. Zaburzenia równowagi pomiędzy podziałami komórkowymi a ich obumieraniem są podstawą patogenezy wielu chorób, między innymi zaburzeń autoimmunologicznych, chorób neurodegeneracyjnych oraz chorób nowotworowych, w przypadku których zahamowanie eliminacji komórek sprzyja ich niekontrolowanemu wzrostowi [96].

Śmierć komórkowa może zachodzić zarówno w sposób kontrolowany i uporządkowany, jak i nagły, niekontrolowany. Współczesna klasyfikacja wyróżnia dwa podstawowe typy tego procesu: śmierć przypadkową (ACD, ang. *accidental cell death*) oraz śmierć regulowaną (RCD, ang. *regulated cell death*). Śmierć przypadkowa jest konsekwencją gwałtownych uszkodzeń fizycznych lub chemicznych, prowadzących do natychmiastowej utraty integralności komórki. Śmierć regulowana z kolei przebiega z udziałem ściśle określonych szlaków molekularnych i może być modulowana przez czynniki genetyczne lub farmakologiczne [97]. Szczególnym rodzajem śmierci regulowanej jest programowana śmierć komórki (PCD, ang. *programmed cell death*), obejmująca procesy zachodzące w warunkach fizjologicznych, na przykład podczas rozwoju płodowego. Do najlepiej poznanych i najważniejszych form regulowanej śmierci komórki należą apoptoza, nekroptoza oraz autofagia. W kontekście poszukiwania nowych związków o działaniu cytotoksycznym, szczególnie w terapii nowotworów, najbardziej pożądanym rodzajem śmierci jest apoptoza, ponieważ pozwala na usuwanie komórek bez wywoływania gwałtownej reakcji zapalnej w otaczających tkankach [98].

1.3.1 Apoptoza

Apoptoza jest najlepiej scharakteryzowaną formą programowanej śmierci komórki, po raz pierwszy opisaną w 1972 roku [99]. Proces ten charakteryzuje się szeregiem zmian morfologicznych zachodzących w komórce. Do najbardziej typowych należą obkurczenie komórki, kondensacja chromatyny oraz fragmentacja jądra komórkowego. W dalszych etapach dochodzi do powstawania charakterystycznych uwypukleń błony komórkowej, przekształcających się w tak zwane ciała apoptotyczne, czyli pęcherzyki otoczone błoną białkowo-lipidową, zawierające fragmenty cytoplazmy i organelli komórkowych. Struktury te są następnie rozpoznawane i usuwane przez komórki fagocytujące, co zapobiega uwolnieniu zawartości komórki do przestrzeni międzykomórkowej, dzięki czemu nie dochodzi do wywołania reakcji zapalnej oraz uszkodzeń w otaczających tkankach [100].

Jednym z kluczowych markerów biochemicznych wczesnej apoptozy jest zaburzenie asymetrii błony komórkowej. W komórkach zdrowych fosfatydyloseryna (PS, ang. *phosphatidylserine*), jeden z głównych fosfolipidów błony komórkowej, znajduje się niemal wyłącznie po wewnętrznej stronie dwuwarstwy lipidowej. Stan ten utrzymywany jest dzięki działaniu enzymów z grupy flipaz, transportujących PS do wnętrza komórki. Podczas indukcji apoptozy dochodzi do aktywacji enzymów z grupy skramblaz, odpowiedzialnych za dwukierunkowy transport fosfolipidów przez błony, przy jednoczesnej dezaktywacji flipaz, co skutkuje translokacją fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Ekspozycja PS pełni ważną funkcję biologiczną, ponieważ stanowi sygnał umożliwiający rozpoznanie i fagocytozę komórek ulegających apoptozie przez makrofagi [101]. Zjawisko to jest wykorzystywane w diagnostyce laboratoryjnej do wykrywania komórek apoptotycznych, między innymi w teście z aneksyną V, czyli białkiem wykazującym wysokie powinowactwo do fosfatydyloseryny w obecności jonów wapnia [102].

Kluczową rolę w regulacji i inicjacji apoptozy pełnią kaspazy (ang. *cysteine-aspartic proteases*), czyli proteazy posiadające w centrum aktywnym reszty cysteiny. Hydrolizują one wiązania peptydowe specyficznie po karboksylowej stronie reszt kwasu asparaginowego, co prowadzi do degradacji licznych białek regulatorowych i strukturalnych komórki. Enzymy te syntezowane są w komórkach jako nieaktywne prokaspazy, ulegające aktywacji w odpowiedzi na sygnały apoptotyczne [103].

Kaspazy zaangażowane w proces apoptozy można podzielić na inicjatorowe (kaspaza-2, -8, -9, -10, -12) oraz efektorowe, zwane również wykonawczymi (kaspaza-3, -6 i -7). Enzymy należące do pierwszej grupy występują w postaci monomerów i ulegają aktywacji poprzez dimeryzację w odpowiedzi na sygnały apoptotyczne, a następnie aktywują drugą grupę poprzez rozszczepienie proteolityczne. Aktywne kaspazy efektorowe prowadzą do degradacji kluczowych białek strukturalnych i uniemożliwiają naprawę DNA, co skutkuje śmiercią komórki [104]. Enzymy te są mediatorami nie tylko w procesie apoptozy, ale biorą udział również w innych formach programowanej śmierci, a także w regulacji procesów odpowiedzi immunologicznej i stanów zapalnych [105].

Istnieją dwa główne szlaki sygnalizacyjne prowadzące do aktywacji kaspaz i indukcji apoptozy: zewnętrzny, zależny od receptorów obecnych na powierzchni komórki oraz wewnętrzny, aktywowany w odpowiedzi na stres wewnątrzkomórkowy, związany z funkcjonowaniem mitochondriów.

Szlak zewnętrzny (receptorowy)

Szlak zewnętrzny, nazywany również receptorowym, inicjowany jest przez sygnały pochodzące z otoczenia komórki. Proces ten rozpoczyna się w wyniku związania ligandów wewnątrzkomórkowych z odpowiednimi receptorami śmierci zlokalizowanymi w błonie komórkowej. Do najlepiej poznanych należą receptor Fas i jego ligand FasL, receptor czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor- α*) i jego ligand TNF- α oraz receptory dla liganda TRAIL (ang. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) [106]. Receptory z tej rodziny charakteryzują się obecnością domeny o długości około 80 reszt aminokwasowych, zwanej domeną śmierci. Po związaniu receptora z ligandem dochodzi do zmian konformacyjnych w jej obrębie, co umożliwia przyłączenie się białek adaptacyjnych takich jak na przykład FADD (ang. *Fas-associated death domain*). W ten sposób powstaje kompleks białkowy o nazwie DISC (ang. *death-inducing signaling complex*), który umożliwia aktywację kaspaz inicjatorowych, w szczególności kaspazy-8. Aktywne kaspazy inicjatorowe mogą następnie bezpośrednio inicjować kaskadę proteolityczną poprzez zaangażowanie kaspaz wykonawczych lub pośredniczyć w aktywacji szlaku mitochondrialnego dzięki przekształceniu białka Bid do jego aktywnej formy tBid, co prowadzi do wzmocnienia sygnału apoptotycznego [107,108].

Szlak wewnętrzny (mitochondrialny)

Szlak wewnętrzny, określany jako mitochondrialny, uruchamiany jest głównie w odpowiedzi na czynniki stresowe wewnątrz komórki, takie jak uszkodzenia DNA, stres oksydacyjny, brak czynników wzrostu czy zaburzenia funkcjonowania mitochondriów [109]. W inicjacji wewnętrznego szlaku apoptozy istotną rolę odgrywa białko p53, określane jako „strażnik genomu”, które w odpowiedzi na stres komórkowy działa jako czynnik transkrypcyjny, indukując ekspresję genów kodujących białka proapoptotyczne, takie jak Bax, Noxa i Puma. Białka te ulegają oligomeryzacji, co prowadzi do utworzenia porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Zwiększenie przepuszczalności błony jest kluczowym etapem tego szlaku, gdyż umożliwia uwolnienie do cytoplazmy czynników proapoptotycznych, w tym cytochromu c. Jest to białko, które po przedostaniu się do cytozolu łączy się z białkiem Apaf-1 (ang. *apoptotic protease activating factor 1*) i ATP lub dATP, tworząc kompleks określany jako apoptosom. Struktura ta odpowiada za rekrutację i aktywację kaspazy-9, która następnie aktywuje kaspazy efektorowe, w szczególności kaspazę-3. Ostatecznie prowadzi to do degradacji składników komórkowych i kontrolowanej fragmentacji komórki [110,111].

Przebieg apoptozy jest ściśle kontrolowany na poziomie molekularnym, a kluczową rolę w regulacji wewnętrznego szlaku odgrywa rodzina białek Bcl-2. Białka te dzielą się na dwie grupy o przeciwstawnym działaniu: proapoptotyczne (np. Bak, Bax), które po aktywacji prowadzą do wytworzenia porów w błonie mitochondrialnej oraz antyapoptotyczne (np. Bcl-2, Bcl-xL), które chronią integralność błony. Istotną grupą są również białka posiadające domenę BH3 (takie jak Bid, Bad lub Bim), których zadaniem jest wykrywanie czynników stresu i modulacja aktywności pozostałych członków rodziny Bcl-2. Stosunek ilościowy białek pro- i antyapoptotycznych może decydować o losie komórek, a równowaga między nimi często ulega zaburzeniu w komórkach nowotworowych, gdzie nadekspresja białek antyapoptotycznych i zahamowanie aktywności białek proapoptotycznych zaburza proces apoptozy i prowadzi do zwiększenia przeżywalności komórek [111,112].

1.3.2 Nekroza

Nieregulowaną formą śmierci komórki jest martwica (nekroza), będąca zwykle wynikiem uszkodzeń mechanicznych, czynników chemicznych (np. ekstremalne wahania pH), a także wysokiego ciśnienia, skrajnych temperatur, promieniowania, zaburzeń ciśnienia osmotycznego czy toksyn, uniemożliwiających komórce prawidłowe funkcjonowanie. W przeciwieństwie do apoptozy, proces ten zachodzi w sposób gwałtowny i niekontrolowany, wynikający z przekroczenia zdolności komórki do adaptacji do czynników stresowych [113].

Charakterystyczną cechą nekrozy jest obrzęk komórki (onkoza), spowodowany zaburzeniem homeostazy, w tym brakiem równowagi jonowej i dysfunkcją pomp jonowych zależnych od ATP. Niewydolność pomp skutkuje gromadzeniem jonów sodu i wody w komórce, co prowadzi do zwiększenia objętości komórki i organelli otoczonych błonami, takich jak mitochondria czy siateczka śródplazmatyczna. Wynikiem tego jest uszkodzenie i pęknięcie błon komórkowych, a utrata ich integralności prowadzi do niekontrolowanego wydostania się zawartości komórki do otaczającego środowiska. Uwolnione w ten sposób składniki komórkowe określane są jako alarminy lub wzorce molekularne związane z uszkodzeniami (DAMP, ang. *damage-associated molecular patterns*), które stymulują lokalne komórki układu immunologicznego i prowadzą do rozwoju stanu zapalnego, przyczyniając się do uszkodzeń sąsiadujących zdrowych tkanek [114,115].

1.3.3 Nekroza wtórna

Nekroza wtórna to końcowy etap apoptozy zachodzący w sytuacji, gdy komórki apoptotyczne nie zostaną odpowiednio wcześniej usunięte na drodze fagocytozy. W warunkach fizjologicznych ciałałka apoptotyczne są szybko eliminowane, jednak gdy proces ten nie przebiega prawidłowo, to błony ciałałek po pewnym czasie tracą integralność wskutek wyczerpania rezerw energetycznych. Sytuacja taka może mieć również miejsce w warunkach *in vitro*, przy braku wyspecjalizowanych komórek żernych. Prowadzi to do autolitycznej degradacji komórki i uwolnienia jej składników do przestrzeni międzykomórkowej [116]. Nekroza wtórna jest więc naturalnym następstwem apoptozy, który w przypadku braku zaangażowania fagocytów prowadzi do dezintegracji komórek. Komórki ulegające nekrozie wtórnej przechodzą wcześniej szereg zmian charakterystycznych dla apoptozy, co odróżnia ten proces od nekrozy pierwotnej i może wpływać na charakter powstających cząsteczek. Uwolnione składniki, w tym cząsteczki DAMP, mogą indukować odpowiedź zapalną [116,117].

1.3.4 Nekroptoza

Nekroptoza jest formą regulowanej śmierci komórki, o cechach morfologicznych upodabniających ją do nekrozy, jednak przebiegającą w sposób genetycznie kontrolowany. Proces ten jest inicjowany najczęściej wtedy, gdy kaskada apoptotyczna zostaje zahamowana. Szczególnie istotna jest inhibicja kaspazy-8, która uniemożliwia przebieg apoptozy i kieruje komórkę na alternatywną ścieżkę eliminacji. Kluczową rolę w nekroptozie odgrywają kinazy białkowe oddziałujące z receptorami RIPK1 i RIPK3 (ang. *receptor-interacting protein kinase 1 / 3*), które oddziałują ze sobą, tworząc kompleks zwany nekrosomem. W jego obrębie kinaza RIPK3 fosforyluje i aktywuje białko MLKL (ang. *mixed lineage kinase domain-like protein*), które następnie ulega oligomeryzacji i translokacji do błony komórkowej, co skutkuje jej destabilizacją [115,118]. W wyniku tego dochodzi do obrzęku komórki i organelli wewnątrzkomórkowych, pęknięcia błony cytoplazmatycznej i uwolnienia zawartości komórki do środowiska zewnątrzkomórkowego. Uwolnione cząsteczki DAMP powodują odpowiedź immunologiczną i wywołanie stanu zapalnego podobnie jak w przypadku nekrozy, proces ten jednak jest ściśle regulowany na poziomie molekularnym [115,119].

1.3.5 Autofagia

Autofagia jest procesem degradacji wewnątrzkomórkowej, polegającym na dostarczeniu składników cytoplazmatycznych (w tym uszkodzonych organelli, nieprawidłowych białek, zbędnych makrocząsteczek) do lizosomów w celu ich rozkładu i ponownego wykorzystania, co umożliwia utrzymanie homeostazy komórkowej. Mechanizm ten przebiega wieloetapowo, a rozpoczyna się od formowania w cytozolu pęcherzyków otoczonych podwójną błoną lipidową zwanych autofagosomami, które otaczają składniki przeznaczone do degradacji, a następnie ulegają fuzji z lizosomami, tworząc autolizosomy. We wnętrzu tych struktur, przy udziale enzymów hydrolitycznych, dochodzi do rozkładu zawartości, a proste składniki budulcowe zostają uwolnione do cytozolu, gdzie mogą być ponownie wykorzystane [120]. Przebieg autofagii jest ściśle kontrolowany przez białka związane z autofagią (ATG, ang. *AuTophagy related proteins*), tworzące wyspecjalizowane kompleksy, odpowiedzialne za regulację poszczególnych etapów procesu. Autofagia pełni funkcję cytoprotekcyjną, będąc odpowiedzią na warunki stresowe takie jak niedobór składników odżywczych, stres oksydacyjny i uszkodzenia organelli. W kontekście chorób nowotworowych, proces ten charakteryzuje się podwójnym działaniem. W początkowych stadiach nowotworzenia autofagia może działać supresyjnie,

hamując rozwój nowotworu poprzez zapobieganie gromadzeniu się uszkodzonych struktur komórkowych oraz ograniczając stres oksydacyjny. W zaawansowanych stadiach choroby jest to jednak mechanizm adaptacyjny, wspierający przeżycie komórek przez dostarczenie substratów energetycznych [121].

1.4 Nowotwory jako problem kliniczny

1.4.1 Ogólne informacje o nowotworach

Nowotwory złośliwe pozostają jednym z najpoważniejszych globalnych wyzwań zdrowotnych, będąc drugą (po chorobach układu krążenia) najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Według danych Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC, ang. *International Agency for Research on Cancer*), pochodzących z projektu GLOBOCAN (ang. *Global Cancer Observatory*) w 2022 roku odnotowano niemal 20 milionów nowych zachorowań i około 9,7 miliona zgonów, a prognozy wskazują na dalszy wzrost tych wartości w kolejnych dekadach. Do czynników zwiększających ryzyko zachorowania na raka, poza obciążeniem genetycznym, zaliczyć można między innymi niewłaściwy styl życia (palenie tytoniu, niewłaściwa dieta, nadwaga, brak aktywności fizycznej) oraz czynniki środowiskowe (narażenie na zanieczyszczenia, substancje chemiczne, promieniowanie UV) [122–124].

Nowotwory powstają w wyniku modyfikacji genetycznych i epigenetycznych. Nagromadzenie tych zmian prowadzi do zaburzenia kluczowych procesów komórkowych, w szczególności proliferacji, różnicowania, programowanej śmierci komórki oraz naprawy DNA [125]. Według Hanahana i Weinberga komórki nowotworowe nabywają pewne charakterystyczne cechy, obejmujące między innymi zdolność do nieograniczonej proliferacji, unikania apoptozy, indukowania angiogenezy oraz tworzenia przerzutów [126]. Koncepcja ta została zaktualizowana w 2011 i 2022 roku, współcześnie uwzględniając również rolę deregulacji metabolizmu, niestabilności genetycznej oraz unikania odpowiedzi immunologicznej w rozwoju choroby [127,128].

Pomimo znacznego postępu w diagnostyce i terapii celowanej, skuteczność leczenia nowotworów jest często ograniczona przez wystąpienie zjawiska oporności terapeutycznej i toksyczności ogólnoustrojowej stosowanych leków. Znany przykładem jest cisplatyna, szeroko stosowana w leczeniu nowotworów. Jej działanie polega na wiązaniu z DNA komórkowym i tworzeniu adduktów, co prowadzi do uszkodzenia jego struktury, blokowania transkrypcji i replikacji, a w konsekwencji indukuje apoptozę.

Pomimo wysokiej cytotoksyczności wobec wielu typów nowotworów, jej stosowanie często wiąże się z wystąpieniem licznych działań niepożądanych oraz możliwością nabycia oporności przez komórki nowotworowe. W związku z tym istnieje realna potrzeba poszukiwania nowych strategii terapeutycznych, które będą zarówno skuteczne, jak i bardziej bezpieczne [129,130].

1.4.2 Rak prostaty

Jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych u mężczyzn jest rak gruczołu krokowego (prostaty), zajmujący drugie miejsce pod względem występowania i piąte pod względem śmiertelności [124]. Częstość zachorowań uzależniona jest od położenia geograficznego, najwyższe wskaźniki obserwuje się w rozwiniętych regionach takich jak Australia, Ameryka Północna i Europa Zachodnia, a najwyższą śmiertelność obserwuje się w krajach słabiej rozwiniętych, zwłaszcza wśród populacji Karaibów i Afryki Subsaharyjskiej. Na to zróżnicowanie wpływają zarówno czynniki genetyczne, jak i styl życia oraz dostęp do badań diagnostycznych. W 2021 roku w Polsce to właśnie rak gruczołu krokowego był diagnozowany najczęściej, odpowiadając za ponad 21% wszystkich przypadków, przy czym częstość zachorowań rosła wraz z wiekiem. Jednocześnie był to drugi najbardziej śmiertelny nowotwór złośliwy w kraju, będący przyczyną 11% zgonów [131–133].

Rak prostaty we wczesnym stadium może mieć łagodny przebieg i być bezobjawowy, w niektórych przypadkach nie wymagając nawet leczenia. Najczęstsze objawy, takie jak trudności z oddawaniem moczu i jego zwiększona częstotliwość, mogą również wynikać z przerostu prostaty. W bardziej zaawansowanym stadium choroby mogą wystąpić przerzuty, głównie do kości i węzłów chłonnych [134]. Rak prostaty jest nowotworem hormonozależnym, co oznacza, że na jego rozwój mają wpływ męskie hormony, głównie testosteron. Podstawową metodą leczenia zaawansowanego stadium choroby jest terapia deprivacji androgenów (ADT, ang. *androgen deprivation therapy*), mająca na celu obniżenie stężenia testosteronu w surowicy krwi. Niestety, pomimo początkowej wrażliwości na leczenie hormonalne, u wielu pacjentów z czasem rozwija się oporność na kastrację (CRPC, ang. *castration-resistant prostate cancer*) [135]. W zaawansowanych stadiach choroby, szczególnie w przypadku wystąpienia oporności na terapię hormonalną, stosuje się także chemioterapeutyki. Przykładem jest docetaksel, którego mechanizm działania opiera się na stabilizacji mikrotubul, co skutkuje zahamowaniem podziałów komórkowych i indukcją apoptozy.

Uzupełnienie terapii stanowią leki nowej generacji ukierunkowane na szlak androgenowy, w tym abirateron (hamujący biosyntezę androgenów) oraz enzalutamid, będący silnym antagonistą receptora androgenowego, a także terapie ukierunkowane molekularnie, obejmujące na przykład denosumab, czyli ludzkie przeciwciało monoklonalne stosowane jako leczenie wspomagające przy przerzutach do kości [136,137].

1.4.3 Charakterystyka wybranych linii komórkowych

W celu oceny aktywności biologicznej i selektywności otrzymanych kompleksów, w niniejszej pracy wykorzystano pięć linii komórkowych, w tym komórki nowotworowe, modele transformowane oraz komórki prawidłowe, stanowiące punkt odniesienia w analizie cytotoxyczności.

DU-145

Linia komórkowa DU-145 została wyizolowana z przerzutu raka prostaty do mózgu u 69-letniego pacjenta [138–140]. Linia ta jest szeroko stosowana jako model *in vitro* do badań raka prostaty w stadium zaawansowanym i opornym na kastrację. Komórki tej linii są androgenoniezależne, co oznacza że nie wykazują wrażliwości na hormony płciowe. Wbrew pierwotnym założeniom o braku receptora androgenowego, badacze odkryli ekspresję zarówno mRNA, jak i białka tego receptora, jednak szlak ten pozostaje transkrypcyjnie nieaktywny [141].

Na poziomie molekularnym komórki linii DU-145 wykazują szereg nieprawidłowości, typowych dla agresywnego fenotypu raka prostaty. Posiadają mutację genu *TP53*, co skutkuje deregulacją cyklu komórkowego i osłabieniem odpowiedzi apoptotycznej [142]. Dodatkowo występuje w nich ciągła aktywacja pro-przeżyciowych szlaków sygnałowych, w szczególności szlaków czynnika jądrowego NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa B*) oraz kinaz PI3K/AKT, co zwiększa proliferację komórek, sprzyja nadekspresji białek antyapoptycznych i obniżeniu ekspresji białek proapoptycznych, a także zapewnia oporność na terapie [143–146]. W komórkach tej linii występuje zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu w porównaniu z komórkami prawidłowymi, wraz z zaburzeniami równowagi redoks. Wysoki poziom ROS może doprowadzić do uszkodzenia DNA i indukcji apoptozy, jednak komórki nowotworowe mają zdolność do zwiększania potencjału antyoksydacyjnego, co może odgrywać rolę w ich mechanizmach obronnych i odpowiedzi na związki o potencjalnym działaniu prooksydacyjnym [147,148].

RWPE-2

Linia komórkowa RWPE-2 stanowi model transformowanego nabłonka prostaty, pochodzący z wyizolowanych w 1997 roku histologicznie prawidłowych komórek prostaty RWPE-1, które zostały wcześniej unieśmiertelnione przy wykorzystaniu wirusa HPV-18 [149–151]. Komórki RWPE-2 otrzymano poprzez transformację komórek RWPE-1 przy użyciu wirusowego onkogenu v-Ki-ras (ang. *viral Kirsten rat sarcoma*), co nadało im cechy komórek nowotworowych, przy zachowaniu części właściwości komórek prawidłowych. Linia ta wykazuje zwiększoną proliferację i potencjał do tworzenia guzów niż komórki prawidłowe, jednocześnie zachowując ekspresję części markerów nabłonkowych specyficznych dla komórek zdrowych. Jest wykorzystywana do badania wczesnej transformacji nowotworowej, a także jako model porównawczy do badań z liniami nowotworowymi, takimi jak DU-145 [152,153].

BJ

Linia komórkowa BJ pochodzi z normalnych ludzkich fibroblastów, wyizolowanych z naskórka napletka noworodka [154,155]. Komórki tej pierwotnej linii mają ograniczoną zdolność replikacji i wykazują oznaki starzenia komórkowego, czyli wchodzi w stan permanentnego zatrzymania cyklu komórkowego. Przed osiągnięciem tego stanu wykazują jednak dłuższą żywotność w porównaniu z innymi liniami komórkowymi ludzkich fibroblastów, przechodząc nawet 70–90 podziałów komórkowych w standardowych warunkach laboratoryjnych [156,157]. Dzięki ścisłej regulacji cyklu komórkowego i wolniejszemu tempu proliferacji, linia BJ jest szeroko stosowana jako niezłośliwy model w badaniach nad starzeniem się komórek i cytotoksycznością. Komórki tej linii stanowią dobry punkt odniesienia w ocenie selektywności związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym ze względu na prawidłowe reakcje na uszkodzenia DNA i stres oksydacyjny [158–161]. Były również wykorzystywane jako system modelowy do badania wpływu infekcji wirusowej na komórki gospodarza, w tym wirusem brodawczaka ludzkiego, adenowirusem i wirusem opryszczki [162–164].

Caco-2

Linia komórkowa Caco-2 została wyprowadzona z gruczolakoraka okrężnicy wyizolowanego od 72-letniego pacjenta [165–167]. W warunkach hodowlanych po osiągnięciu konfluencji komórki różnicują się spontanicznie, w ciągu 15–21 dni tworząc funkcjonalną monowarstwę z mikrokosmkami, która morfologicznie i funkcjonalnie naśladuje nabłonek jelita cienkiego, stanowiąc efektywną barierę dla cząsteczek hydrofilowych i odzwierciedlając cechy nabłonka jelitowego w kontekście przepuszczalności [168,169]. Dlatego też odpowiednio standaryzowany model oparty o komórki Caco-2 został zatwierdzony przez Europejską Agencję Leków (EMA, ang. *European Medicines Agency*) i Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) jako narzędzie do oceny przenikania związków przez barierę jelitową, badania biodostępności doustnej u ludzi i klasyfikacji leków zgodnie z Systemem Klasyfikacji Biofarmaceutycznej (BCS, ang. *Biopharmaceutics Classification System*). Linia ta pełni również rolę jako model referencyjny do oceny bezpieczeństwa farmakologicznego i selektywności działania nowych związków [170–172].

HaCaT

Linia komórkowa HaCat pochodzi od prawidłowych komórek skóry 62-letniego mężczyzny, które uległy spontanicznej transformacji. Dzięki temu zyskały cechy komórek nieśmiertelnych, wykazując nieograniczony potencjał proliferacyjny (>300 pasaży), jednocześnie zachowując zdolność do prawidłowego różnicowania i nie wykazując zdolności do tworzenia guzów [173–175]. Wykazano, że linia ta posiada mutację w obu allelach genu *TP53*, prawdopodobnie związaną z uszkodzeniami indukowanymi promieniowaniem UV, co skutkuje zwiększonym poziomem ekspresji białka p53 i może wpływać na regulację proliferacji. Mimo tych zmian, komórki zachowują stabilny fenotyp keratynocytów i zdolność do różnicowania [176–178]. Linia ta znajduje szerokie zastosowanie jako model w badaniach dermatologicznych, alergicznych i toksykologicznych [179–182]. Wykorzystywana była między innymi do badań nad trójwymiarową rekonstrukcją skóry, do analizy procesów różnicowania i odpowiedzi zapalnej keratynocytów, badań metabolizmu witaminy D₃ w skórze, a także oceny aktywności biologicznej i cytotoksyczności związków [183–186].

1.5 Problem narastającej oporności bakterii

Jednym z najpoważniejszych współczesnych wyzwań dla zdrowia publicznego, obok chorób krążenia i nowotworów, jest narastająca oporność drobnoustrojów na antybiotyki. Sprawia ona, że dostępne terapie przeciwdrobnoustrojowe przestają być skuteczne, co wiąże się z wydłużonym czasem leczenia i zwiększoną śmiertelnością, a także zwiększonymi kosztami opieki zdrowotnej [187].

Zgodnie z danymi globalnymi z 2019 roku, zakażenia bakteryjne przyczyniły się do około 7,7 miliona zgonów rocznie, przy czym 4,95 miliona związane było z patogenami wykazującymi lekooporność, a blisko 1,3 miliona wynikało bezpośrednio z zakażeń wywołanych przez szczepy niewrażliwe na znane i dostępne antybiotyki. Największy udział miały patogeny takie jak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, odpowiadając za około 73% zgonów [188,189]. Prognozy Światowej Organizacji Zdrowia wskazują, że jeśli obecny trend się utrzyma, to do 2050 roku zakażenia spowodowane opornymi patogenami mogą doprowadzić do blisko 10 milionów zgonów rocznie, a rutynowe infekcje staną się trudne lub wręcz niemożliwe do wyleczenia [188].

Istotną rolę w szybkim rozprzestrzenianiu się lekooporności odgrywa narastająca presja selekcyjna, wynikająca przede wszystkim z niewłaściwego i nadmiernego stosowania antybiotyków przez ludzi. Do przyczyn zaliczyć można nieprawidłowe dawkowanie leków przez pacjentów, w tym przedwczesne przerywanie terapii po ustąpieniu pierwszych objawów, złe dawkowanie i niezachowanie odpowiednich odstępów pomiędzy dawkami, a także zjawisko samoleczenia preparatami pozostałymi po poprzednich infekcjach. Często stosuje się również leki przeciwbakteryjne w przypadku infekcji wirusowych, wobec których są one nieskuteczne. Problem uwidocznił się podczas pandemii COVID-19, w trakcie której obserwowano powszechne stosowanie antybiotyków u pacjentów, pomimo stosunkowo niskiego odsetka jednoczesnych infekcji bakteryjnych. Znaczący wpływ ma również wykorzystywanie antybiotyków w hodowli zwierząt oraz ich obecność w środowisku, co może sprzyjać selekcji szczepów opornych [189,190].

Oporność bakterii może być klasyfikowana jako wrodzona (naturalna) oraz nabyta. Oporność wrodzona jest uwarunkowana genetycznie i wynika z cech strukturalnych i metabolicznych danego mikroorganizmu, obejmujących między innymi obecność enzymów inaktywujących antybiotyki, brak specyficznego celu molekularnego dla danego leku, czy niską przepuszczalność ściany komórkowej. Różnice w budowie osłon komórkowych mają duże znaczenie podczas wnikania cząsteczek terapeutycznych do wnętrza komórki, dlatego też w badaniach przesiewowych *in vitro* stosuje się panele mikrobiologiczne obejmujące zarówno szczepy Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Ten rodzaj oporności nie wymaga wcześniejszego kontaktu z antybiotykiem [191,192]. Większym zagrożeniem jest natomiast oporność nabyta, która pojawia się u szczepów pierwotnie wrażliwych na dany lek, jako odpowiedź na presję środowiskową wywieraną przez kontakt z lekiem przeciwdrobnoustrojowym. Ten rodzaj oporności może być wynikiem spontanicznych, punktowych mutacji genetycznych, a także poziomego transferu genów oporności od innych osobników, nawet pomiędzy różnymi gatunkami [189].

W wyniku nabywania oporności, mikroorganizmy wykształcają szereg mechanizmów obronnych, pozwalających im na uniknięcie szkodliwego wpływu chemioterapeutyków. Jednym z nich jest zmiana miejsca docelowego działania antybiotyku poprzez produkcję zmodyfikowanych białek, co prowadzi do zmniejszenia powinowactwa leku do jego celu molekularnego. Innym powszechnym mechanizmem jest enzymatyczna inaktywacja leku, polegająca na produkcji przez bakterie wyspecjalizowanych enzymów (na przykład β -laktamaz), które rozkładają lub modyfikują cząsteczkę terapeutyczną, zanim dotrze on do wnętrza komórki. Bakterie mogą również fizycznie zapobiegać dostarczeniu leku do wnętrza komórki, na przykład poprzez zmiany w strukturze błony komórkowej, zmniejszające jej przepuszczalność dla antybiotyków. Niektóre bakterie również aktywnie wypompowują lek na zewnątrz komórki przy użyciu specjalnych białek tworzących pompy wypływowe (tak zwane pompy efflux), co prowadzi do obniżenia stężenia leku poniżej poziomu terapeutycznego [189,191,192].

1.6 Metody stosowane w charakterystyce związków oraz ocenie ich aktywności biologicznej

W badaniach związków o potencjalnej aktywności biologicznej kluczowe znaczenie ma zastosowanie odpowiednich metod, umożliwiających zarówno zbadanie ich struktury i właściwości fizykochemicznych, jak i ocenę aktywności biologicznej. W niniejszym rozdziale zestawiono wybrane techniki wykorzystywane do charakterystyki kompleksów metali oraz badania ich właściwości przeciwutleniających, przeciwbakteryjnych i cytotoksycznych.

1.6.1 Metody charakterystyki strukturalnej

Analiza elementarna

Jedną z podstawowych metod stosowanych w charakterystyce związków chemicznych jest analiza elementarna, która już od początków rozwoju chemii organicznej stanowiła fundament do identyfikacji substancji i weryfikacji ich wzorów empirycznych [193]. Umożliwia ona ilościowe oznaczenie zawartości podstawowych pierwiastków budujących badane układy, w szczególności węgla, wodoru, azotu, a także siarki. Współczesna technika opiera się na błyskawicznym spalaniu próbki w strumieniu czystego tlenu w wysokiej temperaturze (najczęściej przekraczającej 1000°C). W wyniku całkowitego spalania powstają proste produkty gazowe, takie jak CO₂, H₂O, N₂ czy SO₂. Powstałe gazy są transportowane przez układ oczyszczający, a następnie rozdzielane z wykorzystaniem chromatografii gazowej. Ich ilość jest oznaczana przy użyciu detektora przewodności cieplnej (TCD, ang. *thermal conductivity detector*), co pozwala na precyzyjne określenie składu pierwiastkowego badanej próbki [194].

W badaniach nad związkami koordynacyjnymi analiza elementarna stanowi jedno z kluczowych narzędzi weryfikacji proponowanego wzoru sumarycznego nowo zsyntetyzowanego kompleksu. Porównanie obliczonych wartości teoretycznych z uzyskanymi wartościami eksperymentalnymi pozwala na określenie liczby skoordynowanych ligandów i cząsteczek wody oraz czystości związku. Metoda ta nie dostarcza jednak informacji o charakterze strukturalnym ani o sposobie wiązania ligandów z jodem centralnym, dlatego powinna być stosowana w połączeniu z odpowiednimi technikami spektroskopowymi [194].

Miareczkowanie kompleksometryczne

Uzupełnieniem analizy elementarnej jest miareczkowanie kompleksometryczne, pozwalające na precyzyjne oznaczenie ilości jonów metalu w otrzymanym związku. W metodzie tej często wykorzystuje się kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), zwany również kwasem wersenowym, lub jego sól sodową – wersenian disodowy (Na_2EDTA). EDTA jest ligandem posiadającym sześć atomów donorowych, zdolnym do tworzenia trwałych kompleksów z wieloma jonami metali, co pozwala na ich ilościowe oznaczenie. Stosunek stechiometryczny metalu do liganda wynosi zawsze 1:1, a reakcja kompleksowania zachodzi w jednym etapie. Punkt równoważnikowy miareczkowania wyznacza się z wykorzystaniem wskaźników metalochromowych, tworzących słabsze wiązania z jonami metali niż sam titrant. Podczas miareczkowania EDTA wypiera jony metali z takich połączeń, a barwnik zmienia kolor w wyniku przejścia z formy kompleksu w formę wolną [195].

Analiza termiczna

Do oceny właściwości i stabilności substancji w warunkach zmiennej temperatury stosuje się techniki analizy termicznej, wśród których do najczęściej stosowanych należą termogravimetria (TGA, ang. *thermogravimetric analysis*) oraz skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC, ang. *differential scanning calorimetry*). Termogravimetria polega na pomiarze zmian masy próbki w funkcji temperatury przy użyciu termowagi, nazywanej również analizatorem termogravimetrycznym. Urządzenie to, będące połączeniem mikrowagi elektronicznej, programatora temperatury oraz pieca, umożliwia zautomatyzowane ogrzewanie lub chłodzenie próbki z jednoczesnym jej ważeniem. Metoda ta dostarcza informacji na temat procesów takich jak dehydratacja, rozkład termiczny czy utlenianie związków [196]. Z kolei skaningowa kalorymetria różnicowa polega na pomiarze różnicy strumienia ciepła pomiędzy badaną próbką a materiałem odniesienia podczas kontrolowanego wzrostu temperatury. Przemiany fizyczne lub chemiczne zachodzące w próbce rejestrowane są jako odchylenia od linii bazowej i przyjmują formę piku endotermicznego lub egzotermicznego na krzywej DSC. Na podstawie ich analizy możliwe jest określenie temperatur przemian oraz towarzyszących im zmian entalpii [196].

Techniki spektroskopowe

Spektroskopia UV-Vis (ang. *ultraviolet-visible spectroscopy*) jest techniką instrumentalną opartą na zjawisku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez analizowaną substancję w zakresie nadfioletu i światła widzialnego. Pochłonięcie promieniowania powoduje przejścia elektronowe, polegające na wzbudzeniu elektronów walencyjnych (najczęściej typu $\pi \rightarrow \pi^*$ lub $n \rightarrow \pi^*$) ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. Intensywność absorpcji i położenie jej maksimum zależą od struktury związku, w szczególności od obecności chromoforów, czyli grup atomów, w obrębie których zachodzą przejścia elektronowe. Widma UV-Vis dostarczają zatem informacji na temat budowy elektronowej cząsteczek oraz umożliwiają identyfikację i charakterystykę związków, w szczególności posiadających układy sprzężonych wiązań podwójnych. W chemii koordynacyjnej przesunięcia maksimum absorpcji na widmach związków wskutek procesu kompleksowania wskazują na zmiany w strukturze elektronowej liganda, wynikające z jego koordynacji z jodem metalu [197].

Spektroskopia fluorescencyjna to wysoce czuła metoda analityczna pozwalająca na pomiar promieniowania emitowanego przez cząsteczki znajdujące się w stanie wzbudzonym. Polega na naświetleniu próbki wiązką promieniowania elektromagnetycznego, co powoduje przejście cząsteczki (fluoroforu) ze stanu podstawowego do wyższych stanów wzbudzonych. Elektrony następnie wracają do stanu podstawowego, czemu towarzyszy emisja światła w postaci fotonu. Czas pomiędzy wzbudzeniem a emisją jest rzędu nanosekund (zazwyczaj od 10^{-9} do 10^{-8} s). Wyemitowane fotony mają z reguły niższą energię i większą długość fali niż fotony pierwotnie pochłonięte przez substancję, a zjawisko to określane jest jako przesunięcie Stokesa. W przypadku związków kompleksowych obecność jonu metalu może znacznie wpłynąć na właściwości emisyjne liganda, co może doprowadzić zarówno do wygaszenia fluorescencji, jak i jej wzmocnienia. Wygaszenie fluorescencji może zachodzić na drodze różnych mechanizmów. Wygaszenie kolizyjne następuje, gdy fluorofor w stanie wzbudzonym ulega dezaktywacji na skutek kontaktu z inną cząsteczką w roztworze, natomiast wygaszenie statyczne jest efektem utworzenia niefluorescencyjnego kompleksu pomiędzy fluoroforem i wygaszaczem [198].

Spektroskopia w podczerwieni (IR, ang. *infrared spectroscopy*) oparta jest na drganiach atomów cząsteczek, spowodowanych absorpcją promieniowania podczerwonego. Energia, przy której pojawia się sygnał w widmie absorpcyjnym, odpowiada częstotliwości drgań fragmentu cząsteczki i zależy od masy atomów oraz siły wiązania. Na podstawie położenia charakterystycznych pasm absorpcyjnych możliwe jest zidentyfikowanie grup funkcyjnych w badanej cząsteczce. Zastosowanie w spektrometrach transformacji Fouriera (FT-IR, ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy*), czyli algorytmu matematycznego błyskawicznie przeliczającego skomplikowany sygnał na klasyczne widmo, znacznie poprawiło jakość widm w podczerwieni i zminimalizowało czas potrzebny na uzyskanie danych. Metoda ta jest niezwykle użytecznym narzędziem w badaniach związków koordynacyjnych z jonami metali, ponieważ umożliwia analizę przesunięć pasm odpowiadających grupom donorowym liganda, takich jak grupy hydroksylowe czy karbonylowe. Zmiany położenia pasm pochodzących od grup funkcyjnych świadczą o zaangażowaniu danej grupy w proces kompleksowania i umożliwiają określenie sposobu wiązania liganda z jonem metalu [199].

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*) to precyzyjna technika analityczna, umożliwiająca analizę środowiska chemicznego jąder atomowych, najczęściej protonów (^1H) lub atomów węgla (^{13}C), umieszczonych w silnym, zewnętrznym polu magnetycznym. W wyniku absorpcji promieniowania radiowego dochodzi do przejść pomiędzy poziomami energetycznymi jąder. Podstawowe źródło informacji w widmach NMR stanowią przesunięcia chemiczne, silnie zależne od lokalnego otoczenia elektronowego danego jądra. W układach koordynacyjnych mogą występować zmiany przesunięć chemicznych względem widma liganda, wynikające z zaangażowania konkretnych grup funkcyjnych w wiązanie z metalem, dzięki czemu możliwe jest określenie miejsca jego przyłączenia. Technika ta jednak ma pewne ograniczenia w badaniach kompleksów zawierających jony paramagnetyczne, posiadające niesparowane elektrony. Ich obecność powoduje zmianę położenia i silne poszerzenie sygnałów, co znacząco utrudnia, a czasami całkowicie uniemożliwia interpretację widm [197].

Spektrometria mas

Spektrometria mas (MS, ang. *mass spectrometry*) jest techniką polegającą na jonizacji cząsteczek, a następnie na analizie powstałych jonów w polu elektromagnetycznym. Umożliwia to wyznaczenie stosunku masy do ładunku (m/z) i identyfikację analizowanych związków [200].

Metoda laserowej desorpcji/jonizacji wspomagana matrycą (MALDI), stosowana w spektrometrach mas z analizatorem czasu przelotu (ToF), jest jedną z powszechnie stosowanych metod miękkiej jonizacji, umożliwiającą wyznaczanie mas cząsteczkowych związków bez powodowania ich znaczącej fragmentacji. Stanowi cenne narzędzie do analizy białek, peptydów, sacharydów i innych makrocząsteczek organicznych. Jako matryce stosuje się często związki organiczne o małej masie cząsteczkowej, takie jak na przykład kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy (CHCA) czy kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (2,5-DHB). Takie matryce mogą jednak generować istotne tło w zakresie niskich mas cząsteczkowych (m/z poniżej 1000 Da), co stanowi ograniczenie przy badaniu związków o małych masach [201].

Alternatywą jest zastosowanie techniki laserowej desorpcji/jonizacji wspomaganej powierzchnią (SALDI), gdzie eliminacja matrycy powoduje poprawę czułości w zakresie niskich m/z dzięki redukcji tła. W niniejszej pracy zastosowano technikę $^{109}\text{AgNPET}$ (ang. *silver-109 nanoparticle enhanced target*) LDI MS, wykorzystującą nanocząstki srebra-109 do wzmocnienia desorpcji/jonizacji laserowej. Modyfikacja ta pozwala na wzmocnienie sygnałów pochodzących od jonów analitu, a także zapewnia jednorodny rozkład próbki i powtarzalność pomiarów [202,203].

1.6.2 Wybrane metody badania aktywności przeciwutleniającej

Jedną z powszechnie stosowanych metod oceny aktywności przeciwutleniającej związków jest test z wykorzystaniem stabilnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego (DPPH $^{\bullet}$). Jest to metoda spektrofotometryczna, opierająca się na zdolności badanych substancji do neutralizacji wolnych rodników poprzez oddanie atomu wodoru lub elektronu. Rodnik DPPH $^{\bullet}$ w swojej cząsteczce posiada niesparowany elektron i charakteryzuje się intensywnym fioletowym zabarwieniem oraz maksimum absorpcji w zakresie 515–520 nm. W obecności związku wykazującego aktywność przeciwutleniającą ulega on redukcji do formy nieaktywnej (DPPH-H), co prowadzi do stopniowego zaniku zabarwienia i spadku absorbancji roztworu,

proporcjonalnego do zdolności zmiatania wolnych rodników [204]. Metoda DPPH, opisana po raz pierwszy przez Bloisa w 1958 roku, ze względu na swoją prostotę, szybkość i powtarzalność wyników jest szeroko wykorzystywana w ocenie aktywności przeciwutleniającej. Wyniki oznaczeń najczęściej przedstawia się jako procent inhibicji rodnika DPPH* względem kontroli [205].

Inną znaną metodą badania aktywności antyoksydacyjnej jest test TEAC (ang. *Trolox equivalent antioxidant capacity*), określane również jako metoda ABTS. Pozwala on na ocenę zdolności badanych związków do neutralizacji intensywnie zabarwionego kationorodnika kwasu 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) (ABTS^{•+}), a proces ten, podobnie jak w teście DPPH, zachodzi na drodze przeniesienia elektronu lub atomu wodoru. Rodnik ten musi najpierw zostać wygenerowany w roztworze poprzez utlenienie wyjściowej, nieaktywnej cząsteczki ABTS. Wprowadzenie do układu antyoksydantu powoduje redukcję rodnika i mierzalny spadek absorbancji roztworu. Zdolność przeciwutleniającą wyraża się jako równoważnik Troloxu (kwasu 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksyłowego) – związku pełniącego rolę standardu i uniwersalnego przeciwutleniacza [206].

1.6.3 Wybrane metody badania aktywności przeciwbakteryjnej

Badania wrażliwości drobnoustrojów na substancje przeciwbakteryjne mają na celu ocenę skuteczności danego związku, a także wyznaczenie stężeń hamujących wzrost lub zabijających komórki bakteryjne. W praktyce laboratoryjnej metody te dzieli się zazwyczaj na jakościowe i ilościowe [207].

Wśród metod jakościowych najpowszechniej stosowana jest opracowana w 1944 roku metoda krążkowo-dyfuzyjna. Polega ona na zaszczepieniu podłoża stałego zawiesiną bakteryjną, a następnie umieszczeniu na powierzchni bibułowych krążków nasączonych badanymi substancjami. Związek promieniście dyfunduje w głąb agaru, tworząc gradient stężeń, co po odpowiednim czasie inkubacji skutkuje pojawieniem się stref zahamowania wzrostu. Ich średnica pozwala na klasyfikację mikroorganizmów jako wrażliwych, średnio wrażliwych lub opornych na działanie danego czynnika [207,208].

Większej precyzji dostarczają metody ilościowe. Zalicza się do nich m.in. metodę seryjnych rozcieńczeń, wykonywaną w probówkach jako makrorozcieńczenia lub na 96-dołkowych płytkach jako mikrorozcieńczenia. Zgodnie z wytycznymi m.in. Instytutu Norm Klinicznych i Laboratoryjnych [209], metoda mikrorozcieńczeń pozwala na precyzyjne wyznaczenie wartości MIC, czyli minimalnego stężenia hamującego widoczny wzrost mikroorganizmów. Im niższa jest wartość MIC, tym wyższą aktywnością przeciwbakteryjną charakteryzuje się badany związek [207].

Metoda seryjnych rozcieńczeń może stanowić również punkt wyjścia do wyznaczenia minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC, ang. *minimum bactericidal concentration*). W tym celu na stałe podłoże agarowe wykonuje się posiew z probówki lub dołka, w których nie zaobserwowano widocznego zmętnienia (stężenia równe i wyższe od MIC). Wartość MBC to stężenie zdolne do zabicia 99,9% wyjściowej populacji mikroorganizmów, co w praktyce laboratoryjnej często definiuje się jako wzrost mniej niż 10 kolonii na płytce. W celu oceny charakteru działania danego czynnika *in vitro*, wyznacza się stosunek MBC/MIC. Jeżeli wartość ta jest mniejsza bądź równa 4, preparat uznaje się za bakteriobójczy, natomiast przy stosunku MBC/MIC > 4 działanie określa się jako bakteriostatyczne. Substancje o wartościach MBC zbliżonych do MIC charakteryzują się wysoką aktywnością bakteriobójczą [210].

1.6.4 Wybrane metody badania cytotoksyczności

Test wychwytu czerwieni obojętnej (NR, ang. *neutral red uptake assay*), opracowany w 1985 roku przez Borenfreund i Puernerera, jest czułą i jedną z najczęściej stosowanych metod oceny cytotoksyczności *in vitro* [211]. Zasada metody opiera się na zdolności żywych, aktywnych metabolicznie komórek do wychwytu i akumulacji tego słabo zasadowego barwnika w lizosomach. Czerwień obojętna wnika do komórek na drodze dyfuzji biernej, a następnie ulega protonacji w kwaśnym środowisku lizosomów, co prowadzi do jej zatrzymania i gromadzenia w organellach. Akumulacja barwnika zależy od zachowanej integralności błon lizosomalnych oraz utrzymania prawidłowego gradientu pH pomiędzy wnętrzem lizosomu a cytozolem. Komórki uszkodzone lub martwe tracą tę zdolność. W celu wykonania pomiaru ilościowego, po inkubacji z barwnikiem komórki traktuje się roztworem odbarwiającym (zazwyczaj zakwaszonym roztworem etanolu), co powoduje zmianę pH środowiska, zwiększenie przepuszczalności błon i ostatecznie uwolnienie zgromadzonego barwnika do otoczenia. Intensywność uzyskanego zabarwienia,

oznaczana spektrofotometrycznie, jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek [212,213].

Inną szeroko stosowaną metodą pomiaru aktywności metabolicznej i żywotności jest test wykorzystujący bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy (MTT). Zasada metody opiera się na redukcji żółtej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej do fioletowego, nierozpuszczalnego produktu (formazanu). Za redukcję MTT odpowiada głównie zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH), a reakcja zachodzi w mitochondriach, cytozolu i w obrębie błon komórkowych. Proces ten zachodzi sprawnie jedynie w żywych komórkach, a ilość wytworzonego formazanu jest wprost proporcjonalna do liczby aktywnych metabolicznie komórek [214].

2 Cel i zakres pracy

Celem niniejszej pracy była synteza i analiza fizykochemiczna kompleksów 3-hydroksyflawonu z jonami kobaltu(II), manganu(II) i cynku(II) a także ocena ich aktywności biologicznej: antyoksydacyjnej, antybakteryjnej i antynowotworowej.

Zakres pracy obejmował:

1. Przegląd literatury;
2. Syntezę kompleksów 3-hydroksyflawonu z jonami metali Co(II), Mn(II) i Zn(II);
3. Analizę budowy i właściwości fizykochemicznych otrzymanych kompleksów;
4. Analizę właściwości przeciwutleniających 3-hydroksyflawonu i otrzymanych kompleksów;
5. Analizę aktywności przeciwbakteryjnej 3-hydroksyflawonu i jego pochodnych;
6. Analizę cytotoksyczności uzyskanych pochodnych w układzie prawidłowych i nowotworowych linii komórkowych;
7. Ocenę wpływu kompleksowania na działanie związku wyjściowego;
8. Analizę wyników.

3 Część doświadczalna

W niniejszym rozdziale przedstawiono spis wykorzystywanych odczynników, wykaz sprzętu laboratoryjnego, materiałów badawczych oraz opis metod zastosowanych podczas badań.

3.1 Wykaz stosowanych odczynników

- 3-hydroksyflawon (Alfa Aesar, nr kat. A18110-03, USA)
- Acetanilid, cz.d.a. (Chempur, nr kat. 111009706, Polska)
- Amoniak, 25%, cz.d.a. (Avantor, nr kat. PA-06-134965119, Polska)
- Błękit trypanu, 0,4% (Bio-Rad, nr kat. 1450021, USA)
- Bromek potasu, do spektroskopii FT-IR (Chempur, nr kat. 617397400, Polska)
- Bufor fosforanowy Dulbecco, DPBS (ATCC, nr kat. 30-2200, USA)
- Chlorek cynku(II), cz.d.a. (Avantor, nr kat. PA-06-264170420, Polska)
- Chlorek kobaltu(II), cz.d.a. (Chempur, nr kat. 115123404, Polska)
- Chlorek manganu(II), cz.d.a. (Avantor, nr kat. 615960115, Polska)
- Chlorek sodu, cz.d.a. (Chempur, nr kat. 117941206, Polska)
- Cisplatyna (Sigma-Aldrich, nr kat. C2210000, USA)
- Czerwień obojętna, 0,33% (Sigma-Aldrich, nr kat. N2889, USA)
- Dimetylosulfotlenek, DMSO, $\geq 95,5\%$ (Carl ROTH, nr kat. A994.2, Niemcy)
- Etanol, 99,9%, cz.d.a. (Pol-Aura, nr kat. PA-01-0400-W, Polska)
- Kwas chlorowy(VII), 70%, cz.d.a. (Chempur, nr kat. 115649708, Polska)
- Kwas octowy, 99,5%, cz.d.a. (Chempur, nr kat. 115687607, Polska)
- Metanol, cz.d.a. (Chempur, nr kat. 116219904, Polska)
- Minimalne podłoże podstawowe Eagle'a, EMEM (ATCC, nr kat. 30-2003, USA)
- Octan sodu, cz.d.a. (Avantor, nr kat. PA-06-805670119, Polska)
- Oksacylina (Merck, nr kat. 46589, Niemcy)

- Oranż ksylenolowy (Chempur, nr kat. 237045902, Polska)
- Oranż metylowy (Pol-Aura, nr kat. PA-01-0222-A, Polska)
- Płodowa surowica bydlęca, FBS (ATCC, nr kat. 30-2020, USA)
- Płynne podłoże Mueller-Hinton, MHB (Merck, nr kat. 70192, Niemcy)
- Podłoże agarowe Mueller-Hinton, MHA (Merck, nr kat. 70191, Niemcy)
- Podłoże CO₂ Independent Medium (Gibco, nr kat. 18045-054, USA)
- Podłoże dla keratynocytów pozbawione surowicy, K-SFM (Gibco, nr kat. 17005-042, USA)
- Rifampicyna (Sigma-Aldrich, nr kat. 557303, USA)
- Rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowy, DPPH^{*} (Sigma-Aldrich, nr kat. D9132, USA)
- Roztwór penicyliny i streptomycyny, 10000 U/ml / 10000 µg/ml (ATCC, nr kat. 30-2300, USA)
- Roztwór trypsyny/EDTA, 0,25% (w/v) / 0,53 mM (ATCC, nr kat. 30-2101, USA)
- Wersenian disodowy, cz.d.a. (Avantor, nr kat. PA-06-879810112, Polska)
- Wodorotlenek sodu, cz.d.a. (Chempur, nr kat. 118109252, Polska)
- Zestaw *ApoTox-GloTM Triplex Assay* (Promega, nr kat. G6320, USA)
- Zestaw *RealTime-GloTM Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay* (Promega, nr kat. JA1011, USA)
- Zmodyfikowane podłoże Dulbecco Eagle'a, DMEM (ATCC, nr kat. 30-2002, USA)

3.2 Aparatura

- Analizator elementarny CHN/CHNS EuroEA3000 (EuroVector, Włochy)
- Autoklaw Classic 2100 (Prestige Medical, Wielka Brytania)
- Automatyczny licznik komórek TC20 (Bio-Rad, USA)
- Inkubator CO₂ Heracell 240 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Inkubator z wytrząsaniem Innova 40 Shaker (Eppendorf, Niemcy)

- Kalorymetr DSC-822e (Mettler Toledo, Szwajcaria)
- Komora laminarna klasy II Airstream Max (ESCO, Singapur)
- Konduktometr CX-505 (Elmetron, Polska)
- Łaźnia wodna Precision GP 05 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Mieszadło magnetyczne z grzaniem MS 11 (WIGO, Polska)
- Mikroskop odwrócony DMi1 (Leica, Niemcy)
- pH-metr CP-551 (Elmetron, Polska)
- Pipety automatyczne
- Spektrofluorymetr F-2710 (Hitachi, Japonia)
- Spektrofotometr FT-IR Alpha (Bruker, Niemcy)
- Spektrofotometr UV-VIS-NIR V-670 (Jasco, Japonia)
- Spektrofotometr Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Spektrometr masowy UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Niemcy)
- Spektrometr NMR Avance II 500 (Bruker, Niemcy)
- Termograwimetr TGA/DSC1 (Mettler Toledo, Szwajcaria)
- Waga analityczna AS 62.R2 Plus (Radwag, Polska)
- Wirówka laboratoryjna MPW-223e (MPW Med. Instruments, Polska)
- Wytrząsarka do mikropłytek PSU-2T (Biosan, Łotwa)

3.3 Materiał biologiczny

Linie komórkowe BJ (CRL-2522), RWPE-2 (CRL-3608), DU-145 (HTB-81), Caco-2 (HTB-37) uzyskano z ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA). Linia komórkowa HaCaT (nr kat. 300493) została pozyskana z firmy Cytion (Cytion Biotech GmbH, Monachium, Niemcy).

Certyfikowane szczepy bakteryjne *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 oraz *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 pochodziły z kolekcji Katedry Biotechnologii i Bioinformatyki Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej.

3.4 Metody badawcze

3.4.1 Synteza kompleksów jonów metali z flawonoidami

W ramach niniejszej pracy otrzymano trzy kompleksy 3-hydroksyflawonu (3HF) z jonami kobaltu(II), manganu(II) i cynku(II), dalej określane jako Co(II)-3HF, Mn(II)-3HF oraz Zn(II)-3HF. Syntezy przeprowadzono na podstawie syntez próbnych, wykonanych przez pracowników i dyplomantów Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej. Po wybraniu warunków optymalnych przystąpiono do syntez właściwych, które przeprowadzono w stosunku molowym metalu do liganda 1:2 [215].

Bezpośrednio przed syntezami przygotowano roztwory wyjściowe: 3-hydroksyflawonu (3HF) w metanolu, pełniącego rolę liganda oraz odpowiednich chlorków metali – kobaltu(II), manganu(II) i cynku(II) – w wodzie dejonizowanej, stanowiące źródło jonów metali. Roztwory sporządzono na gorąco (ok. 50°C), a końcowe stężenie każdego z nich wynosiło 0,01 M. Dokładne masy i objętości użytych odczynników przedstawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Skład roztworów wyjściowych wykorzystywanych do syntez

Odczynnik	Naważka [g]	Rozpuszczalnik	Objętość końcowa [ml]	Stężenie [M]
3HF	2,382	metanol	1000	0,01
CoCl ₂	0,595	woda dejonizowana	250	0,01
MnCl ₂	0,495	woda dejonizowana	250	0,01
ZnCl ₂	0,341	woda dejonizowana	250	0,01

Wstępnie przygotowane roztwory flawonoidu i soli metali podgrzano do temperatury ok. 60°C. Następnie do zlewki zawierającej 100 ml roztworu 3-HF, przy ciągłym intensywnym mieszaniu, dodano 50 ml odpowiedniego roztworu zawierającego jony metalu. pH mieszaniny regulowano za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (stężenie 0,1 M i 0,01 M) do wartości około 7,6. Proces prowadzono przy stałym mieszaniu i ogrzewaniu przez około godzinę, do momentu wytrącenia się osadu. Po zakończeniu reakcji, mieszaniny pozostawiono na 24 godziny w ciemności w temperaturze pokojowej. Powstałe osady oddzielono przez wirowanie (4000 obr./min, 10 minut), czterokrotnie przemyto mieszaniną metanolu i wody w stosunku objętościowym 1:1 w celu usunięcia pozostałości jonów, a następnie suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej do uzyskania suchej masy.

3.4.2 Charakterystyka uzyskanych kompleksów

W celu scharakteryzowania otrzymanych kompleksów zastosowano zestaw metod analitycznych, obejmujących analizę elementarną (oznaczenie C, H), miareczkowanie kompleksometryczne, techniki analizy termicznej: termogravimetrię (TGA) oraz skaningową kalorymetrię różnicową (DSC), techniki spektroskopowe: spektroskopię UV-Vis, spektroskopię fluorescencyjną, spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), a także spektrometrię mas z laserową desorpcją/ionizacją wspomaganą powierzchnią (SALDI-ToF-MS⁴). Dodatkowo wykonano pomiary przewodnictwa elektrycznego roztworów oraz zbadano rozpuszczalność kompleksów w metanolu.

Ogólna charakterystyka kompleksów

Zawartość węgla i wodoru w badanych próbkach oznaczono metodą elementarnej analizy spaleniowej przy użyciu analizatora elementarnego CHN/CHNS Euro EA3000 (EuroVector), stosując kapsułki cynowe. Metoda ta polega na błyskawicznym spalaniu próbek w strumieniu czystego tlenu w piecu rozgrzanym do temperatury w zakresie 950–1200°C, po którym powstałe gazy (CO₂, H₂O) są oczyszczane, rozdzielane chromatograficznie i oznaczane przy użyciu detektora przewodności cieplnej (TCD). Do pomiaru odważano po 2 mg próbki. Jako wzorzec kalibracyjny zastosowano acetanilid, wynik podano jako procentową zawartość C i H.

W celu określenia procentowej zawartości metali wykonano miareczkowanie kompleksometryczne, poprzedzone mineralizacją kompleksów. Jako tytrant zastosowano roztwór wersenianu disodowego (Na₂EDTA), natomiast wskaźnikiem był oranż ksylenolowy. W tym celu przygotowano po dwie naważki każdego z kompleksów (po ok. 25 mg), do których dodano następnie po 10 ml mieszaniny kwasu chlorowego(VII) (70%) z wodą w stosunku objętościowym 1:1 i ogrzewano w łaźni piaskowej do prawie całkowitego odparowania roztworu. Pozostałości w zlewkach po odparowaniu przeniesiono ilościowo do kolb miarowych o objętości 25 ml i uzupełniono wodą do kreski. Przygotowano roztwór buforu octanowego (0,488 M octanu sodu, 0,014 M kwasu octowego w wodzie, pH 6,3), wodny roztwór Na₂EDTA o stężeniu 0,002 M oraz roztwór amoniaku w wodzie otrzymany poprzez rozcieńczenie stężonej wody amoniakalnej (25%) wodą destylowaną w stosunku objętościowym 1:2.

⁴ (ang. *surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*)

Następnie do kolb stożkowych dodano po 10 ml badanych roztworów, 50 ml wody dejonizowanej oraz 2–3 krople oranżu metylowego (czerwone zabarwienie roztworu). Roztwory zobojętniono przy użyciu wcześniej przygotowanego roztworu amoniaku (żółte zabarwienie roztworu), a następnie dodano po 15 ml buforu octanowego. Do próbek dodano szczyptę oranżu ksylenolowego (mieszanka z NaCl w stosunku wagowym 1:100) (fioletowe zabarwienie roztworu) i miareczkowano roztworem Na₂EDTA do momentu zmiany barwy na pomarańczową. Zawartość metalu w kompleksach obliczono przy wykorzystaniu wzoru (1):

$$\%_{met} = \frac{C_{Na_2EDTA} \cdot V_{Na_2EDTA} \cdot M_{met} \cdot 2,5}{m_p} \quad (1)$$

gdzie:

$\%_{met}$ – procentowa zawartość metalu w kompleksie [%]

C_{Na_2EDTA} – stężenie roztworu Na₂EDTA [M]

V_{Na_2EDTA} – objętość roztworu Na₂EDTA użyta podczas miareczkowania [l]

M_{met} – masa molowa oznaczanego metalu [g/mol]

m_p – masa próbki [g]

2,5 – współczynnik rozcieńczenia próbki

Pomiary przewodnictwa w roztworze wykonano za pomocą konduktometru CX-505 (Elmetron). Analizy prowadzono dla roztworów badanych związków o stężeniu 0,001 M w dimetylosulfotlenku (DMSO). Pomiary przeprowadzono w temperaturze 20°C po osiągnięciu stabilnych wskazań aparatu.

W celu określenia rozpuszczalności otrzymanych kompleksów w metanolu przygotowano roztwory nasycone. Nadmiar każdego z badanych związków dodano do porcji metanolu i pozostawiono na mieszadle magnetycznym na 24 godziny w temperaturze pokojowej, celem osiągnięcia stanu nasycenia. Następnie roztwory filtrowano przez filtry strzykawkowe o wielkości porów 0,22 μm w celu usunięcia nierozpuszczonego osadu. Pobrano po 5 ml każdego roztworu i przeniesiono na uprzednio zważone, suche szalki Petriego. Roztwory odparowano do sucha, po czym ponownie zważono szalki z pozostałością osadu i obliczono rozpuszczalność w jednostkach mg/ml.

Analizy termiczne

Zawartość wody w otrzymanych kompleksach określono za pomocą analizy termograwimetrycznej (TGA), przeprowadzonej przy użyciu analizatora TGA/DSC1 (Mettler Toledo). Pomiary wykonano w zakresie temperatur od 25 do 800°C, przy szybkości nagrzewania 20°C/minutę w atmosferze powietrza.

Skaningową kalorymetrię różnicową (DSC) przeprowadzono z użyciem kalorymetru DSC-822e (Mettler Toledo) w zakresie temperatur od -30 do 250°C, z szybkością nagrzewania 10°C/minutę w atmosferze azotu.

Pomiary spektroskopowe

Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność otrzymanych kompleksów w metanolu, pomiary spektroskopii UV-Vis wykonano dla ich nasyconych roztworów metanolowych. Widma 3HF zarejestrowano natomiast dla roztworu o stężeniu 40 µM. Pomiary prowadzono przy użyciu spektrofotometru UV-VIS-NIR V670 (Jasco), w zakresie długości fal od 200 do 550 nm.

Pomiary fluorescencji roztworów 3HF i kompleksów w DMSO przeprowadzono przy wykorzystaniu spektrofluorymetru F-2710 (Hitachi). Widma zostały zarejestrowane w zakresie długości fal emisji od 220 do 800 nm, przy trzech długościach fal wzbudzenia (259 nm, 346 nm i 418 nm), stężenie roztworów wynosiło 40 µM.

Analizy w podczerwieni wykonano z użyciem spektrofotometru FT-IR Alpha (Bruker). Widma zarejestrowano z wykorzystaniem techniki pastylek KBr, przygotowanych poprzez homogenizację w moździerz 2 mg próbki z około 200 mg suchego bromku potasu. Pomiary wykonano w zakresie częstotliwości 4000–450 cm⁻¹ w trybie transmitancji, po uprzedniej rejestracji widma tła. W celu sprawdzenia stabilności otrzymanych kompleksów, pomiary powtórzono po 24 miesiącach od syntezy. Widma analizowano przy użyciu programu SpectraGryph 1.2.

Spektroskopię NMR przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometru NMR Avance II 500 (Bruker). Widma ¹H-NMR roztworów w deuterowanym DMSO rejestrowano w temperaturze pokojowej. Przesunięcia chemiczne δ podano w ppm względem sygnału resztkowego DMSO-d₆. Widma opracowane zostały przy użyciu programu MestReNova.

Spektrometria mas

Analizy uzyskanych kompleksów z wykorzystaniem spektrometrii mas przeprowadzono przy użyciu spektrometru masowego UltrafleXtreme (Bruker) posiadającego analizator czasu przelotu (ToF, ang. *time of flight*). Widma rejestrowano z zastosowaniem techniki SALDI-ToF-MS. Jako matrycę zastosowano powierzchnię wzbogaconą nanocząstkami srebra-109 ($^{109}\text{AgNPET}$), która stanowiła aktywną powierzchnię wspomagającą proces laserowej desorpcji i jonizacji analitu. Zastosowanie nanocząstek umożliwia efektywną jonizację związków o małych masach cząsteczkowych, przy jednoczesnej redukcji tła w zakresie niskich wartości m/z . Analizy prowadzono w trybie jonów dodatnich, rejestrując sygnały w zakresie m/z 100–2000. Stężenia badanych związków rozpuszczonych w mieszaninie wody i metanolu w stosunku objętościowym 1:1 wynosiły 0,1 mg/ml. Uzyskane dane opracowano przy użyciu programu mMass 5.5.0.

3.4.3 Badanie właściwości przeciwutleniających

Właściwości przeciwutleniające 3-hydroksyflawonu i zsyntezowanych związków zbadano w celu oceny ich potencjału do neutralizacji wolnych rodników oraz określenia, jak kompleksowanie z jonami wpływa na tę aktywność. W badaniu wykorzystano metodę spektrofotometryczną, polegającą na pomiarze zdolności do zmiatania stabilnego rodnika 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazylowego (DPPH \cdot).

Przygotowano roztwór podstawowy DPPH o stężeniu 3,6 mM w metanolu, następnie rozcieńczono go 50-krotnie, uzyskując roztwór roboczy o stężeniu 72 μM . Roztwory przygotowano bezpośrednio przed pomiarami, w warunkach ograniczonego dostępu światła, by zminimalizować degradację rodnika.

Badane kompleksy przygotowano w postaci roztworów nasyconych poprzez rozpuszczanie ich w metanolu przez 24 godziny, a następnie filtrowanie w celu pozbycia się nierozpuszczonego osadu. 3-hydroksyflawon rozpuszczono w metanolu, uzyskując stężenie 0,5 mM.

Do kuwet pomiarowych dodano po 2,5 ml roztworu roboczego DPPH oraz 0,5 ml roztworu badanego związku. Próbkę kontrolną stanowił roztwór DPPH oraz metanol. Bezpośrednio po wymieszaniu składników rozpoczęto pomiar absorbancji przy długości fali 517 nm przy użyciu spektrofotometru UV-VIS-NIR V670 (Jasco). Pomiary prowadzono w trybie kinetycznym (pomiar co 1 minutę) przez 60 minut, w temperaturze pokojowej bez dostępu światła.

Aktywność przeciwutleniającą wyrażono jako procent inhibicji rodnika DPPH*, obliczony według wzoru (2):

$$\% \text{ inhibicji} = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{próba}}}{A_{\text{kontrola}}} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

A_{kontrola} – absorbancja próby kontrolnej

$A_{\text{próba}}$ – absorbancja badanego roztworu po 30 minutach.

Wartości inhibicji wyznaczono po 30 minutach reakcji, zgodnie z zaleceniami literaturowymi dotyczącymi standardowych warunków pomiaru [204].

3.4.4 Badanie właściwości przeciwbakteryjnych

Badanie właściwości przeciwbakteryjnych przeprowadzono w celu oceny potencjału biologicznego otrzymanych związków oraz określenia wpływu kompleksowania z jonami metali na aktywność wobec wybranych mikroorganizmów referencyjnych. Ocenę aktywności wykonano wobec certyfikowanych szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) oraz Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 10536).

3.4.4.1 Minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC)

Aktywność przeciwbakteryjną określono przy wykorzystaniu metody mikrorozcieńczeń, opartej na dokumencie M07-A9 Instytutu Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI) [209]. Metoda ta polega na inkubacji zawiesiny mikroorganizmów z kolejnymi, malejącymi stężeniami badanego związku i pozwala na określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC). W celu wyznaczenia minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) zastosowano metodę posiewu na stałe podłoże agarowe nie zawierające badanych związków. Wszystkie czynności związane z pracą z mikroorganizmami przeprowadzono w warunkach aseptycznych w komorze laminarnej ESCO Airstream, zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.

Przygotowano płynne podłoże Mueller-Hinton (MHB, ang. *Mueller-Hinton Broth*), odważając 21 g firmowego odczynnika (ekstrakt wołowy 2 g/l, hydrolizat kazeiny 17,5 g/l, skrobia 1,5 g/l) i rozpuszczając naważkę w 1 litrze wody dejonizowanej. Gotowy roztwór poddano procesowi sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut.

W tak przygotowanej pożywce prowadzono hodowle bakteryjne w temperaturze 37°C, poddając je co najmniej dwukrotnemu pasażowi. Aby zapewnić równomierny wzrost wykorzystano inkubator z wytrząsaniem Innova 40 Shaker (Eppendorf). We wszystkich eksperymentach wykorzystywano 24-godzinne hodowle bakteryjne, które standaryzowano do wartości 0,5 w skali McFarlanda (ok. 10^8 CFU/ml) na podstawie pomiaru gęstości optycznej przy $\lambda = 600$ nm za pomocą czytnika mikroplitek Varioskan™ LUX (Thermo Scientific). Następnie zawiesiny rozcieńczano za pomocą pożywki MHB do końcowej gęstości 10^5 CFU/ml, uzyskując hodowle robocze. Badane związki rozpuszczono w DMSO, a następnie przygotowano ich seryjne dwukrotne rozcieńczenia w pożywce MHB na płytkach 96-dołkowych, w objętości 100 μ l. Do każdego dołka dodano 100 μ l przygotowanej wcześniej roboczej hodowli bakteryjnej, co skutkowało kolejnym, dwukrotnym rozcieńczeniem zawartości dołków. Końcowe stężenia 3HF i jego kompleksów mieściły się w zakresie od 0,024 do 6,25 mg/ml. Dodatkowo oceniano wrażliwość badanych szczepów na antybiotyki referencyjne – oksacylinę i rifampicynę (stężenia w zakresie od 0,004 do 500 μ g/ml). Oksacylinę rozpuszczono w wodzie dejonizowanej, natomiast rifampicynę w DMSO. Płytki przygotowano analogicznie jak w przypadku badanych związków. W każdym eksperymencie uwzględniono kontrolę pozytywną (hodowla bakteryjna), kontrolę negatywną (pożywka, kontrola sterylności) oraz kontrolę rozpuszczalnika (DMSO w maksymalnym stężeniu 10% dla badanych związków i rifampicyny oraz woda w przypadku oksacyliny). Po przygotowaniu płytek 96-dołkowych przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny przy długości fali $\lambda = 600$ nm, a następnie inkubowano hodowle bakteryjne w obecności związków przez 24 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze tlenowej, po tym czasie dokonano wizualnej oceny zmętnienia pożywki w dołkach oraz powtórzono pomiar spektrofotometryczny przy długości fali $\lambda = 600$ nm w celu potwierdzenia obserwacji wzrokowych. Wartości MIC wyznaczono dla dołków, w których znajdowało się najniższe stężenie badanego związku, przy którym nie obserwowano zmętnienia znajdującej się tam mieszaniny (pożywka MHB, badany związek, hodowla bakteryjna). Potwierdzenia tej obserwacji dokonano poprzez odjęcie absorbancji początkowej (w czasie 0, czyli przed 24-godzinną inkubacją) od absorbancji końcowej (po 24 godzinach inkubacji), a za minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii uznano najniższe stężenie związku, przy którym wzrost absorbancji nie przekraczał 0,1. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach technicznych i trzech powtórzeniach biologicznych.

W celu wyznaczenia MBC przygotowano podłoże agarowe Mueller-Hinton (MHA, ang. *Mueller-Hinton Agar*) poprzez rozpuszczenie 38 g firmowego odczynnika (agar 17 g/l, ekstrakt wołowy 2 g/l, hydrolizat kazeiny 17,5 g/l, skrobia 1,5 g/l) w 1 litrze wody dejonizowanej. Gotowy roztwór poddano procesowi sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut. Po częściowym ochłodzeniu roztworu, pożywkę rozlano na sterylne szalki Petriego (ø 90 mm) i pozostawiono do zastygnięcia. W celu wyznaczenia wartości MBC, na gotowe szalki Petriego zawierające stałe podłoże MHA naniesiono po 20 µl zawiesiny z dołków, w których stężenie danego związku wynosiło MIC, 2×MIC oraz 4×MIC. Zawiesinę wglaskano w podłoże MHA za pomocą jednorazowych sterylnych głaszczek i pozostawiono na ok. 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym odwrócono szalki do góry dnem i przeniesiono do inkubatora (37°C) na 24 godziny. Po tym czasie obserwowano pojawienie się (lub brak) kolonii bakteryjnych, które liczono ręcznie, a za wartość MBC uznano stężenie badanego związku, przy którym obserwowano pojawienie się <10 kolonii bakteryjnych.

3.4.5 Badanie aktywności cytotoksycznej kompleksów

Aktywność cytotoksyczną 3HF oraz uzyskanych kompleksów zbadano przy pomocy testu wychwytu czerwieni obojętnej (NR) [216]. W badaniach wykorzystano następujące ludzkie linie komórkowe: prawidłowe fibroblasty skórne (BJ, ATCC CRL-2522), nieśmiertelne komórki nabłonka prostaty (RWPE-2, ATCC CRL-3608), nieśmiertelne keratynocyty (HaCaT, Cytion 300493), komórki raka prostaty (DU-145, ATCC HTB-81) oraz komórki gruczolakoraka okrężnicy (Caco-2, ATCC HTB-37). Aktywność kompleksów porównano do aktywności cytostatyka – cisplatyny. Wszystkie czynności związane z pracą z hodowlami komórkowymi przeprowadzono w warunkach aseptycznych z wykorzystaniem komory laminarnej ESCO Airstream, zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.

3.4.5.1 Prowadzenie hodowli linii komórkowych

Hodowle komórkowe oraz pasażowanie prowadzono zgodnie z zaleceniami dostawców linii komórkowych [139,150,154,166,174]. Wszystkie linie utrzymywano w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂, wykorzystując butelki hodowlane o powierzchni wzrostu 75 cm² (T-75).

Komórki linii BJ, DU-145 i Caco-2 hodowano w pożywce EMEM (ang. *Eagle's Minimum Essential Medium*), czyli minimalnym podłożu podstawowym Eagle'a zawierającym: zbilansowany roztwór soli Earle'a, aminokwasy nieegzogenne, 2 mM L-glutaminy, 1 mM pirogronianu sodu, 1500 mg/l wodorowęglanu sodu. Pożywkę wzbogacono o płodową surowicę bydlęcą (FBS, ang. *fetal bovine serum*) (stężenie końcowe 10%) oraz antybiotyki: penicylinę (100 IU/ml) i streptomycynę (100 µg/ml). Pasaże wykonywano, gdy komórki osiągały 80-90% konfluencji, przy zachowaniu limitu maksymalnie 10 pasaży w celu zachowania cech fenotypowych.

W celu oderwania komórek od podłoża, z butelek hodowlanych usunięto pożywkę, a powierzchnię dwukrotnie przepłukano 2 ml buforu fosforanowego Dulbecco (DPBS, ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*). Następnie do butelek dodano i rozprowadzono równomiernie 1 ml roztworu trypsyny/EDTA (0,25%trypsyny/0,53 mM EDTA). Po ok. 10 sekundach nadmiar roztworu trypsyny usunięto, a stopień odklejenia komórek monitorowano przy pomocy mikroskopu odwróconego DMi1 (Leica). Po całkowitym odklejeniu komórek od podłoża, działanie trypsyny zahamowano poprzez dodanie 4 ml pożywki zawierającej 10% FBS. Zawiesinę komórek delikatnie mieszano poprzez pipetowanie, a następnie oznaczano gęstość hodowli z wykorzystaniem automatycznego licznika komórek T20 (Bio-Rad). W tym celu pobierano 10 µl zawiesiny komórkowej i mieszało z równą objętością 0,4% roztworu błękitu trypanu. Następnie 10 µl otrzymanej mieszaniny nanoszono na płytkę pomiarową i wprowadzano do licznika. Na podstawie uzyskanych wyników obliczano objętość zawiesiny komórkowej niezbędną do przygotowania hodowli o założonej gęstości, przeznaczonej do dalszych eksperymentów. Ostateczna liczba wyjściowa komórek w butelce mogła się nieznacznie różnić w zależności od linii komórkowej i planowanego czasu inkubacji przed kolejnym pasażem (zgodnie z zaleceniami producenta).

Przykładowo, przy uzyskaniu zawiesiny o gęstości $1,2 \times 10^6$ komórek/ml po trypsynizacji, pobierano 0,42 ml zawiesiny komórkowej i uzupełniano objętość odpowiednią pożywką do 10 ml, co skutkowało gęstością około 5×10^5 komórek/75 cm² (butelka hodowlana T-75).

Hodowlę linii HaCaT prowadzono w analogiczny sposób, wykorzystując pożywkę DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), czyli podłoże podstawowe Eagle'a zmodyfikowane tak, by zawierało: 4 mM L-glutaminy, 4500 mg/l glukozy, 1 mM pirogronianu sodu i 1500 mg/l wodorowęglanu sodu.

Linia RWPE-2 była hodowana w pożywce K-SFM (ang. *Keratinocyte Serum-Free Medium*), czyli podłożu podstawowym, wzbogaconym o L-glutaminę, uzupełnionym o 0,05 mg/ml BPE (ang. *bovine pituitary extract*) oraz 5 ng/ml EGF, bez dodatku surowicy. Pasaże przeprowadzano na tych samych zasadach jak w przypadku pozostałych linii (przy konfluencji 80-90% oraz zachowaniu maksymalnie 10 pasaży). W celu oderwania komórek od podłoża, z butelki hodowlanej usunięto pożywkę, a powierzchnię przepłukano dwukrotnie przy wykorzystaniu 2 ml DPBS. Następnie dodano 4 ml mieszaniny roztworu trypsyny/EDTA (0,25% trypsyny/0,53 mM EDTA) i buforu DPBS w stosunku 1:1 i inkubowano w standardowych warunkach hodowlanych do momentu całkowitego odklejenia komórek od dna, proces monitorowano przy pomocy mikroskopu odwróconego DMi1. Po odklejeniu komórek, do butelki dodano 6 ml 2% roztworu FBS w DPBS w celu zahamowania działania trypsyny i przeniesiono do probówki typu Falcon. Zawiesinę następnie zwirowano z prędkością $125 \times g$ przez 7 minut, usunięto supernatant, a komórki zawieszono w świeżej pożywce. Gęstość uzyskanej zawiesiny komórek zliczono przy wykorzystaniu automatycznego licznika komórek T20, zgodnie z wcześniejszym opisem, po czym odpowiednią objętość zawiesiny przeniesiono do butelki hodowlanej zawierającej świeże medium.

3.4.5.2 Testy cytotoksyczności

W celu zbadania wpływu otrzymanych kompleksów na żywotność komórek prawidłowych (BJ, HaCaT, RWPE-2) oraz nowotworowych (Caco-2, DU-145), przeprowadzono test wychwytu czerwieni obojętnej. Metoda ta opiera się na zdolności żywych, aktywnych metabolicznie komórek do wychwytu i akumulacji tego barwnika w lizosomach. Po zakończeniu inkubacji z barwnikiem dodaje się roztwór odbarwiający (zakwaszony roztwór etanolu), który powoduje zmianę pH środowiska i zwiększenie przepuszczalności błon, prowadząc do uwolnienia zgromadzonego barwnika do pożywki. Intensywność zabarwienia – oznaczana spektrofotometrycznie – jest proporcjonalna do liczby żywych komórek [216].

Procedura przygotowania komórek do testu wychwytu czerwieni obojętnej obejmowała sporządzenie zawiesiny o określonej gęstości w pożywkach dedykowanych dla poszczególnych linii (zgodnie z opisem powyżej). Następnie na 96-dołkowe płytki mikrotitracyjne naniesiono 100 μ l hodowli komórek linii BJ w gęstości 5×10^3 komórek/dołek oraz komórki pozostałych linii w gęstości 1×10^4 komórek/dołek. Tak przygotowane płytki poddano 24-godzinnej inkubacji w standardowych warunkach hodowlanych (37°C i atmosferze 5% CO_2) w celu adhezji komórek do podłoża oraz ich adaptacji i regeneracji poprzez powrót do równowagi metabolicznej [217].

Badane związki rozpuszczono w DMSO, cisplatynę rozpuszczono w wodzie dejonizowanej, a następnie przygotowano ich roztwory robocze w dedykowanych dla poszczególnych linii komórkowych pożywkach. W przypadku pożywek EMEM oraz DMEM medium suplementowano FBS do końcowego stężenia 5%, pożywki K-SFM nie suplementowano, zgodnie z zaleceniami producenta. Wszystkie roztwory przygotowano na świeżo, bezpośrednio przed przeprowadzeniem doświadczenia. Kompleksy testowano w zakresie stężeń 5–50 μM , a na podstawie wyników uzyskanych dla kompleksu z cynkiem zakres ten zawężono do wartości 1–20 μM . Stężenia końcowe cisplatyny zawierały się w zakresie 0,125–12,5 μM . Stężenie DMSO w żadnej z prób nie przekraczało 0,4%. W każdym eksperymencie uwzględniono kontrolę komórek nie eksponowanych na związki, kontrolę sterylności pożywki oraz kontrole rozpuszczalników (DMSO o stężeniu 0,4% oraz woda dejonizowana). Po 24-godzinnej inkubacji w warunkach hodowlanych z dołków usunięto ostrożnie pożywkę i dodano po 100 μ l roztworów roboczych badanych związków. Płytki inkubowano w standardowych warunkach hodowlanych przez kolejne 48 h. Po tym czasie usunięto roztwory związków,

do każdego dołka dodano 100 µl roztworu czerwieni obojętnej (3,3% w pożywce odpowiedniej dla danej linii). Komórki inkubowano z barwnikiem przez 2 godziny w standardowych warunkach hodowlanych. Po tym czasie z płytek usunięto roztwór czerwieni obojętnej, przemyto dołki dwukrotnie za pomocą DPBS, a następnie do każdego z nich dodano po 150 µl roztworu odbarwiającego (50% etanolu, 49% wody dejonizowanej, 1% lodowatego kwasu octowego) i wytrząsano przez 10 minut.

W wyniku działania tego roztworu z komórek został uwolniony skumulowany wcześniej barwnik, który następnie oznaczono spektrofotometrycznie, mierząc absorbancję przy długości fali 540 nm.

Żywotność komórek obliczano jako procent wartości absorbancji uzyskanej po traktowaniu 3HF oraz kompleksami w odniesieniu do próby kontrolnej (komórki nietraktowane badanymi związkami), zgodnie z równaniem (3):

$$\text{Żywotność komórek [\%]} = \frac{A_{\text{próba}}}{A_{\text{kontrola}}} \cdot 100\% \quad (3)$$

gdzie $A_{\text{próba}}$ oznacza średnią wartość absorbancji dla komórek traktowanych badanym związkiem, a A_{kontrola} średnią wartość absorbancji w próbie kontrolnej.

Aktywność cytotoksyczną badanych związków określano na podstawie wartości IC_{50} (ang. *half-maximal inhibitory concentration*), definiowanej jako stężenie powodujące zmniejszenie żywotności komórek o 50% w porównaniu z próbą kontrolną. Wartości IC_{50} wyznaczano na podstawie krzywych zależności dawka-odpowiedź, przedstawiających zmiany żywotności komórek, wyrażonej jako procent wartości kontrolnej, w funkcji stężenia badanego związku. Dopasowanie krzywych przeprowadzono metodą regresji nieliniowej [218,219].

Analizę istotności statystycznej różnic pomiędzy komórkami traktowanymi różnymi stężeniami związków a próbą kontrolną oceniano przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji z testem wielokrotnych porównań Dunnetta, przyjmując poziom istotności statystycznej $p < 0,05$ (oprogramowanie GraphPad Prism (wersja 8.0.1)).

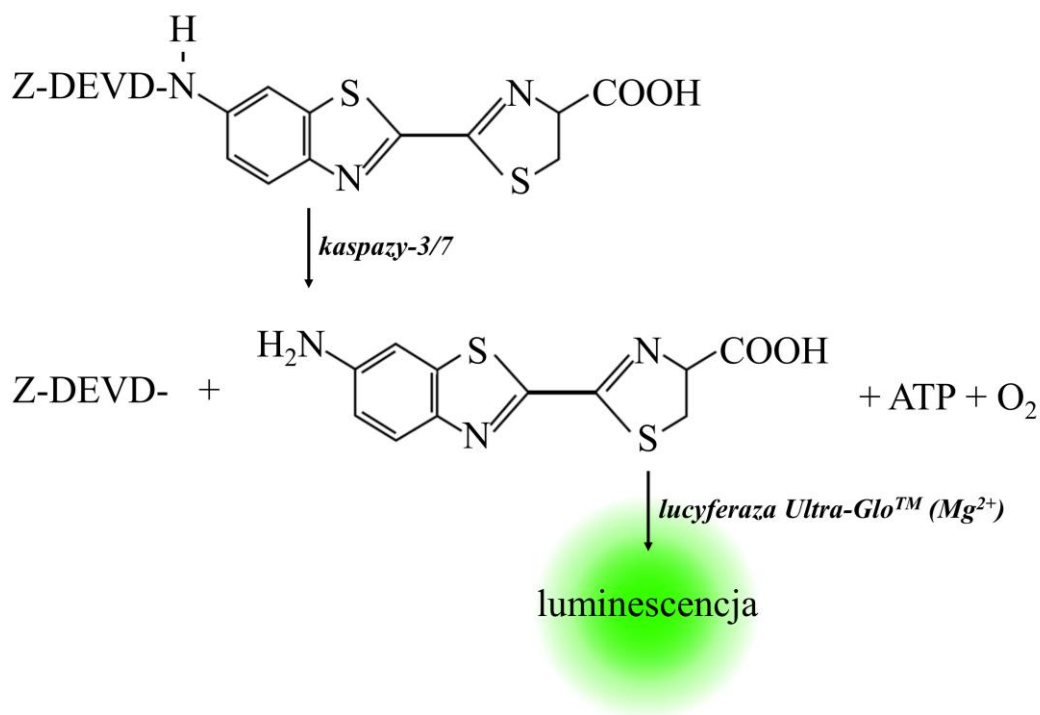
3.4.5.3 Ocena kinetyki wzrostu komórek po usunięciu związków

Dalsze analizy trwałości efektu oraz mechanizmu działania 3HF oraz badanych kompleksów przeprowadzono dla linii komórkowej DU-145, wybranej na podstawie wstępnych wyników badań cytotoksyczności [220]. W tym celu hodowlę linii komórkowej DU-145 oraz badane związki przygotowano tak jak opisano w punktach 3.4.5.1. oraz 3.4.5.2. Jediną różnicą była zastosowana gęstość komórek wysiewanych do dołków, która w tym przypadku wynosiła $1,5 \times 10^3$ komórek/dołek w 100 μl pożywki, co wynikało z wydłużonego czasu trwania doświadczenia (do 96 godzin). Stężenia 3HF, Co(II)-3HF oraz Mn(II)-3HF w DMSO zawierały się w zakresie 5–25 μM , a stężenia Zn(II)-3HF w zakresie 2–10 μM .

W każdym eksperymencie uwzględniono kontrolę komórek bez ekspozycji na związki, kontrolę sterylności pożywki oraz kontrolę rozpuszczalnika (DMSO o stężeniu 0,4%). Po 24-godzinnej inkubacji komórek DU-145 w ilości $1,5 \times 10^3$ komórek/dołek w 100 μl pożywki w warunkach hodowlanych z dołków usunięto ostrożnie pożywkę i dodano po 100 μl roztworów roboczych badanych związków. Płytki inkubowano w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO₂) przez kolejne 48 h. Po tym czasie usunięto roztwory związków, do każdego dołka dodano 100 μl świeżej pożywki EMEM. Następnie płytki inkubowano w standardowych warunkach hodowlanych przez kolejne 24 h i 48 h. Po tym czasie przeprowadzono test czerwieni obojętnej jak opisano powyżej w punkcie 3.4.5.2.

3.4.5.4 Test *ApoTox-GloTM Triplex Assay*

Test *ApoTox-GloTM Triplex Assay* przeprowadzono z wykorzystaniem linii DU-145 zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Test ten pozwala na zbadanie cytotoksyczności i żywotności komórek, a także umożliwia ocenę apoptozy poprzez pomiar aktywności kaspazy-3 i -7, będących kluczowymi enzymami wykonawczymi tego procesu (Rys. 4). Po inkubacji komórek z badanymi związkami do każdej studzienki dodaje się odczynnik Caspase-Glo[®] 3/7, zawierający detergent lizujący komórki oraz luminogeniczny substrat specyficzny dla kaspazy-3 i -7 (aminolucyferyna sprzężona z tetrapeptydową sekwencją DEVD). Aktywne kaspazy katalizują rozszczepienie substratu, prowadząc do uwolnienia aminolucyferyny, która w reakcji katalizowanej przez lucyferazę generuje sygnał luminescencyjny. Luminescencja jest proporcjonalna do poziomu aktywności kaspazy-3/7, a tym samym do stopnia indukcji apoptozy w badanych komórkach [221].



Rys. 4. Schemat zasady działania testu ApoTox-GloTM Triplex Assay w zakresie oceny zaawansowania apoptozy. Kaspazy-3/7 rozszczepiają substrat luminogeniczny DEVD-aminolucyferyny, co prowadzi do wygenerowania sygnału luminescencyjnego.

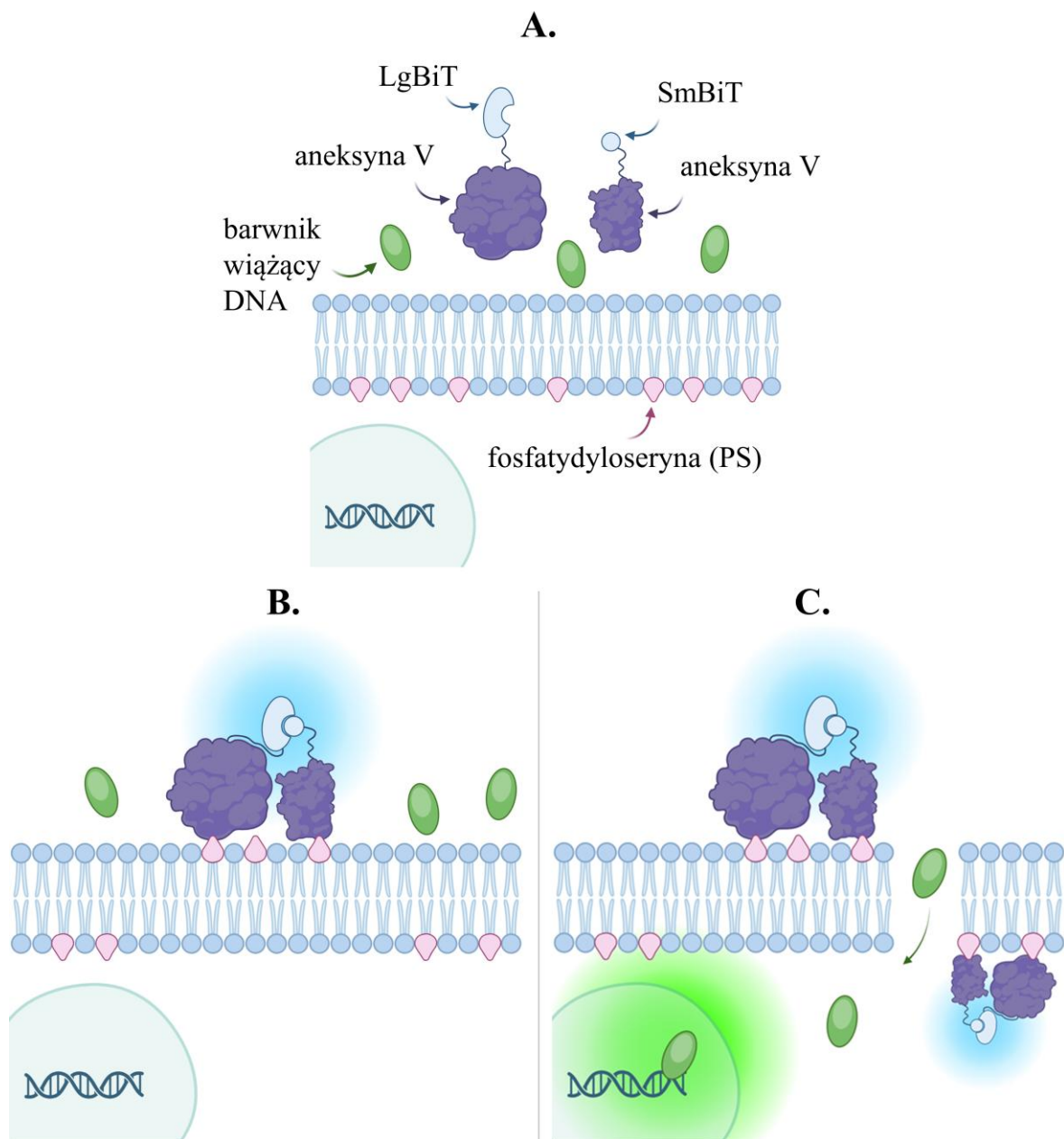
Opracowano w oparciu o [221].

Hodowlę komórek raka prostaty DU-145 prowadzono jak opisano wyżej w punkcie 3.4.5.1. Przygotowano białe płytki 96-dołkowe, w każdym dołku umieszczono komórki w ilości 1×10^4 komórek/dołek. Gotowe płytki inkubowano przez 24 godziny (37°C , 5% CO_2). Badane związki rozpuszczono w DMSO, cisplatynę rozpuszczono w wodzie dejonizowanej, a następnie przygotowano ich roztwory robocze w pożywce EMEM. Wszystkie roztwory przygotowywano na świeżo, bezpośrednio przed przeprowadzeniem doświadczenia. Stężenie 3HF, Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF zawierało się w zakresie 10–25 μM , stężenie Zn(II)-3HF w zakresie 5–10 μM , a stężenie cisplatyny w zakresie 1,56–25 μM . Końcowe stężenie DMSO w dołkach nie przekraczało 0,4%. Po 24-godzinnej inkubacji komórek DU-145 na płytkach 96-dołkowych w standardowych warunkach hodowlanych, z dołków usunięto ostrożnie pożywkę, zastępując ją roztworami roboczymi związków. Tak przygotowane płytki inkubowano przez 8 oraz 24 h w standardowych warunkach hodowlanych.

Po inkubacji komórek ze związkami do każdego dołka dodano odczynnik Caspase-Glo[®] 3/7, zawartość dołków wymieszano delikatnie na wytrząsarce i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zmierzono sygnał luminescencyjny przy użyciu czytnika mikroplatek Varioskan[™] LUX (Thermo Scientific), przy czasie integracji wynoszącym 1 s.

3.4.5.5 Test *RealTime-Glo[™] Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay*

Test *RealTime-Glo[™] Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay* przeprowadzono w celu oceny indukcji apoptozy oraz wtórnej nekrozy w komórkach linii DU-145, zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Metoda ta jest Nielitycznym testem umożliwiającym ciągły pomiar wczesnych i późnych etapów śmierci komórki w tej samej populacji. Podstawą oznaczenia apoptozy jest detekcja ekspozycji markera apoptozy – fosfatydyloseryny (PS) – na zewnętrznej warstwie błony komórkowej. Detekcję wtórnej nekrozy umożliwia utrata integralności błony komórkowej (Rys. 5) [222].



Rys. 5. Zasada działania testu RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay.

W zdrowej komórce (A.) fosfatydyloseryna (PS) znajduje się wyłącznie w wewnętrznej warstwie błony komórkowej, a integralność błony jest zachowana; nie obserwuje się sygnału luminescencyjnego ani fluorescencyjnego. Podczas wczesnej apoptozy (B.) następuje translokacja PS do zewnętrznej warstwy, co umożliwia zbliżenie białek fuzyjnych aneksyny V i podjednostek lucyferazy, przy nienaruszonej błonie komórkowej obecny jest sygnał luminescencyjny. W przypadku wtórnej nekrozy (C.) dochodzi do zaburzenia integralności błony komórkowej, barwnik wiążący DNA przenika do wnętrza komórki – obserwowany jest jednocześnie sygnał luminescencyjny i fluorescencyjny.

Opracowano w oparciu o [222].

Odczynnik detekcyjny testu zawiera dwa białka fuzyjne aneksyny V, połączone z komplementarnymi podjednostkami lucyferazy NanoBiT[®] (LgBiT oraz SmBiT), substrat lucyferazy o stopniowym uwalnianiu oraz barwnik fluorescencyjny wiążący DNA, nie posiadający zdolności do przenikania przez błony. Aneksyna V wykazuje powinowactwo do fosfatydyloseryny, która w zdrowych komórkach jest zlokalizowana wyłącznie w wewnętrznej części dwuwarstwy lipidowej, co uniemożliwia wiązanie białka i skutkuje brakiem sygnału luminescencyjnego. W trakcie wczesnej apoptozy PS ulega translokacji do zewnętrznej warstwy, co umożliwia połączenie białek fuzyjnych aneksyny V i zbliżenie podjednostek lucyferazy. Prowadzi to do powstania aktywnego enzymu katalizującego reakcję, której efektem jest luminescencja. Intensywność luminescencji jest proporcjonalna do stopnia ekspozycji fosfatydyloseryny, a co za tym idzie do zaawansowania procesu apoptozy. Natomiast w przypadku, gdy błona komórkowa ulegnie uszkodzeniu, zawarty w zestawie barwnik fluorescencyjny przenika do wnętrza komórki, gdzie wiąże się z DNA i generuje sygnał fluorescencyjny, charakterystyczny dla nekrozy wtórnej [223].

Hodowlę komórek raka prostaty DU-145 prowadzono zgodnie z opisem przedstawionym wcześniej w punkcie 3.4.5.1. Komórki wysiewano do białych płytek 96-dołkowych w ilości 1×10^4 komórek/dołek, które następnie inkubowano przez 24 godziny w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO₂). Badane związki rozpuszczono w DMSO, natomiast cisplatynę w wodzie dejonizowanej. Roztwory robocze związków przygotowano w pożywce *CO₂ Independent Medium*, przeznaczonej do hodowli komórek w warunkach atmosferycznych bez dodatku CO₂. Pożywka zawierała pirogronian sodu, wodorowęglan sodu oraz czerwień fenolową, a także system buforujący składający się z jedno- i dwuzasadowego fosforanu sodu oraz β-glicerofosforanu. Końcowe stężenie DMSO w dołkach nie przekraczało 0,4%. Zakresy stężeń badanych związków obejmowały wartości IC₅₀ oraz ½ IC₅₀, mieszcząc się w przedziale 0,31–40 μM.

Po inkubacji wstępnej, z dołków usuwano pożywkę ze związkami i zastępowano ją 100 μl roztworów roboczych badanych związków. Następnie do każdego dołka dodawano 100 μl odczynnika detekcyjnego, przygotowanego bezpośrednio przed użyciem poprzez rozcieńczenie wszystkich składników zestawu zgodnie z zaleceniami producenta. Płytki delikatnie mieszano na wytrząsarce przez około 30 sekund, po czym umieszczono w czytniku mikropłytek Varioskan™ LUX wyposażonym w kontrolę temperatury.

Pomiary sygnału luminescencyjnego (ekspozycja fosfatydyloseryny) oraz fluorescencyjnego (utrata integralności błony komórkowej, długość fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, długość fali emisji $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) prowadzono jednocześnie w trybie kinetycznym przez 72 h, w temperaturze 37°C. Uzyskane dane umożliwiły ocenę dynamiki procesu apoptozy oraz przejścia do późnej nekrozy w czasie, bez konieczności przerywania eksperymentu.

4 Analiza i dyskusja wyników

W ramach niniejszej pracy zsyntezowano i scharakteryzowano trzy nowe kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami metali przejściowych: kobaltu Co(II), manganu Mn(II) oraz cynku Zn(II), zbadano ich aktywność przeciwutleniającą, a także przeprowadzono ocenę ich aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej *in vitro*.

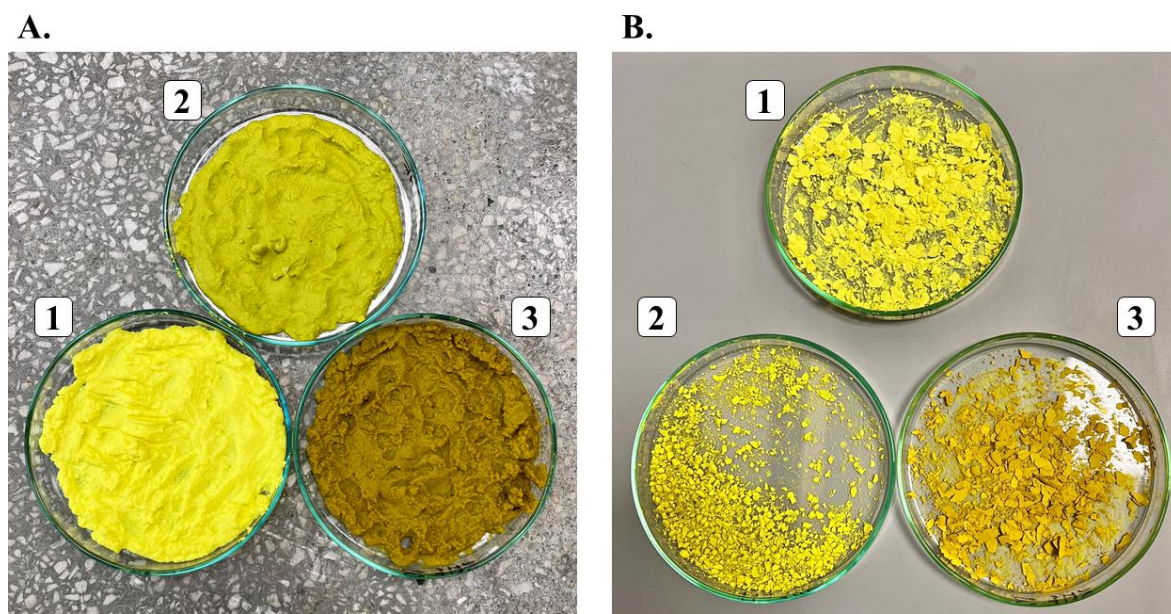
Dostępne dane literaturowe dotyczące kompleksów 3-hydroksyflawonu z jonami metali są ograniczone i dotyczą głównie układów otrzymywanych w roztworach oraz ich charakterystyki spektroskopowej i teoretycznej. W przypadku jonów cynku opisano szereg takich układów, jednak badania nie obejmowały oceny aktywności biologicznej w warunkach *in vitro* [54,88–93]. Wyjątek stanowi praca autorstwa Vijayaraghavan i wsp., w której otrzymano kompleks Zn-3HF w postaci ciała stałego i wykazano jego aktywność przeciwcukrzycową w modelu *in vivo*. Badany związek charakteryzował się jednak odmienną stechiometrią (1:1) niż kompleksy uzyskane w niniejszej pracy [94].

W przypadku jonów kobaltu doniesienia ograniczają się do badań zdolności chelatowania w roztworze, bez charakterystyki właściwości biologicznych [87], brak jest natomiast informacji o kompleksach 3-hydroksyflawonu z jonami manganu.

W przeciwieństwie do dotychczasowych badań, w niniejszej pracy otrzymano kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II) w postaci wyodrębnionych ciał stałych o stechiometrii 1:2, które poddano charakterystyce strukturalnej oraz ocenie aktywności biologicznej *in vitro*. Dodatkowo, stałe kompleksy z jonami Co(II) i Mn(II) nie były dotąd opisywane w literaturze, co podkreśla nowatorski charakter przeprowadzonych badań.

4.1 Charakterystyka kompleksów

Syntezy kompleksów wykorzystywanych w niniejszej pracy przeprowadzono poprzez wytrącenie ich z roztworu wodno-metanolowego w stosunku molowym metalu do liganda 1:2 w temperaturze ok. 60°C i przy pH \approx 7,6 (Rys. 6). Wydajność syntezy poszczególnych kompleksów była następująca: Co(II)-3HF: 75,13%, Mn(II)-3HF: 94,07%, Zn(II)-3HF: 88,19%.



Rys. 6. Kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami metali po syntezie: (A.) próbki bezpośrednio po zakończeniu reakcji (na mokro); (B.) próbki po procesie suszenia. Oznaczenia: (1) Zn(II)-3HF, (2) Mn(II)-3HF, (3) Co(II)-3HF.

Wyznaczono rozpuszczalność otrzymanych kompleksów w metanolu. 3HF charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w metanolu (25,6 mg/ml), w przeciwieństwie do kompleksów, których rozpuszczalność w porównaniu ze związkiem wyjściowym obniżyła się około 150-krotnie. Ze względu na ograniczoną ilość materiału nie przeprowadzono pełnego oznaczenia rozpuszczalności kompleksów w DMSO, zaobserwowano jednak ich dobrą rozpuszczalność praktyczną. Oznacza to, że stężenia możliwe do uzyskania były kilkukrotnie wyższe, niż stężenia potrzebne do przeprowadzenia dalszych analiz. Z tego względu do badań biologicznych jako rozpuszczalnik wykorzystano DMSO.

Zmierzono przewodnictwo roztworów otrzymanych kompleksów. W porównaniu z danymi literaturowymi dla roztworów różnych elektrolitów w DMSO stwierdzono, że otrzymane kompleksy są nieelektrolitami [224]. Właściwości kompleksów przedstawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Właściwości otrzymanych kompleksów

Związek	Kolor	Przewodnictwo [$\frac{\text{cm}^2}{\Omega \cdot \text{cm}}$]	Rozpuszczalność w metanolu 20±°C	
			mg/ml	mol/dm ³
Co(II)-3HF	ciemnożółty	4,8	0,18	3,2×10 ⁻⁴
Mn(II)-3HF	żółto-zielony	6,35	0,17	3,0×10 ⁻⁴
Zn(II)-3HF	żółty	4,15	0,18	3,2×10 ⁻⁴

4.1.1 Skład pierwiastkowy uzyskanych kompleksów

W celu ustalenia składu pierwiastkowego i wyznaczenia wzorów empirycznych zastosowano takie metody jak analiza elementarna (zawartość C i H), miareczkowanie kompleksometryczne (zawartość metalu) i analiza termogravimetryczna (zawartość wody).

W wyniku tych analiz ustalono, że otrzymane kompleksy są mononuklearne, o wzorze ogólnym $ML_2 \cdot nH_2O$, gdzie M to kation Co(II), Mn(II) lub Zn(II), L to $C_{15}H_9O_3^-$, a $n = 1$ dla kompleksu z cynkiem lub $n = 2$ dla kompleksów z kobaltem i manganem. Szczegółowy skład kompleksów przedstawiono w tabeli 3.

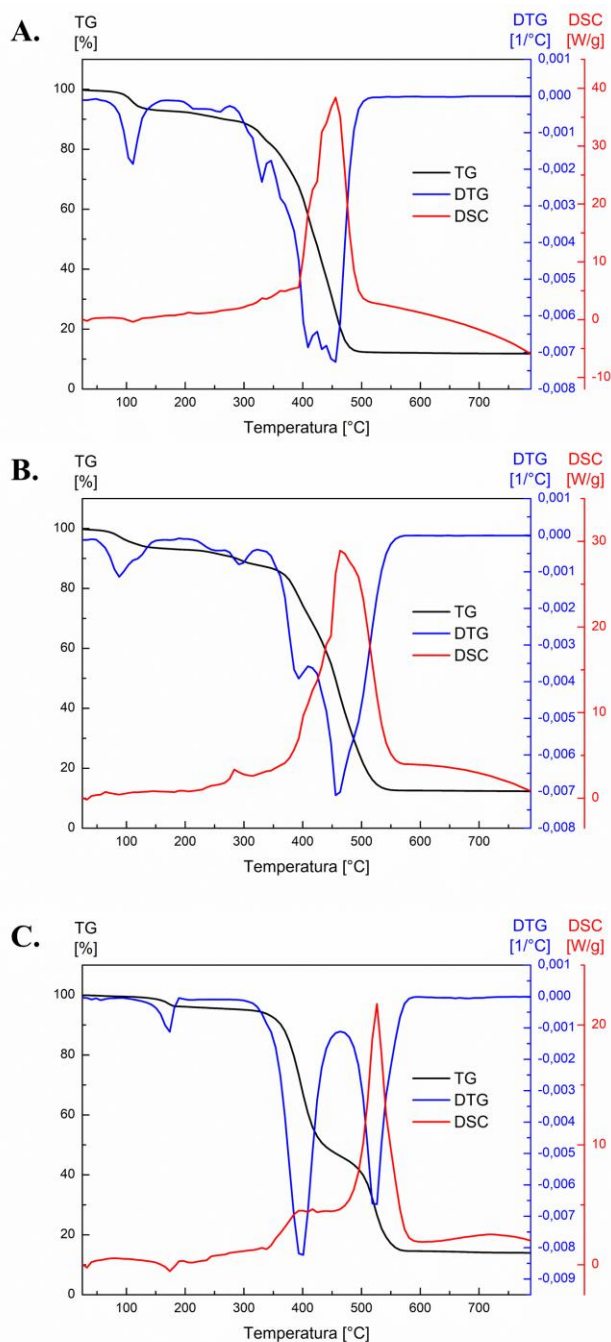
Tab. 3. Skład zsyntezowanych kompleksów

	Co(II)-3HF		Mn(II)-3HF		Zn(II)-3HF	
	% _{mas}	% _{mas. obl.} ^a	% _{mas}	% _{mas. obl.}	% _{mas}	% _{mas. obl.}
C	63,43	63,28	64,07	63,73	64,24	64,59
H	3,96	3,89	3,91	3,82	3,67	3,61
H₂O	7,04	6,32	6,76	6,37	3,61	3,22
metal	10,31	10,35	9,97	9,72	11,30	11,72
wzór empiryczny	Co(C ₁₅ H ₉ O ₃) ₂ ·2H ₂ O		Mn(C ₁₅ H ₉ O ₃) ₂ ·2H ₂ O		Zn(C ₁₅ H ₉ O ₃) ₂ ·H ₂ O	
masa molowa [g/mol]	569,43		565,43		557,85	

^a wartości obliczone

4.1.2 Analiza termiczna

Charakterystykę termiczną kompleksów 3-hydroksyflawonu z metalami przeprowadzono przy użyciu jednoczesnej termogravimetrycznej i skaningowej kalorymetrii różnicowej (TG/DTG-DSC) w atmosferze powietrza oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) w atmosferze azotu. Badania wykazały, że wszystkie trzy kompleksy ulegają wieloetapowemu procesowi rozkładu wraz ze wzrostem temperatury (Rys. 7).



Rys. 7. Krzywe TG-DTG/DSC, zarejestrowane w atmosferze powietrza dla kompleksu: (A.) Co(II)-3HF, (B.) Mn(II)-3HF, (C.) Zn(II)-3HF.

Na podstawie analizy krzywych TG-DTG/DSC dla kompleksu Co(II)-3HF wyróżnić można sześć etapów degradacji termicznej. W zakresie temperatur 60–160°C na krzywej DTG zauważyć można pik o ubytku masy równym 7,04% (obl. 6,32%), co odpowiada usunięciu dwóch cząsteczek wody. Towarzyszy temu efekt endotermiczny. Bezwodny kompleks jest stabilny w temperaturze 160–200°, a następnie wraz ze wzrostem temperatury następuje pięć kolejnych ubytków mas, będących wynikiem rozkładu części organicznej związku i jej spalania. Etapom tym towarzyszy silny efekt egzotermiczny. Na podstawie danych literaturowych, jako końcowy produkt rozkładu przyjęto Co_3O_4 [225].

Dla kompleksu Mn(II)-3HF zauważono cztery etapy degradacji. W pierwszym z nich, w zakresie temperatur 60–160°C, zaobserwowano ubytek masy na poziomie 6,76% (obl. 6,13%), co odpowiada usunięciu dwóch cząsteczek wody, a towarzyszy temu efekt endotermiczny. W etapach II–IV następuje rozkład części organicznej związku (efekt egzotermiczny), a jako możliwy końcowy produkt przemian termicznych przyjęto Mn_2O_3 [226].

W przypadku kompleksu Zn(II)-3HF krzywe TG-DTG ukazują trzy etapy degradacji. Pierwszy z nich zachodzi w zakresie temperatur 110–190°C, ubytek masy wynosi 3,61% (obl. 3,22%), co odpowiada efektowi endotermicznemu związanemu z usunięciem jednej cząsteczki wody. Następujące płynnie po sobie etapy II i III wykazały silny efekt egzotermiczny i duży ubytek masy, co pozwala stwierdzić, że nastąpił rozkład części organicznej kompleksu, jako końcowy produkt spalania przyjęto ZnO , zgodnie z wcześniej opublikowanymi danymi dotyczącymi podobnych układów [227].

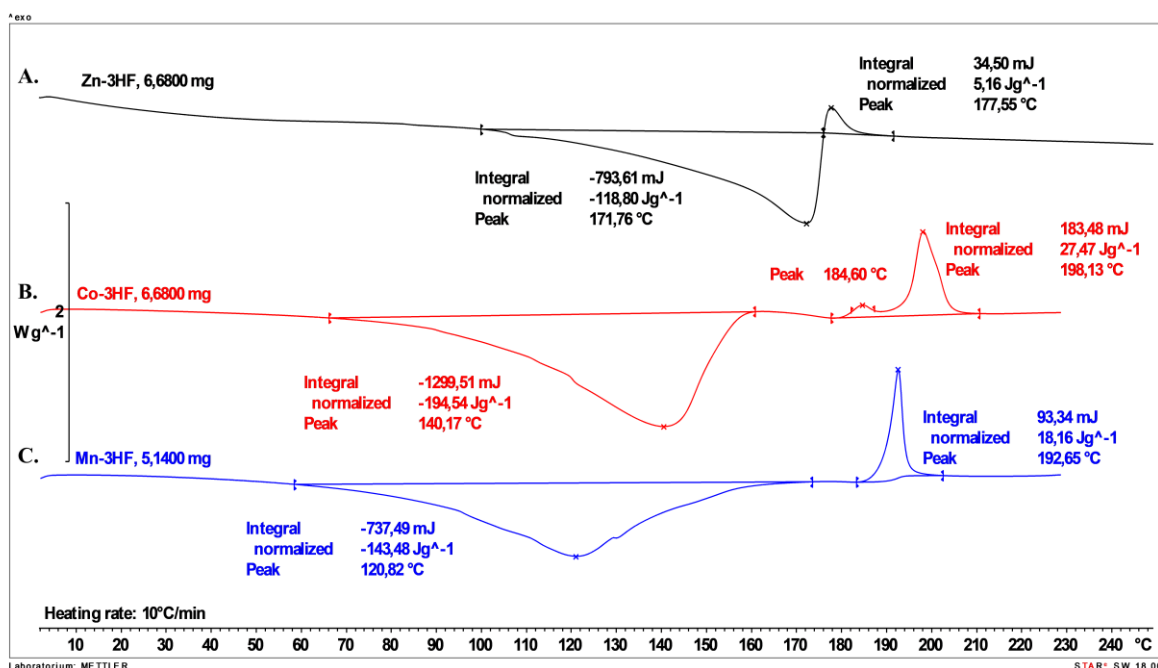
Szczegółowe wyniki analizy termogravimetrycznej zestawiono w tabeli 4.

Tab. 4. Wyniki analizy termogravimetrycznej dla kompleksów z jonami Co(II), Mn(II), Zn(II)

Związek	Parametr	Etapy degradacji						Δm
		I	II	III	IV	V	VI	
Co(II)-3HF	Zakres temperatur [°C]	60–160	200–280	300–345	345–420	420–440	440–510	87,81
	Ubytek masy [%]	7,04	2,99	7,75	33,10	12,15	24,88	
	T _{max} [°C]	122 ↓	256 ↑	330 ↑	394 ↑	436 ↑	458 ↑	
Mn(II)-3HF	Zakres temperatur [°C]	60–160	230–330	360–400	400–560	–	–	87,46
	Ubytek masy [%]	6,76	5,24	17,17	58,29	–	–	
	T _{max} [°C]	85 ↓	293 ↑	394 ↑	462 ↑	–	–	
Zn(II)-3HF	Zakres temperatur [°C]	110–190	310–460	460–600	–	–	–	85,78
	Ubytek masy [%]	3,61	49,88	32,29	–	–	–	
	T _{max} [°C]	168 ↓	397 ↑	524 ↑	–	–	–	

↑ efekt egzotermiczny; ↓ efekt endotermiczny

W celu monitorowania procesu dehydratacji i określenia ilości energii związanej z rozkładem i spalaniem części organicznej kompleksów przeprowadzono analizę DSC w atmosferze azotu (Rys. 8).



Rys. 8. Termogramy DSC, zarejestrowane w atmosferze azotu dla kompleksów:

(A.) Zn(II)-3HF, (B.) Co(II)-3HF i (C.) Mn(II)-3HF.

Dla każdego z analizowanych kompleksów obserwuje się zarówno pik endotermiczny, jak i egzotermiczny w temperaturze do 230°C. Piki endotermiczne, związane z procesem dehydratacji, występują przy maksymalnych temperaturach wynoszących 140°C dla Co(II)-3HF, 121°C dla Mn(II)-3HF i 172°C dla Zn(II)-3HF. Obliczone wartości entalpii procesu usuwania wody wyniosły odpowiednio 110,8 kJ/mol dla kompleksu z kobaltem, 81,1 kJ/mol dla kompleksu z manganem oraz 66,3 kJ/mol dla kompleksu z cynkiem, co w przeliczeniu na jedną cząsteczkę wody (na podstawie wyników analizy TG/DTG) dało, odpowiednio, 55,4 kJ/mol, 40,6 kJ/mol oraz 66,3 kJ/mol. Piki egzotermiczne, przypisywane rozkładowi i spalaniu części organicznej kompleksów, pojawiają się przy temperaturach: 198°C (Co(II)), 193°C (Mn(II)) i 177°C (Zn(II)). Odpowiadające im wartości entalpii wynoszą: -15,6 kJ/mol, -10,3 kJ/mol i -2,9 kJ/mol.

Wyniki analizy DSC zestawiono w tabeli 5.

Tab. 5. Wyniki analizy DSC dla kompleksów z jonami Co(II), Mn(II), Zn(II)

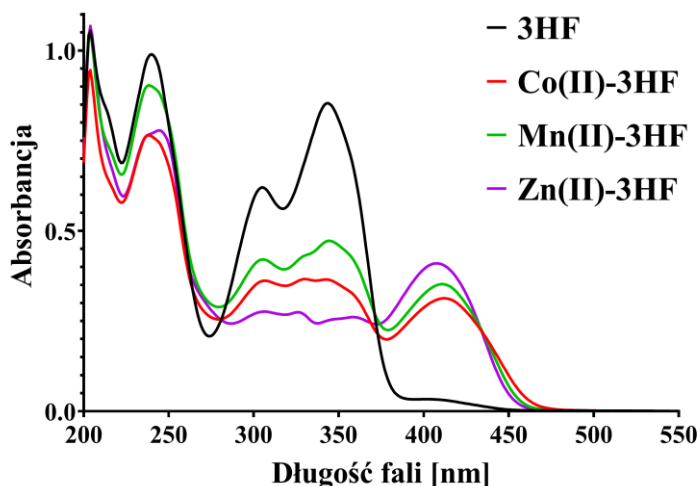
	Parametr	Co(II)-3HF	Mn(II)-3HF	Zn(II)-3HF
Pik 1	Zakres temperatur [°C]	65–160	60–175	110–176
	T _{max} [°C]	140	121	172
	Entalpia [kJ/mol]	110,8 ↓	81,1 ↓	66,3 ↓
Pik 2	Zakres temperatur [°C]	180–210	184–202	176–192
	T _{max} [°C]	198	193	177
	Entalpia [kJ/mol]	-15,6 ↑	-10,3 ↑	-2,9 ↑

↑ efekt egzotermiczny; ↓ efekt endotermiczny

Na podstawie uzyskanych danych termicznych, w szczególności wartości entalpii procesu dehydratacji w połączeniu z temperaturami maksymalnymi pików endotermicznych, możliwe jest wnioskowanie o charakterze cząsteczek wody obecnych w strukturze badanych kompleksów. W literaturze przyjmuje się, że woda krystalizacyjna (zewnątrzna) jest zwykle usuwana podczas jednego etapu, w temperaturach poniżej 150°C i charakteryzuje się stosunkowo niskimi wartościami entalpii dehydratacji [228]. Należy jednak zaznaczyć, że cząsteczki wody koordynacyjnej słabiej związane z jodem metalu mogą być usuwane także w niższych temperaturach, dlatego w przypadku kompleksów metali przejściowych temperatura utraty wody nie zawsze pozwala jednoznacznie określić jej charakter [229]. Z tego względu, innym istotnym parametrem umożliwiającym ocenę charakteru cząsteczek wody są wartości entalpii procesu dehydratacji. Uzyskane wartości przeliczone na jedną cząsteczkę H₂O mieszczą się w zakresie typowym dla kompleksów metali przejściowych (ok. 40–60 kJ/mol H₂O), w których obecność wody w sferze koordynacyjnej została potwierdzona metodami strukturalnymi. Podobne wartości entalpii odnotowano m.in. dla kompleksów Co(II), Mn(II) i Zn(II) z ligandami karboksylanowymi, dla których jednoetapowa utrata wody koordynacyjnej była obserwowana w porównywalnym zakresie temperatur [230,231]. Na tej podstawie można stwierdzić, że woda obecna w otrzymanych kompleksach ma charakter koordynacyjny.

4.1.3 Spektroskopia UV-Vis

Ocenę właściwości spektralnych otrzymanych kompleksów wykonano na podstawie analizy UV-Vis, przeprowadzonej w zakresie 200–550 nm. Widma UV-Vis roztworów metanolowych 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów przedstawiono na rysunku 9.



Rys. 9. Widma absorpcyjne 3HF ($c = 40 \mu\text{M}$) oraz nasyconych roztworów metanolowych jego kompleksów z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II).

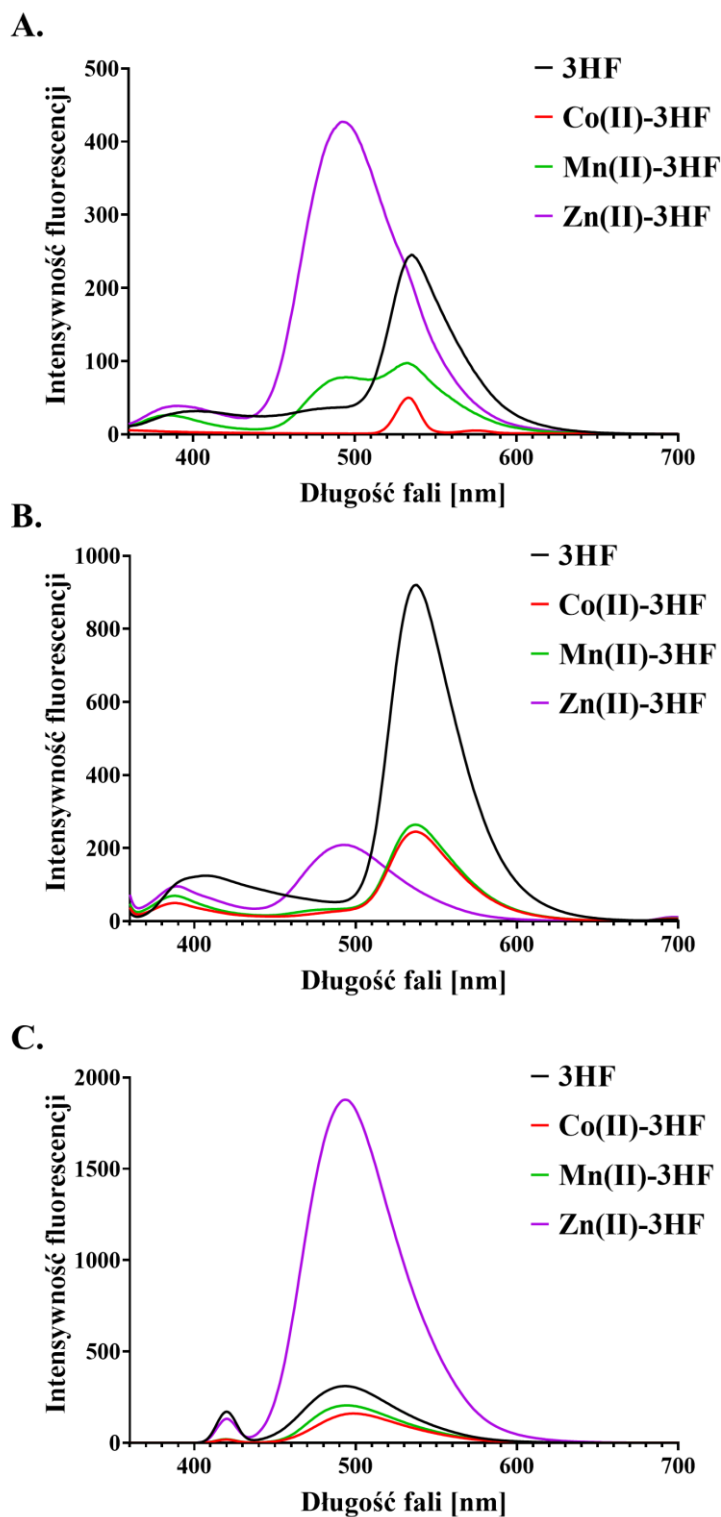
Widma elektronowe flawonoidów zwykle charakteryzują się występowaniem dwóch silnych pasm absorpcyjnych. Pierwsze z nich znajduje się w zakresie 240–270 nm i przypisywane jest przejściom $\pi \rightarrow \pi^*$ pierścienia A układu benzoilowego cząsteczki, natomiast drugie występuje w zakresie 340 – 380 nm i odpowiada przejściom $\pi \rightarrow \pi^*$ pierścienia B układu cynamoilowego [232]. Na widmie 3-hydroksyflawonu zauważyć można wyraźne pasmo z maksimum absorbancji przy $\lambda = 240$ nm (pasmo I) oraz podwójne pasmo z maksimami przy długościach fal 305 nm i 343 nm (pasmo II). Pasma absorpcji o maksimum około 305 nm odpowiada pierścieniowi pironicznemu (pierścień C) [233].

W widmach UV-Vis wszystkich otrzymanych kompleksów zaobserwowano zmiany w położeniu i intensywności pasm absorpcyjnych w porównaniu z widmem wolnego liganda, co odzwierciedla zmiany w strukturze elektronowej cząsteczki. Pasma I (ok. 240 nm), związane z pierścieniem A, zostało przesunięte w kierunku krótszych fal dla kompleksów Co(II) i Mn(II) (ok. 2 nm), a w kierunku dłuższych fal dla kompleksu Zn(II) (ok. 4 nm). Jednocześnie w widmach wszystkich analizowanych kompleksów intensywność pasma II (ok. 343 nm) znacząco zmalała.

W przypadku wszystkich trzech kompleksów pojawiło się nowe pasmo absorpcyjne w zakresie światła widzialnego przy 412 nm dla Co(II), 411 nm dla Mn(II) i 408 nm dla Zn(II), charakterystyczne dla oddziaływań flawonoidów z jonami metali [234]. Zmiany w widmie absorpcyjnym mogą wynikać z delokalizacji elektronów w cząsteczce liganda, indukowanej przez obecność dodatnio naładowanych jonów metali. Zjawisko to może zajść niezależnie od zdolności danego jonu do udziału w klasycznym przeniesieniu ładunku ligand-metal, na przykład w przypadku jonu Zn^{2+} o konfiguracji elektronowej d^{10} [235]. Zmiany intensywności i położenia pasm I i II sugerują, że w przypadku badanych kompleksów koordynacja metalu zachodzi przy udziale grup 3-hydroksylowej i 4-karbonylowej [236].

4.1.4 Spektroskopia fluorescencyjna

Analiza fluorescencyjna miała na celu określenie wpływu koordynacji jonów Co(II), Mn(II) i Zn(II) na właściwości emisyjne 3-hydroksyflawonu, w tym na intensywność fluorescencji i położenie pasm emisyjnych. Widma fluorescencyjne 3HF i jego kompleksów zarejestrowano w DMSO przy trzech długościach fal wzbudzenia (259 nm, 346 nm i 418 nm), odpowiadających maksimum absorpcji obserwowanym w widmach UV-Vis liganda i kompleksów (Rys. 10).



Rys. 10. Widma emisji fluorescencji 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II) w DMSO ($c = 40 \mu\text{M}$), zarejestrowane przy długościach fal wzbudzenia: (A.) 259 nm, (B.) 346 nm, (C.) 418 nm.

3-hydroksyflawon należy do klasycznych fluoroforów wykazujących zdolność do wewnątrzcząsteczkowego transferu protonu w stanie wzbudzonym (ESIPT), dzięki czemu emituje dwa charakterystyczne sygnały fluorescencyjne. Pasma przy krótszych długościach fal (około 400 nm) pochodzą od wzbudzonej formy enolowej (N^*), natomiast pasmo przy długościach fal w zakresie od 500 do 550 nm przypisywane jest obecności wzbudzonej formy ketonowej (T^*), powstającej po przeniesieniu protonu. Stosunek intensywności tych pasm oraz ich położenie zależą od środowiska chemicznego cząsteczki, w tym od polarności rozpuszczalnika oraz obecności wiązań wodorowych, które mogą stabilizować lub zakłócać wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe odpowiedzialne za zajście procesu ESIPT [237,238].

Przy wzbudzeniu falą o długości 259 nm (Rys. 10A.) widmo fluorescencyjne 3HF przedstawia dwa wyraźne pasma emisji: słabsze pasmo N^* przy $\lambda = 403$ nm oraz znacznie intensywniejsze pasmo T^* przy $\lambda = 535$ nm, co wskazuje na wydajny proces ESIPT. Widma kompleksów Co(II)-3HF oraz Mn(II)-3HF charakteryzują się hipsokromowym przesunięciem pasma N^* do długości fali około 391 nm, przy jednoczesnym zachowaniu drugiego pasma w podobnym zakresie długości fali, jednak ich intensywność jest wyraźnie obniżona w porównaniu z wolnym ligandem. W przeciwieństwie do kompleksów Co(II) i Mn(II), Zn(II)-3HF wykazał znaczny wzrost fluorescencji pasma T^* , z jednoczesnym przesunięciem hipsokromowym do $\lambda = 492$ nm.

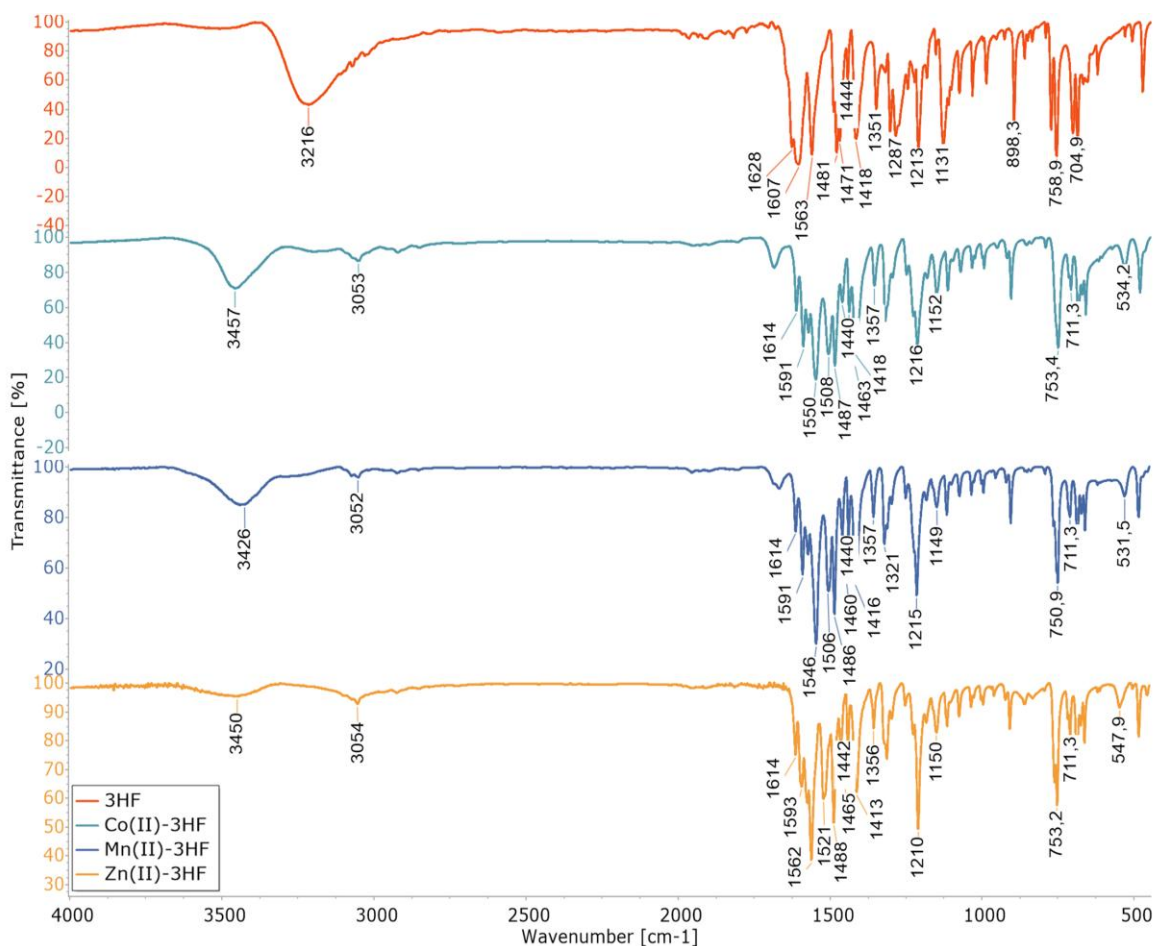
Po wzbudzeniu falą o długości 346 nm (Rys. 10B.) widmo fluorescencyjne 3HF również charakteryzuje się obecnością dwóch pasm emisji, których maksima są nieznacznie przesunięte do 408 nm (N^*) oraz 537 nm (T^*), przy czym to drugie osiąga największą intensywność spośród wszystkich badanych fal wzbudzenia, co wskazuje na szczególnie efektywny proces ESIPT. Wszystkie badane kompleksy wykazują w tych warunkach obniżoną intensywność emisji fluorescencji w porównaniu z wolnym ligandem. Kompleksy Co(II) i Mn(II) zachowują maksimum drugiego pasma przy długości fali 537 nm, podczas gdy kompleks z cynkiem ponownie wykazał znaczne przesunięcie hipsokromowe (do wartości 493 nm).

Dla fali wzbudzenia 418 nm (Rys. 10C.) w widmach zarówno liganda, jak i wszystkich kompleksów zauważyć można jedynie pasmo emisji w zakresie 494–499 nm, przypisywane emisji ze stanu wzbudzonego formy ketonowej. Kompleksy Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF wykazują umiarkowaną intensywność emisji, niższą niż wolny ligand. Najbardziej wyraźny efekt obserwuje się dla kompleksu Zn(II)-3HF, który wykazał 6-krotny wzrost intensywności fluorescencji.

Zmiany intensywności fluorescencji można powiązać z mechanizmem fotoindukowanego transferu elektronu (PeT, ang. *photoinduced electron transfer*). Mechanizm ten konkuruje z procesem ESIPT i w przypadku jonów paramagnetycznych prowadzi do dezaktywacji stanu wzbudzonego. Jony posiadające częściowo wypełnione podpowłoki d (tak jak Co²⁺ (d⁷) i Mn²⁺ (d⁵)) są w stanie przyjąć elektron od wzbudzonej cząsteczki liganda, co prowadzi do wygaszenia fluorescencji. W przypadku jonów cynku o konfiguracji d¹⁰ proces ten jest energetycznie niekorzystny, a koordynacja z jonem metalu prowadzi do usztywnienia struktury liganda, skutkując wzmocnieniem sygnału fluorescencyjnego. Zjawisko to jest znane w literaturze jako fluorescencja wzmocniona chelatowaniem (CHEF, ang. *chelation-enhanced fluorescence*) [239–241]. Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi potwierdzającymi potencjał układów opartych na 3-hydroksyflawonie do wykrywania jonów metali, w szczególności cynku. AL-Kindy i współautorzy wykazali, że kompleksowanie 3-hydroksyflawonu z jonami Zn²⁺ prowadzi do wyraźnych zmian intensywności fluorescencji, co zostało wykorzystane do opracowania czulej metody wykrywania tych jonów w próbkach, takich jak szampony czy woda pitna [54]. Przykład sondy opartej na 3-hydroksychromonie połączonym z selektywnym chelatorem cynku DPA (ang. *Di-(2-picolyl)amine*) pokazuje, że blokada procesu ESIPT po związaniu jonów Zn²⁺, w połączeniu z zahamowaniem procesów PeT, może prowadzić do wysokiej czułości i selektywności detekcji jonów cynku w układach modelowych i biologicznych [55]. Podobne mechanizmy zmiany emisji związanej z zahamowaniem procesu ESIPT opisywano również dla innych jonów metali posiadających wypełnione powłoki elektronowe, takich jak Al³⁺, gdzie obserwowano zarówno przesunięcia położenia pasm emisyjnych, jak i wzrost fluorescencji [242].

4.1.5 Spektroskopia w podczerwieni

Widma FT-IR 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów (Rys. 11) zostały zarejestrowane w zakresie 400–4000 cm^{-1} przy wykorzystaniu techniki pastylek KBr. Na ich podstawie zidentyfikowano charakterystyczne sygnały związane z grupami funkcyjnymi.



Rys. 11. Porównanie widm FT-IR 3-hydroksyflawonu i kompleksów z jonami metali.

3-hydroksyflawon w swojej strukturze posiada dwa pierścienie aromatyczne, połączone poprzez heterocykliczny pierścień zawierający tlen, grupę hydroksylową przy węglu C3 oraz grupę karbonylową przy węglu C4. Na widmie związku zauważyć można szerokie pasmo w zakresie 3300–3100 cm^{-1} , pochodzące od drgań rozciągających O–H grupy hydroksylowej przy węglu C3. Pasma przy 1628 i 1607 cm^{-1} odpowiadają drganiom rozciągającym sprzężonych wiązań podwójnych C=O, C2=C3 i C9=C10 pierścienia. Pasma w zakresie częstotliwości 1440–1600 cm^{-1} pochodzą od drgań rozciągających C=C w pierścieniach aromatycznych. Drgania związane ze zginaniem wiązań O–H i C–H w płaszczyźnie oraz drgania rozciągające C–OH zlokalizowane są w zakresie 1420–1100 cm^{-1} [52,243].

Widma kompleksów są do siebie podobne, jednocześnie różniąc się znacznie od widma wolnego liganda (Rys. 11). Najwięcej różnic zauważyć można w pasmach odpowiadających wiązaniom grup hydroksylowych. W widmach kompleksów zanika pasmo rozciągające w zakresie 3300–3100 cm^{-1} oraz pasma zginające przy częstotliwościach 1306, 1287 i 898 cm^{-1} . Zmiany te wskazują na deprotonację grupy hydroksylowej przy węglu C3, co może świadczyć o udziale tej grupy w tworzeniu wiązania z jonem metalu. Jednocześnie na każdym z widm kompleksów pojawiają się nowe, szerokie pasma przy częstotliwościach 3457 cm^{-1} (Co(II)), 3426 cm^{-1} (Mn(II)) i 3450 cm^{-1} (Zn(II)). Są one charakterystyczne dla drgań rozciągających O-H w cząsteczkach wody, co potwierdza jej obecność w otrzymanych kompleksach [244]. Na widmach kompleksów zauważyć można przesunięcie pasma pochodzącego od grupy karbonylowej przy węglu C4 (przy 1628 cm^{-1}) w kierunku niższych częstotliwości (1614 cm^{-1}), co świadczy o obniżeniu siły tego wiązania i uczestnictwie w wiązaniu koordynacyjnym z jonem metalu. Na udział grupy hydroksylowej i karbonylowej w wiązaniu metalu może również wskazywać pojawienie się nowych pasm przy wartościach 1505–1521 cm^{-1} (C=O---M-O). Ponadto, widma kompleksów przedstawiają nowe pasma przy częstotliwościach ~534 cm^{-1} (Co(II)), ~531 cm^{-1} (Mn(II)) i ~548 cm^{-1} (Zn(II)), mogące pochodzić od nowo powstałych wiązań rozciągających pomiędzy metalem a tlenem [234].

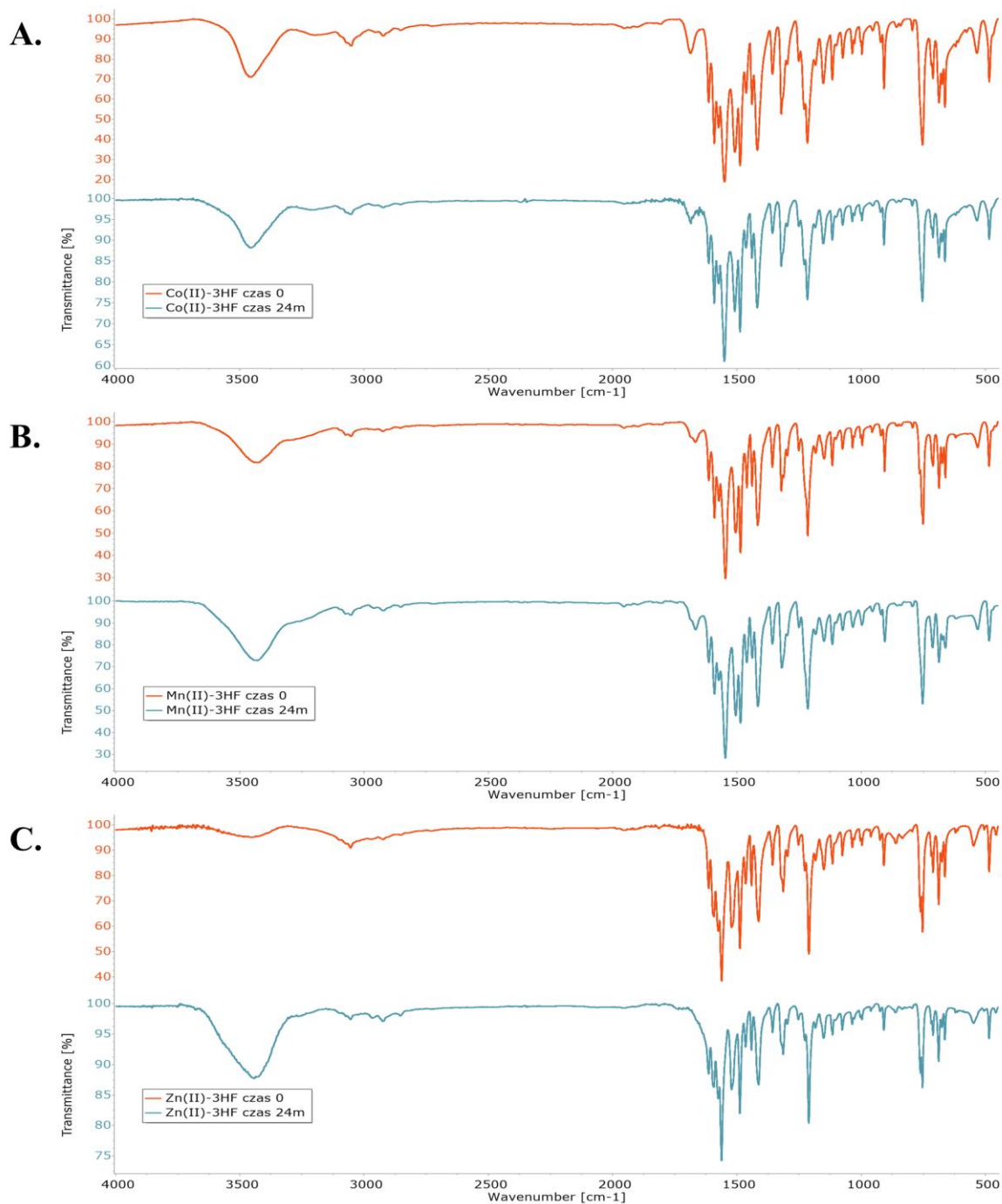
Podsumowanie opisanych wyników zestawiono w tabeli 6.

Tab. 6. Rodzaje drgań i położenie pasm w widmach IR 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II)

Rodzaj drgań	3HF	Co(II)-3HF	Mn(II)-3HF	Zn(II)-3HF
	Położenie pasm [cm^{-1}]			
$\nu(-\text{OH}/\text{H}_2\text{O})$	–	3457	3426	3450
$\nu(-\text{O}-\text{H})$	3216	–	–	–
$\nu(\text{C}-\text{H})$	–	3053	3052	3054
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1628	1614	1614	1614
$\nu_{\text{Ar}}(\text{C}=\text{C})$	1607	1591	1591	1593
	1563	1550	1546	1562
	1481	1487	1486	1488
	1471	1463	1460	1465
	1444	1440	1440	1442
	–	1508	1506	1521
$\delta(-\text{OH})$	1418	1418	1416	1413
$\delta(-\text{OH})_{\text{w płaszczyźnie}}$	1351	1357	1357	1356
$\delta(-\text{OH})$	1306	–	–	–
$\delta(-\text{OH})$	1287	–	–	–
$\nu(\text{C}-\text{OH})$	1213	1216	1215	1210
$\delta(-\text{OH})$	1131	1152	1149	1150
$\delta(-\text{OH})$	898,3	–	–	–
$\delta(-\text{CH})_{\text{poza płaszczyznę}}$	758,9	753,4	750,9	753,2
$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	704,9	711,3	711,3	711,3
$\nu_{\text{as}}(\text{M}-\text{O})$	–	534,2	531,5	547,9

ν – rozciągające; δ – deformacyjne; Ar – w pierścieniu aromatycznym; as – asymetryczne

W celu ustalenia stabilności otrzymanych kompleksów w stanie stałym, pomiary FT-IR powtórzono po 24 miesiącach od syntezy (Rys. 12).

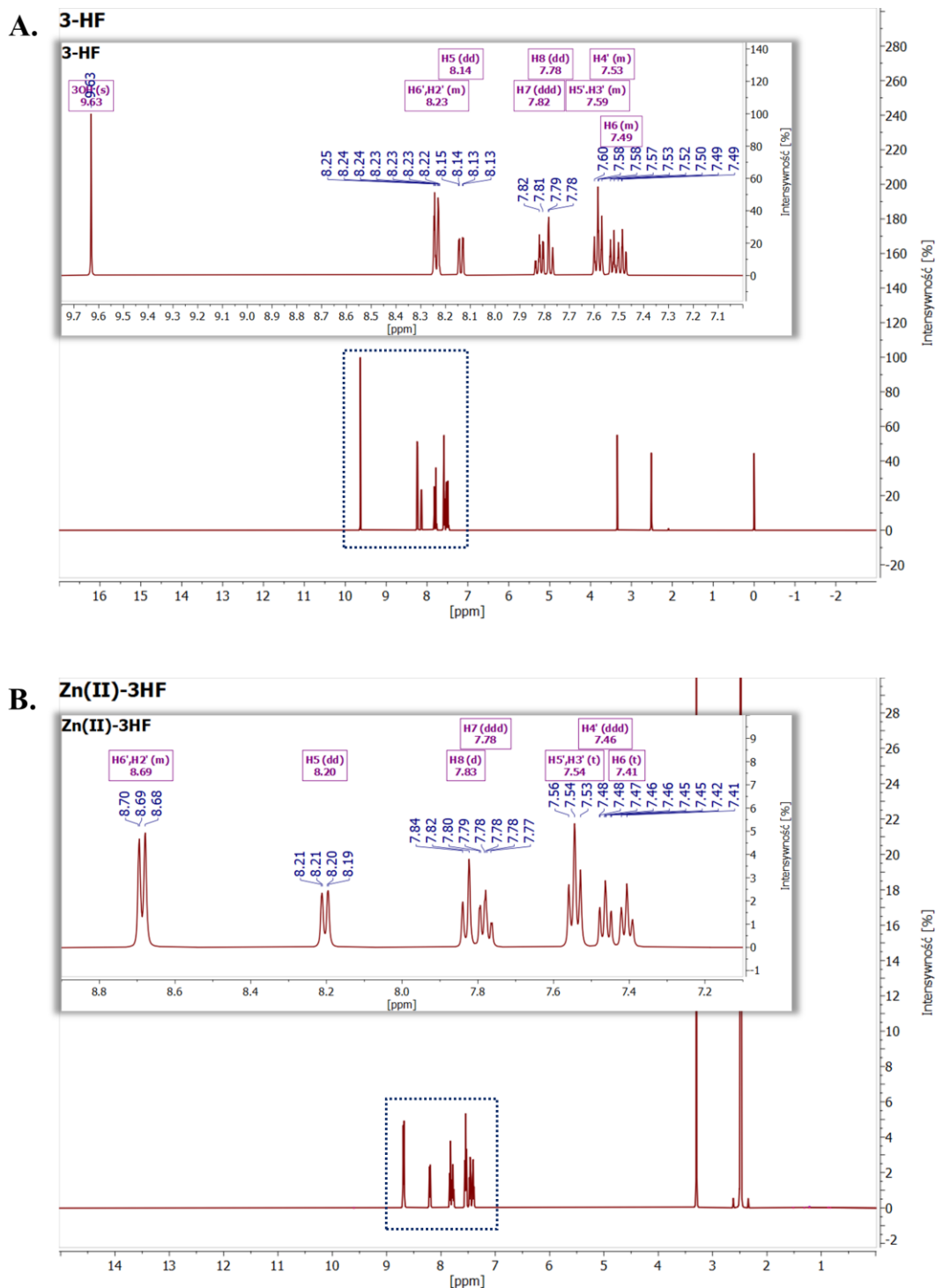


Rys. 12. Widma FT-IR otrzymanych kompleksów: (A.) Co(II)-3HF, (B.) Mn(II)-3HF i (C.) Zn(II)-3HF. Pomarańczowe linie przedstawiają widma zarejestrowane bezpośrednio po wysuszeniu danego związku, niebieskie linie przedstawiają widma kompleksów po 24 miesiącach.

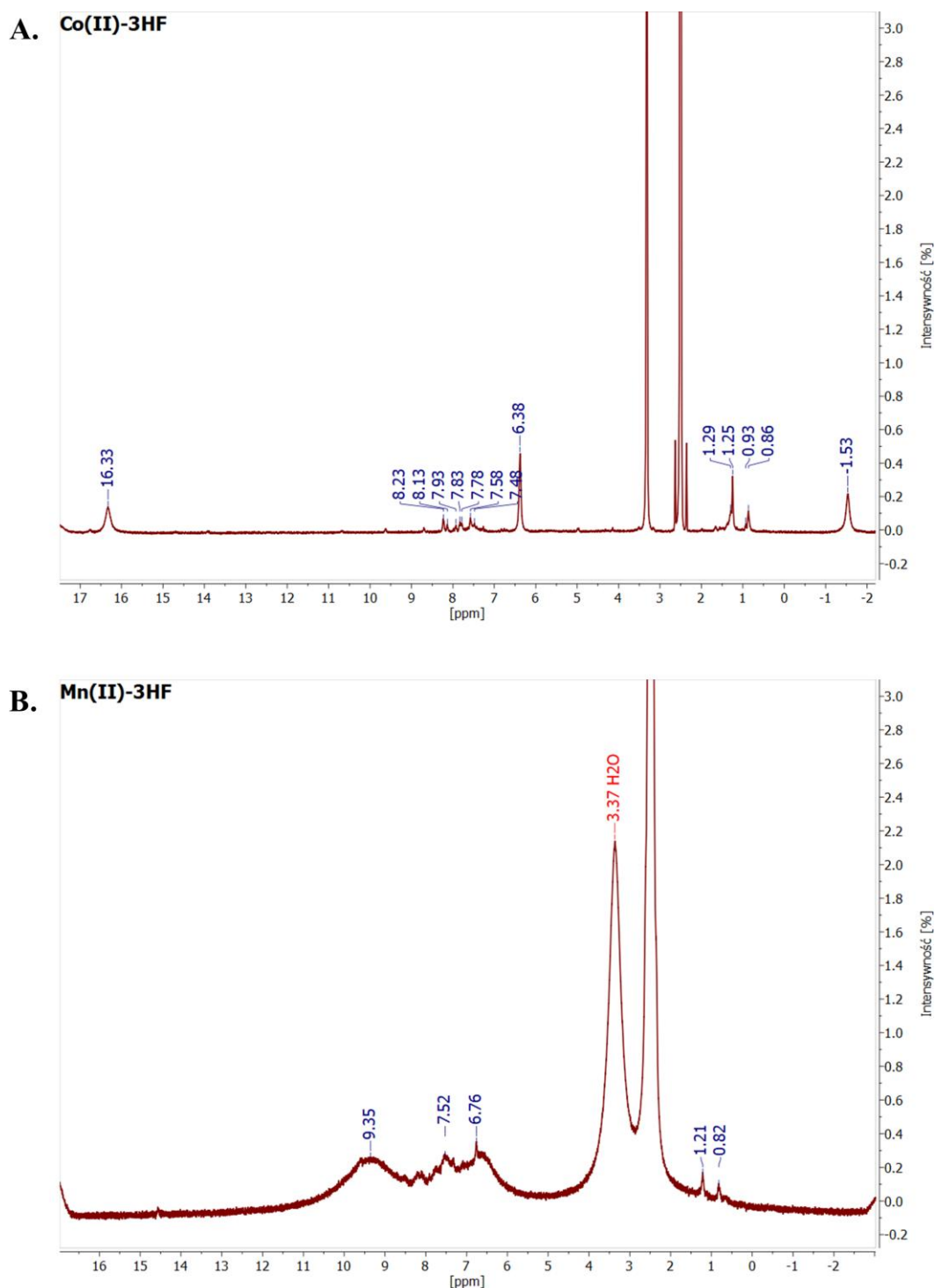
Porównanie widm IR związków bezpośrednio po syntezie z widmami zarejestrowanymi po 24 miesiącach wykazało brak istotnych zmian w położeniu charakterystycznych pasm, co wskazuje na ich stabilność podczas długotrwałego przechowywania w standardowych warunkach laboratoryjnych (temperatura pokojowa, suche środowisko, ochrona przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego). Niewielkie zmiany intensywności pasm po czasie mogą wynikać z różnic w przygotowaniu próbki lub częściowej degradacji, jednak brak przesunięć pasm wskazuje na brak istotnych zmian strukturalnych. Wzrost intensywności pasma pochodzącego od drgań rozciągających O-H ($\sim 3450\text{ cm}^{-1}$) może świadczyć o absorpcji wody z otoczenia [245].

4.1.6 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

Widma $^1\text{H-NMR}$ 3-hydroksyflawonu i otrzymanych kompleksów zarejestrowano w deuterowanym DMSO w temperaturze pokojowej (Rys. 13, Rys. 14). Przypisanie protonów w widmie 3-HF przeprowadzono na podstawie dostępnych danych literaturowych [246].



Rys. 13. Widma $^1\text{H-NMR}$: (A.) 3-hydroksyflawonu i (B.) kompleksu Zn(II)-3HF. W ramkach przedstawiono powiększony obszar widm obejmujący wybrane przesunięcia chemiczne (δ , ppm).



Rys. 14. Widma $^1\text{H-NMR}$ kompleksów: (A.) Co(II)-3HF i (B.) Mn(II)-3HF .

W otrzymanych widmach kompleksów z kobaltem (Rys. 14A.) i manganem (Rys. 14B.) i zaobserwowano istotne zmiany w porównaniu z widmem wolnego liganda (Rys. 13A.) Zauważono silne poszerzenie pasm, ich przesunięcia oraz nakładanie się sygnałów, co znacznie utrudniało przypisanie protonów. Zjawiska te przypisać można paramagnetycznym właściwościom jonów Co^{2+} i Mn^{2+} w kompleksach, posiadających

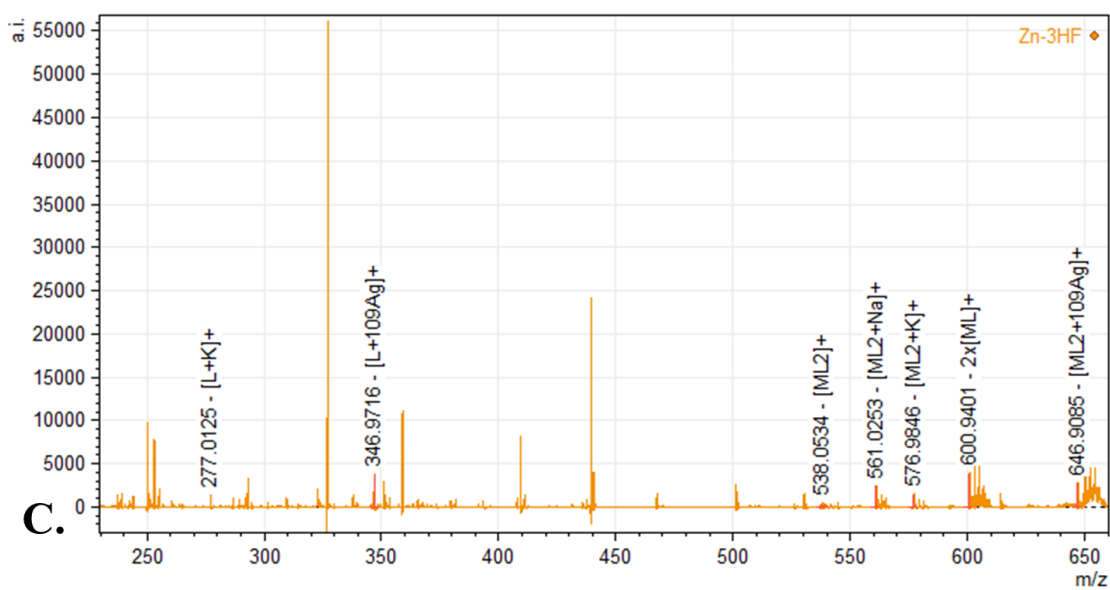
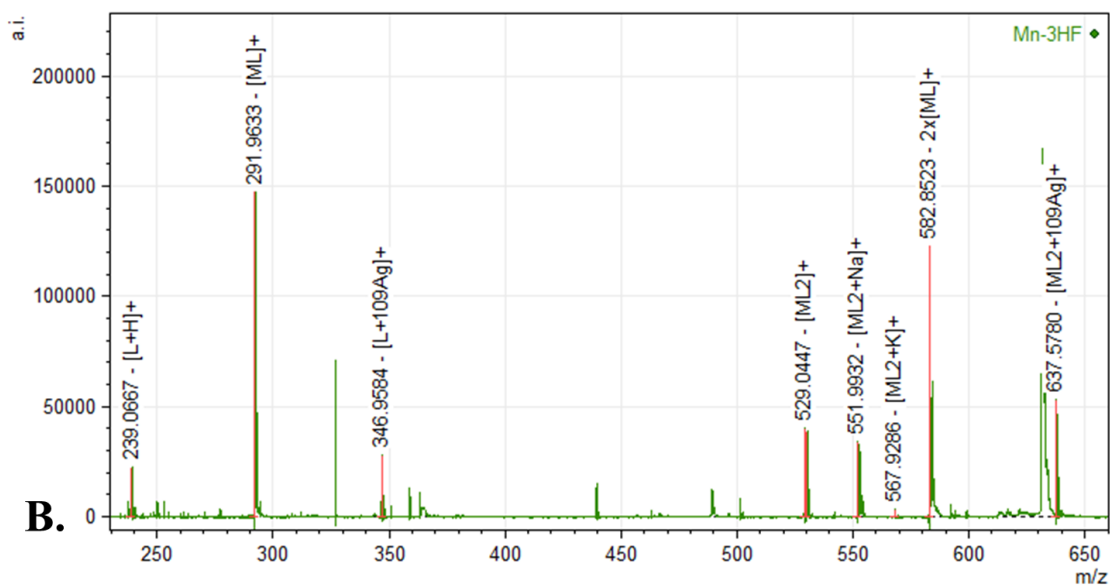
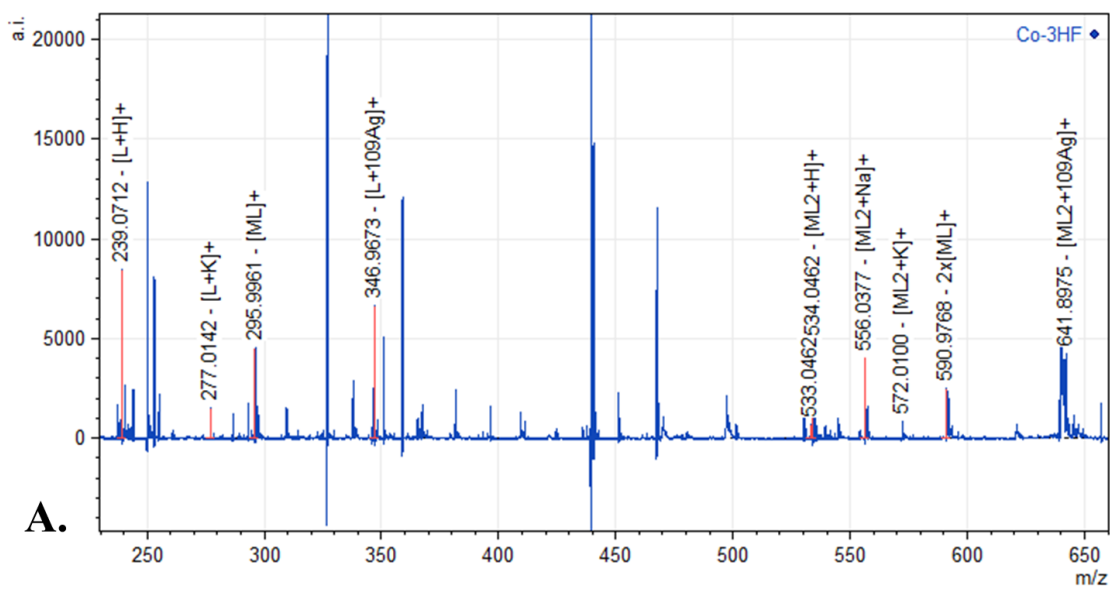
odpowiednio trzy i pięć niesparowanych elektronów w powłoce d. Obecność takich centrów metalicznych skutkuje przyspieszeniem relaksacji spinu protonu, powoduje znaczne poszerzenie i zanikanie sygnałów. Efekty paramagnetyczne są powszechnie obserwowane w widmach $^1\text{H-NMR}$ związków kompleksowych metali przejściowych i stanowią pewne ograniczenie w ich pełnej charakterystyce tą metodą [247].

Cynk jest diamagnetykiem i w przeciwieństwie do kobaltu i manganu, ma całkowicie zapełnioną powłokę d. Jego obecność w kompleksie z 3-hydroksyflawonem ma nieznaczny wpływ na przesunięcia chemiczne. W widmie kompleksu (Rys. 13B.) zanika sygnał pochodzący od protonu grupy -OH, co wskazuje na udział tej grupy w koordynacji jonu metalu. Sygnały pochodzące od protonów H6' i H2' pierścienia B ulegają przesunięciu z 8,23 ppm do 8,69 ppm, co sugeruje obniżenie gęstości elektronowej w ich otoczeniu. Przesunięcie pasma pochodzącego od protonu znajdującego się w pobliżu grupy karbonylowej (H5) wskazuje na zmiany elektronowe w obrębie tego miejsca. Obserwacje te potwierdzają powstanie kompleksu 3-hydroksyflawonu z cynkiem i obrazują wpływ diamagnetycznego jonu Zn^{2+} na otoczenie liganda [94].

4.1.7 Spektrometria mas

Analizy uzyskanych kompleksów z wykorzystaniem spektrometrii mas przeprowadzono z zastosowaniem techniki SALDI-ToF-MS. Matrycę stanowiła powierzchnia wzbogacona nanocząstkami srebra-109 ($^{109}\text{AgNPET}$).

W widmach masowych SALDI-MS związków metaloorganicznych obserwuje się charakterystyczne szerokie pasma, złożone z pików oddalonych od siebie o 1-2 jednostki masy, co wynika z obecności izotopów metali [248]. Analizowane widma otrzymanych kompleksów przedstawiono na rysunku 15.



Rys. 15. Widma MS kompleksów: (A.) Co(II)-3HF, (B.) Mn(II)-3HF i (C.) Zn(II)-3HF.

Identyfikację sygnałów przedstawiono w tabeli 7. W analizowanych widmach masowych stwierdzono obecność jonów molekularnych ML_2^+ (gdzie M oznacza jon metalu, a L odpowiada $C_{15}H_9O_3$) oraz adduktów z protonem $[ML_2+H]^+$, jonem srebra-109 $[ML_2+^{109}Ag]^+$, a także kationami sodu $[ML_2+Na]^+$ i potasu $[ML_2+K]^+$. Obecność pików pochodzących od cząsteczek ML_2 potwierdza utworzenie stabilnych kompleksów z jonami metali. Widma wszystkich kompleksów wykazały obecność sygnałów odpowiadających adduktom 3-hydroksyflawonu z jonem srebra-109 $[L+^{109}Ag]^+$ oraz z protonem $[L+H]^+$. W widmach kompleksów Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF zaobserwowano również sygnały odpowiadające jonom typu $[ML]^+$, powstałe prawdopodobnie z odłączenia jednej cząsteczki liganda od kompleksu ML_2 . Tego typu jonów nie zauważono w przypadku kompleksu Zn(II)-3HF. We wszystkich analizowanych widmach kompleksów zauważono natomiast serię pików, których wartości m/z odpowiadają podwójnej masie jonów $[ML]^+$, co może świadczyć o dimeryzacji tych fragmentów w warunkach jonizacji. Sugeruje to, że cząsteczki kompleksów ML_2 mogą ulegać fragmentacji pod wpływem wiązki lasera, co prowadzi do powstania jonów $[ML]^+$, które następnie tworzą dimery $2[ML]^+$. Brak sygnału pochodzącego od jonu $[ML]^+$ w widmie kompleksu z cynkiem może wskazywać, że jony Zn(II) wykazują większą tendencję do tworzenia klastrów, przez co dominującym produktem jonizacji jest forma $2[ML]^+$, a jony monomerów nie zostały wykryte [249–251].

Intensywne sygnały przy $m/z \approx 109, 217$ i 326 przypisano odpowiednio jonom Ag^+ , Ag_2^+ i Ag_3^+ , pochodzącym od płytki $^{109}AgNPET$.

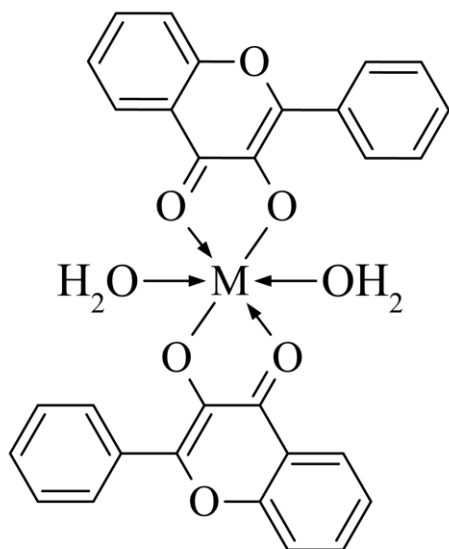
Tab. 7. Wyniki analizy MS dla kompleksów z jonami Co(II), Mn(II), Zn(II)

Jon	Co(II)-3HF		Mn(II)-3HF		Zn(II)-3HF	
	m/z	$m/z_{obl.}^a$	m/z	$m/z_{obl.}$	m/z	$m/z_{obl.}$
$L+H^+$	239,067	239,071	239,067	239,071	–	239,071
$L+K^+$	277,014	277,026	–	277,026	–	277,026
$L+^{109}Ag^+$	346,967	346,968	346,958	346,968	346,972	346,968
ML^+	295,996	295,988	291,963	291,993	–	300,984
ML_2^+	533,046	533,044	529,045	529,048	538,053	538,039
ML_2+H^+	534,046	534,051	530,049	530,056	539,055	539,047
ML_2+Na^+	556,038	556,033	551,993	552,038	561,025	561,029
ML_2+K^+	–	572,007	–	568,012	576,985	577,003
$ML_2+^{109}Ag^+$	641,898	641,948	637,578	637,953	646,909	646,944

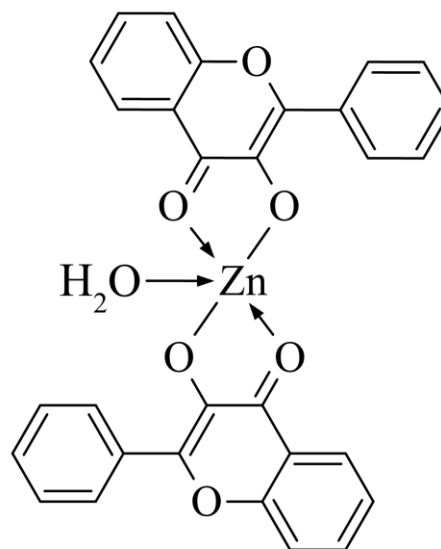
^a wartości obliczone

Analiza wyników powyższych badań pozwoliła na wyznaczenie struktury kompleksów 3-hydroksyflawonu z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II) w stosunku molowym metalu do liganda 1:2. Zaproponowaną strukturę przedstawiono na rysunku 16.

A.



B.



Rys. 16. Proponowana struktura kompleksów wybranych metali z 3-hydroksyflawonem:
(A.) Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF, gdzie M = Co(II) lub Mn(II), (B.) Zn(II)-3HF.

4.2 Badanie właściwości przeciwutleniających

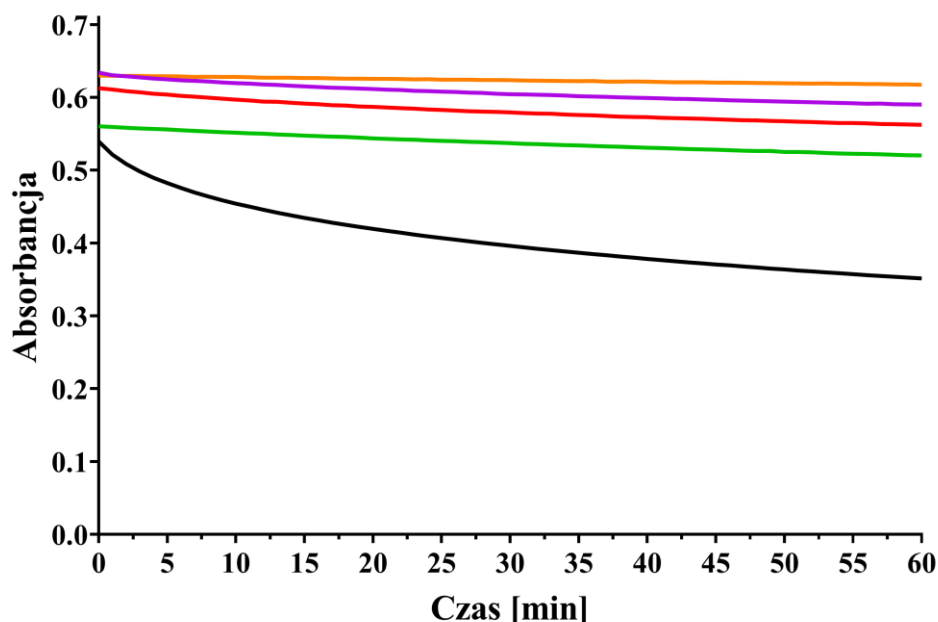
Analizę aktywności przeciwutleniającej przeprowadzono z wykorzystaniem spektrofotometrycznej metody DPPH. W przypadku obecności związku o właściwościach antyoksydacyjnych rodnik DPPH[•] ulega redukcji poprzez przyjęcie elektronu lub atomu wodoru, co prowadzi do stopniowego zaniku charakterystycznego fioletowego zabarwienia roztworu oraz proporcjonalnego spadku absorbancji [204].

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów spektrofotometrycznych stwierdzono, że zarówno 3-hydroksyflawon, jak i jego kompleksy z jonami metali wykazują zdolność neutralizowania rodnika DPPH[•], a ich aktywność jest wyraźnie zróżnicowana. Wartości procentowej inhibicji rodnika DPPH[•] względem kontroli dla badanych związków, wyznaczone po 30 minutach inkubacji, przedstawiono w tabeli 8.

Tab. 8. Wartości procentowej inhibicji rodnika DPPH[•] względem kontroli po 30 minutach inkubacji

Związek	% inhibicji
3HF	36,50
Co(II)-3HF	7,12
Mn(II)-3HF	13,86
Zn(II)-3HF	3,09

Najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazał wolny ligand, dla którego wartość inhibicji po 30 minutach wynosiła około 37%. W przypadku kompleksów zaobserwowano wyraźne obniżenie zdolności do zmiatania wolnych rodników. Przebieg zmian absorbancji w czasie przedstawiono na rysunku 17.



— Kontrola — 3HF — Co(II)-3HF — Mn(II)-3HF — Zn(II)-3HF

Rys. 17. Zmiana absorbancji roztworu rodnika DPPH• w funkcji czasu w obecności 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II).

Analiza kinetyki reakcji wykazała, że proces redukcji rodnika DPPH• przebiegał stopniowo. W przypadku wolnego 3-hydroksyflawonu zaobserwowano systematyczny spadek absorbancji w ciągu całego pomiaru, początkowo szybki, a następnie wolniejszy, lecz bez osiągnięcia wyraźnego stanu stacjonarnego (plateau) nawet po 60 minutach. Z kolei kompleksy wykazały wolniejszy całkowity przebieg reakcji, a ich krzywe absorbancji ulegały szybszemu wypłaszczeniu w porównaniu z ligandem (Rys. 17).

Uzyskane wyniki wskazały, że w wyniku kompleksowania 3-hydroksyflawonu z jonami metali otrzymano związki o niższej aktywności przeciwutleniającej niż wyjściowy flawonoid. Zjawisko to można wytłumaczyć zarówno budową strukturalną badanych związków, jak i mechanizmem reakcji flawonoidów z wolnymi rodnikami. Aktywność antyoksydacyjna flawonoidów zależy przede wszystkim od obecności i reaktywności wolnych grup hydroksylowych w cząsteczce, zdolnych do oddania atomu wodoru lub elektronu [252].

Wykazano, że w rozpuszczalnikach polarnych, takich jak metanol, właściwości przeciwutleniające związku determinuje kwasowość grup hydroksylowych i związana z nią łatwość dysocjacji wiązania O-H. Ważną rolę odgrywa tu mechanizm SPLET (ang. *sequential proton-loss electron transfer*), czyli utrata protonu poprzedzająca transfer elektronu [253].

W przypadku flawonoidów zawierających grupę hydroksylową w pozycji C3 wykazano jej istotny wpływ na aktywność przeciwutleniającą [254]. W związku z tym grupa ta stanowi kluczowe centrum reaktywne cząsteczki 3-hydroksyflawonu, odpowiedzialne za neutralizację wolnych rodników.

Podczas syntezy kompleksów, jony metali d-elektronowych angażują w tworzenie wiązań grupę 3-hydroksylową (ulegającą deprotonacji) oraz sąsiadującą z nią grupę 4-karbonylową, tworząc pięcioczłonowy pierścień chelatowy. Brak dostępnej grupy 3-OH w utworzonych kompleksach powoduje, że nie są w stanie przekazać atomu wodoru, co tłumaczy niskie wartości inhibicji rodnika w porównaniu z wolnym ligandem. Jak opisano wcześniej, 3-hydroksyflawon wykazuje zdolność do wewnątrzcząsteczkowego transferu protonu w stanie wzbudzonym (ESIPT), procesu zależnego od wiązania wodorowego pomiędzy grupą 3-OH i 4-karbonylową. Kompleksowanie zaburza ten układ, hamując proces ESIPT, co wpływa na właściwości elektronowe cząsteczki i może przyczyniać się do obniżenia aktywności antyoksydacyjnej badanych kompleksów [255,256].

Dostępne dane literaturowe wskazują, że wpływ kompleksowania na właściwości przeciwutleniające flawonoidów jest zróżnicowany i zależy od rodzaju jonu metalu, sposobu koordynacji i stosunku molowego metal:ligand [257]. Często obserwuje się wzrost aktywności utworzonych kompleksów w porównaniu z wolnymi ligandami. Efekt ten przypisuje się stabilizacji powstających rodników oraz obecności dodatkowego centrum metalicznego o właściwościach redoks, które bierze udział w unieszkodliwianiu rodników [258]. Proces kompleksowania może zmienić charakter działania związku. Przykładem są kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami miedzi(II), dla których w badaniach *in vitro* wykazano działanie prooksydacyjne [259]. Istnieją również doniesienia wskazujące na obniżenie aktywności antyoksydacyjnej w wyniku koordynacji. Znaczny spadek zdolności do neutralizacji rodników odnotowano na przykład dla kompleksu cyny(II) z kwercetyną [260].

Podobny efekt zaobserwowano w przypadku koordynacji luteoliny z jonami żelaza(III), gdzie aktywność antyoksydacyjna powstałego związku kompleksowego była niższa niż wolnego liganda [261].

Obserwowany w niniejszych badaniach trend aktywności kompleksów (Mn(II) > Co(II) > Zn(II)) wskazuje na wpływ właściwości redoks samego centrum metalicznego. Jony metali przejściowych posiadające niecałkowicie zajęte orbitale d, takie jak Mn(II) i Co(II), mogą wykazywać własną aktywność redoks i częściowo kompensować utratę zdolności liganda do udziału w reakcji przeniesienia elektronu lub atomu wodoru. Z kolei jon Zn²⁺ o konfiguracji elektronowej d¹⁰ jest nieaktywny w procesach redoks, pełniąc w układzie jedynie funkcję strukturalną, blokując centrum aktywne 3-hydroksyflawonu. Podobne obniżenie aktywności antyoksydacyjnej po kompleksowaniu z jonami cynku(II) zaobserwowano m.in. dla kompleksów z kwercetyną [262] oraz kompleksów z katechiną [263].

4.3 Badanie właściwości przeciwbakteryjnych

Analizę aktywności przeciwbakteryjnej 3HF i jego kompleksów przeprowadzono wobec certyfikowanych szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) i Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 10536) przy wykorzystaniu metody mikrorozcieńczeń na 96-dołkowych płytkach mikrotitracyjnych, w pożywce MHB, przy 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami. Na podstawie oceny wizualnej potwierdzonej pomiarami spektrofotometrycznymi ($\lambda = 600$ nm) wyznaczono wartości MIC wobec wszystkich trzech szczepów bakteryjnych. Jest to najniższe stężenie badanego związku, przy którym wzrost danego szczepu bakterii zostaje całkowicie zahamowany (Tab. 9). Aktywność kompleksów porównano z antybiotykami referencyjnymi, wykazującymi różne mechanizmy działania przeciwdrobnoustrojowego: oksacyliną oraz rifampicyną. Oksacylina należy do grupy antybiotyków β -laktamowych, a jej działanie polega na hamowaniu syntezy ściany komórkowej poprzez kowalencyjne przyłączenie się do białek wiążących penicylinę (PBP, ang. *penicillin-binding proteins*), biorących udział w końcowych etapach sieciowania peptydoglikanów u bakterii [264]. Rifampicyna natomiast należy do grupy ansamycyn i blokuje proces transkrypcji poprzez hamowanie bakteryjnej polimerazy RNA zależnej od DNA [265]. Badane kompleksy 3HF z jonami metali wykazały zbliżoną lub wyższą aktywność przeciwbakteryjną w porównaniu ze związkiem wyjściowym.

Tab. 9. Wartości MIC 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów wobec szczepów *E. coli*, *S. aureus* i *S. epidermidis*

Związek	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984
	MIC [mg/ml]		
3HF	1,563	0,781	0,098
Co(II)-3HF	0,391	0,781	0,049
Mn(II)-3HF	1,563	0,781	0,049
Zn(II)-3HF	0,156	0,391	0,195
oksacylina	0,125	$1,2 \times 10^{-4}$	–
rifampicyna	$3,9 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$

– brak aktywności w badanym zakresie stężeń

W przypadku szczepu *E. coli* wolny ligand 3HF wykazywał niską aktywność przeciwbakteryjną, charakteryzując się wysoką wartością MIC (1,563 mg/ml). Kompleksowanie z jonami metali prowadziło w części przypadków do poprawy aktywności, przy czym najniższe wartości MIC wyznaczono dla kompleksów Zn(II)-3HF (MIC = 0,156 mg/ml) oraz Co(II)-3HF (MIC = 0,391 mg/ml).

Oksacylina i rifampicyna charakteryzowały się zróżnicowanym działaniem wobec *E. coli*. Oksacylina wykazała wartość MIC równą 0,125 mg/ml, co jest wynikiem zbliżonym do aktywności kompleksu z cynkiem, natomiast wartość dla rifampicyny była zdecydowanie niższa ($3,9 \times 10^{-3}$ mg/ml). Różnice w skuteczności poszczególnych związków wobec *E. coli* wynikają ze specyficznej budowy komórek bakterii Gram-ujemnych, a kluczową rolę odgrywa błona zewnętrzna, stanowiąca wybiórczą barierę przepuszczalności [266]. Ze względu na obecność szkieletu hydrofilowego, oksacylina z trudem penetruje błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych, co ogranicza jej dostęp do białek PBP i obniża skuteczność wobec tych drobnoustrojów. Z kolei rifampicyna, ze względu na lipofilową strukturę, wykazuje zdolność do skuteczniejszego przenikania przez błonę i oddziaływania z wewnątrzkomórkowym celem molekularnym (RNA). Zjawisko to pozwala przypuszczać, że wyższa aktywność kompleksów względem wolnego 3HF może wynikać ze zmiany ich właściwości fizykochemicznych, w tym ze wzrostu lipofilowości, co może ułatwić im pokonanie bariery błonowej. Na obniżoną wrażliwość bakterii Gram-ujemnych na ksenobiotyki wpływają również mechanizmy oporności takie jak pompy wypływowe (ang. *efflux pumps*), które ograniczają kumulację wielu związków wewnątrz komórki [267,268].

Wobec *S. aureus* wolny ligand oraz kompleksy Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF charakteryzowały się taką samą aktywnością antybakteryjną (MIC = 0,781 mg/ml), natomiast kompleks Zn(II)-3HF wykazał niższą wartość MIC równą 0,391 mg/ml, co wskazuje, że rodzaj jonu metalu może wpływać na aktywność przeciwbakteryjną. Aktywność badanych związków była znacznie niższa w porównaniu z antybiotykami referencyjnymi. Wartość MIC dla oksacyliny wyniosła $1,2 \times 10^{-4}$ mg/ml, co jest zgodne z danymi literaturowymi dla szczepów wrażliwych na metycilinę (MSSA, ang. *methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*) [269]. Rifampicyna również charakteryzowała się wysoką aktywnością (MIC = $1,5 \times 10^{-5}$ mg/ml), typową dla bakterii Gram-dodatnich [269]. Uzyskane wyniki wskazują, że kompleksy 3HF wykazują mierzalną aktywność przeciwbakteryjną, jednak ich skuteczność jest niższa w porównaniu z klasycznymi antybiotykami stosowanymi w terapii zakażeń wywołanych przez *S. aureus*.

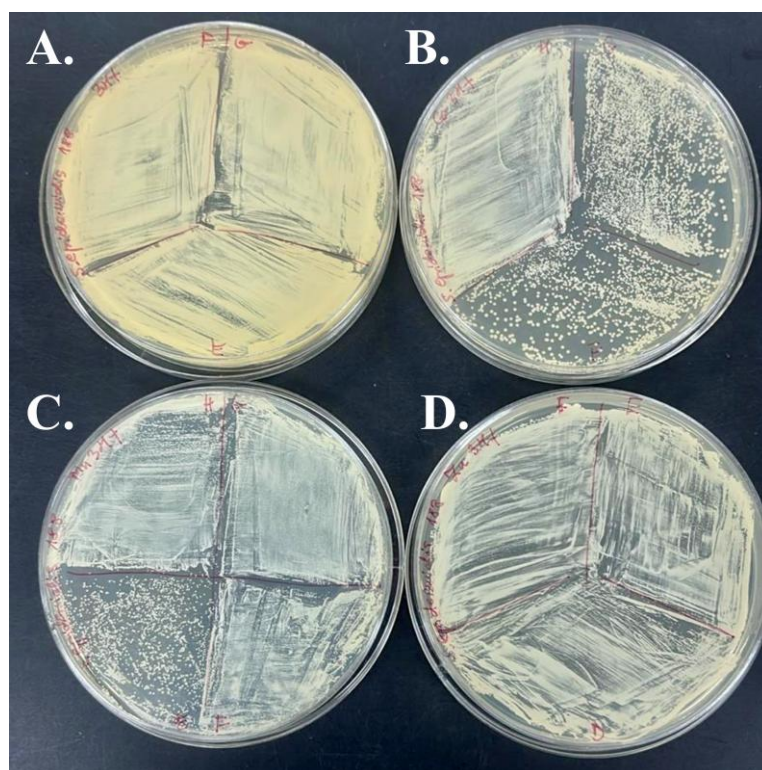
W badaniach wobec szczepu *S. epidermidis* kompleksy Co(II)-3HF oraz Mn(II)-3HF wykazały dwukrotnie wyższą aktywność przeciwbakteryjną (MIC = 0,049 mg/ml) w porównaniu z wolnym ligandem (MIC = 0,098 mg/ml). Z kolei kompleks Zn(II)-3HF charakteryzował się słabszym działaniem, o czym świadczy dwukrotnie wyższa wartość MIC (0,195 mg/ml) względem 3HF. *S. epidermidis* cechuje się obniżoną wrażliwością na antybiotyki β -laktamowe, co potwierdzają doniesienia literaturowe wskazujące na wartości MIC oksacyliny wynoszące około 0,032 mg/ml [269]. W przeprowadzonych badaniach szczep ten wykazał całkowitą oporność na oksacylinę w testowanym zakresie stężeń. Rifampicyna wykazała wysoką aktywność (MIC = $1,5 \times 10^{-5}$ mg/ml), co jest porównywalne z dostępnymi danymi literaturowymi, dla których wartości MIC mieszczą się w zakresie od 3×10^{-7} do 8×10^{-8} mg/ml [270,271]. W porównaniu do tych danych aktywność kompleksów jest wyraźnie niższa, jednak obserwowane hamowanie wzrostu w przypadku szczepu niewrażliwego na oksacylinę wskazuje na potencjał badanych związków do zastosowania w terapii przeciwbakteryjnej.

Uzyskane wyniki wskazują, że kompleksowanie 3-hydroksyflawonu z jonami metali przejściowych może modyfikować jego aktywność przeciwbakteryjną w sposób zależny zarówno od rodzaju jonu, jak i badanego szczepu bakteryjnego. Wyraźny efekt obserwowano wobec *Staphylococcus epidermidis*, gdzie kompleksy Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF hamowały wzrost bakterii, podczas gdy oksacylina okazała się nieskuteczna.

W przypadku bakterii Gram-ujemnych badane związki charakteryzowały się wyższymi wartościami MIC, co jest zgodne z opisywaną w literaturze rolą błony zewnętrznej jako bariery dla przenikania związków chemicznych [272].

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, koordynacja jonów metali przez ligandy flawonoidowe może prowadzić do zmiany ich struktury elektronowej, zmniejszenia polarności oraz wzrostu lipofilowości, co może sprzyjać przenikaniu związków przez błony komórkowe mikroorganizmów oraz oddziaływaniom ze strukturami wewnątrzkomórkowymi [273,274]. Dodatkowo, z danych literaturowych wynika, że kompleksy metali przejściowych, w szczególności zawierające jony Co(II) i Mn(II), mogą wykazywać aktywność biologiczną związaną z procesami redoks, prowadzącymi do generowania reaktywnych form tlenu i wtórnych uszkodzeń białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych w komórkach bakteryjnych, co może stanowić jedno z możliwych wyjaśnień obserwowanych różnic pomiędzy wolnym ligandem a jego kompleksami [275,276].

W celu określenia charakteru działania badanych związków przeprowadzono dodatkowo oznaczenia minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) poprzez posiew zawartości dołków odpowiadających stężeniom MIC, 2×MIC oraz 4×MIC na podłoże agarowe Mueller-Hinton (MHA). Wyniki oznaczenia MBC dla szczepu *S. epidermidis* przedstawiono na rysunku 18. W badanym zakresie stężeń zaobserwowano wzrost kolonii bakteryjnych, co wskazuje na brak działania bakteriobójczego analizowanych związków. Analogiczne wyniki uzyskano również dla pozostałych badanych szczepów, co potwierdza, że zarówno wolny ligand, jak i jego kompleksy wykazują właściwości bakteriostatyczne.



Rys. 18. Wzrost kolonii bakterii *Staphylococcus epidermidis* na podłożu MHA po posiewie zawartości dołków odpowiadających stężeniom MIC, 2×MIC oraz 4×MIC badanych związków: (A.) 3HF, (B.) Co(II)-3HF, (C.) Mn(II)-3HF i (D.) Zn(II)-3HF.

4.4 Badanie cytotoksyczności związków

4.4.1 Wyniki testu z czerwienią obojętną

Aktywność cytotoksyczną 3-hydroksyflawonu (3HF), jego kompleksów z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II) oraz cisplatyny oceniano przy wykorzystaniu testu z czerwienią obojętną po 48 godzinach inkubacji. Test ten opiera się na zdolności żywych, aktywnych metabolicznie komórek do gromadzenia barwnika w lizosomach.

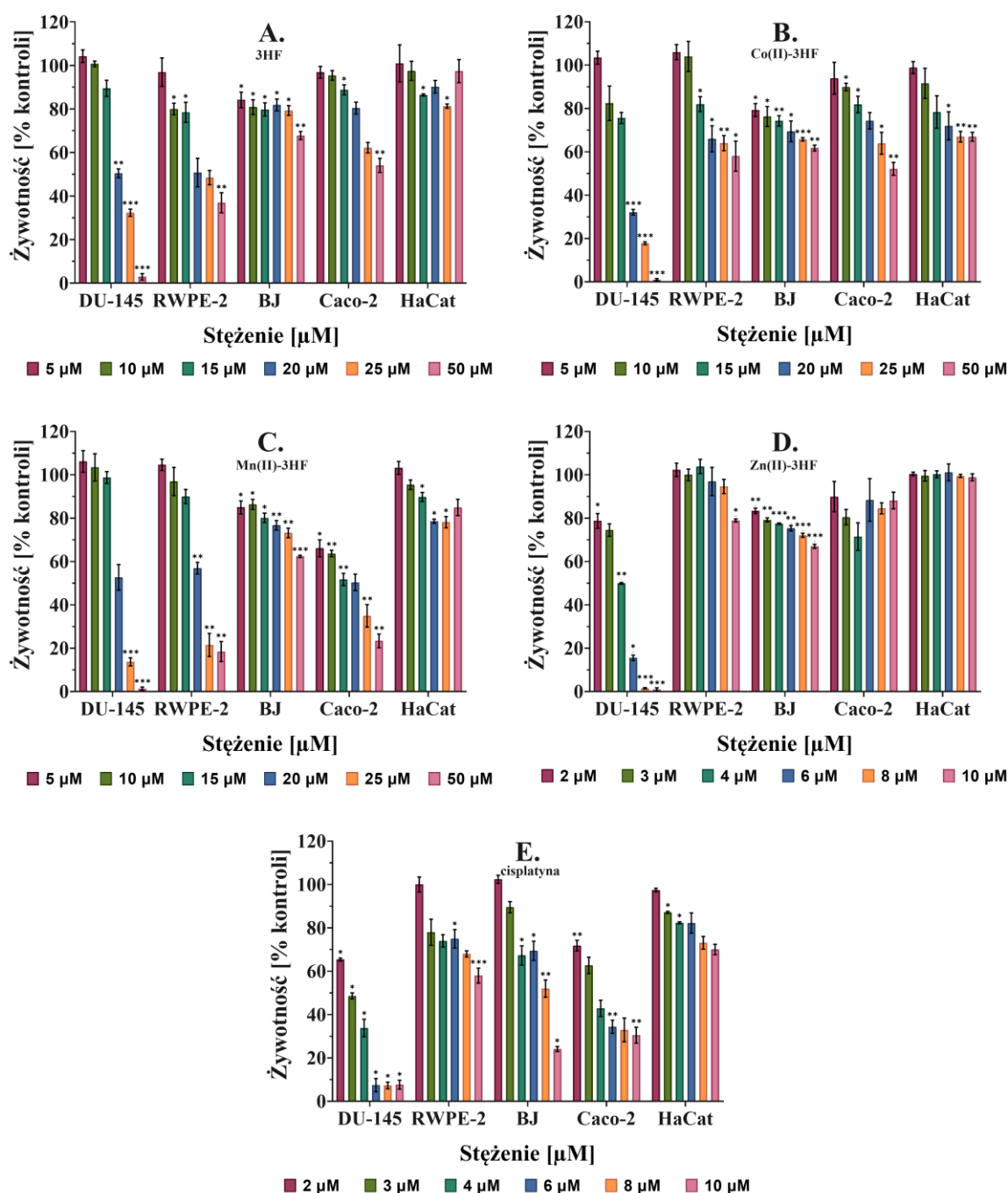
Prawidłowy wzrost komórek w każdym eksperymencie został potwierdzony kontrolą pozytywną (komórki w odpowiednim medium bez dodatku związków), natomiast kontrole negatywne wykluczyły zanieczyszczenie pożywki. Uzyskane wyniki zostały przedstawione jako procentowa żywotność w stosunku do kontroli pozytywnej. Zależność odpowiedzi komórkowej od stężenia zastosowanego związku analizowano za pomocą regresji nieliniowej przy użyciu programu GraphPad Prism, a wartości IC_{50} obliczano tylko wtedy, gdy żywotność komórek spadła poniżej 50% w badanym zakresie stężeń i gdy model regresji nieliniowej wykazał satysfakcjonujące parametry dopasowania. Uzyskane wartości IC_{50} podsumowano w tabeli 10. W niektórych przypadkach wyliczona wartość IC_{50} wynikała z matematycznego dopasowania krzywej do niepełnego zakresu odpowiedzi komórkowej, a w związku z tym nie odpowiadała bezpośrednio stężeniu powodującemu 50% redukcję przeżywalności względem kontroli.

Tab. 10. Wartości IC_{50} [μ M] badanych związków po 48-godzinnej inkubacji wyznaczone przy użyciu testu z czerwienią obojętną.

Związek	DU-145	RWPE-2	BJ	Caco-2	HaCaT
	IC_{50} [μ M] R^2				
3HF	20,99 0,988	16,62 0,940	–	–	–
Co(II)-3HF	17,44 0,989	–	–	–	–
Mn(II)-3HF	20,20 0,993	19,66 0,983	–	15,22 0,909	–
Zn(II)-3HF	4,08 0,980	–	–	–	–
cisplatyna	2,39 0,988	–	10,27 0,956	2,58 0,980	–

– nie określono IC_{50}

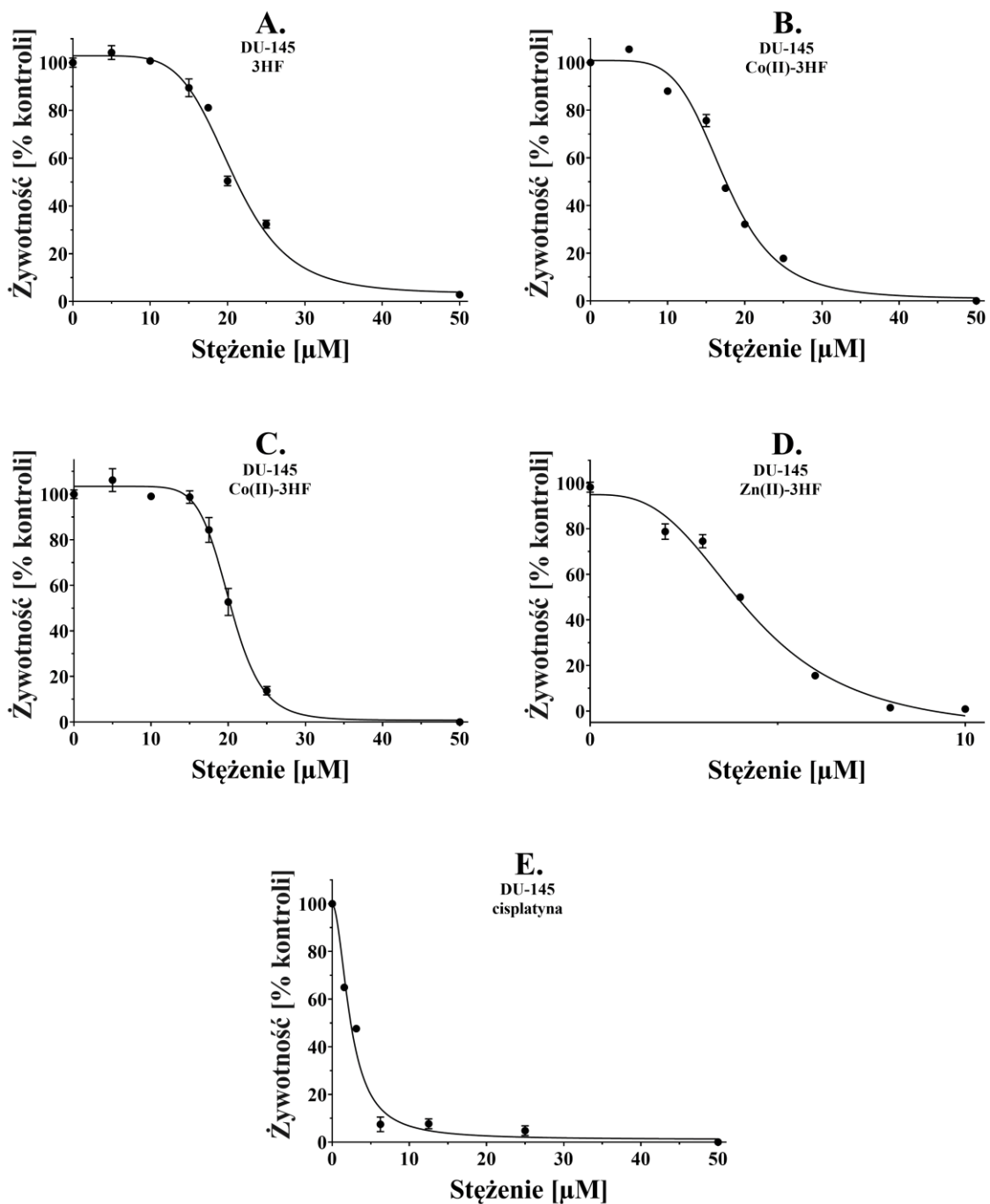
Zbiorcze wyniki przeżywalności komórek przedstawiono na rysunku 19.



Rys. 19. Wpływ związków na żywotność komórek po 48-godzinnej inkubacji z różnymi stężeniami: (A.) 3HF, (B.) Co(II)-3HF, (C.) Mn(II)-3HF, (D.) Zn(II)-3HF, (E.): cisplatylna. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD. Istotność statystyczną względem kontroli oceniano z wykorzystaniem analizy wariancji (ANOVA) oraz testu Dunnetta do porównań z grupą kontrolną (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; wyniki nieoznaczone są nieistotne statystycznie). Analizy wykonano przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.

Przeprowadzone analizy wykazały zależny od stężenia spadek żywotności komórek pod wpływem badanych związków, przy czym najbardziej znaczący efekt cytotoksyczny odnotowano w przypadku linii komórkowej raka gruczołu krokowego DU-145. Wolny ligand, 3-hydroksyflawon (3HF), w najwyższym badanym stężeniu obniżył żywotność komórek do poziomu 2,88% względem kontroli, osiągając wartość IC_{50} równą $20,99 \mu\text{M}$ (Rys. 20A.).

Proces kompleksowania z jonami metali w zróżnicowany sposób modyfikował aktywność biologiczną 3HF. Wobec linii DU-145 kompleks Co(II)-3HF wykazał nieznacznie wyższą aktywność niż wolny ligand ($IC_{50} = 17,44 \mu\text{M}$), redukując przeżywalność komórek do 1,02% w stężeniu $50 \mu\text{M}$ (Rys. 20B.). Z kolei dla kompleksu Mn(II)-3HF odnotowano niemal całkowitą redukcję żywotności w najwyższym stężeniu, mimo że wyznaczona wartość IC_{50} ($20,20 \mu\text{M}$) była zbliżona do wyniku uzyskanego dla wolnego 3HF (Rys. 20C.). Kluczową zmianę aktywności zaobserwowano w przypadku kompleksu Zn(II)-3HF , dla którego wartość IC_{50} wobec komórek DU-145 wyniosła $4,08 \mu\text{M}$ (Rys. 20D.). Już przy stężeniu $10 \mu\text{M}$ żywotność populacji spadła poniżej 1% względem kontroli, co potwierdza silny potencjał cytotoksyczny tego związku. Cisplatyna, pełniąc rolę leku referencyjnego, wykazała wartość IC_{50} na poziomie $2,39 \mu\text{M}$ (Rys. 20E.). Jest to wynik spójny z danymi literaturowymi, przypisującymi jej działanie mechanizmom generowania reaktywnych form tlenu oraz indukowania uszkodzeń DNA i mitochondriów [277]. Wysoka aktywność kompleksu Zn(II)-3HF , porównywalna z działaniem cisplatyny, wskazuje na jego istotny potencjał w aspekcie poszukiwania nowych środków przeciwnowotworowych.



Rys. 20. Żywotność komórek linii DU-145 w zależności od stężenia: (A.) 3HF, (B.) Co(II)-3HF, (C.) Mn(II)-3HF, (D.) Zn(II)-3HF, (E.): cisplatyny. Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD. Linia ciągła przedstawia dopasowanie krzywej regresji nieliniowej, na podstawie której wyznaczono wartość IC_{50} . Analizę przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.

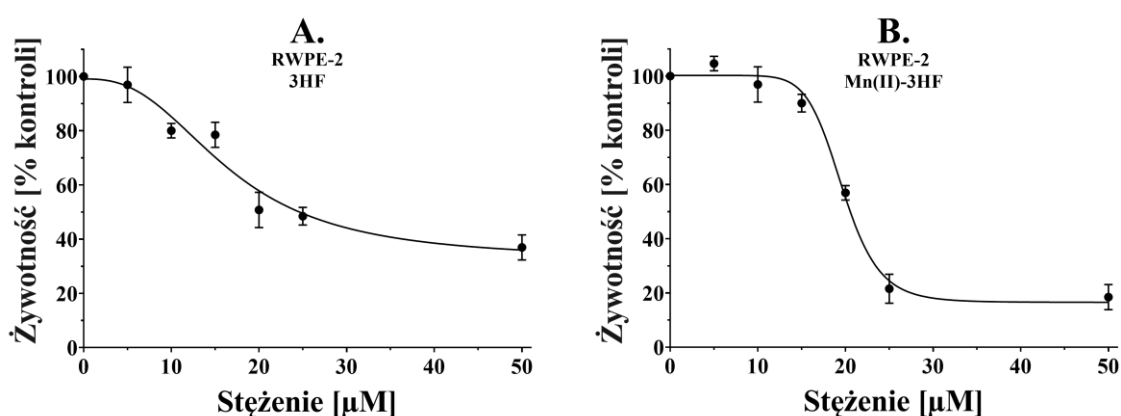
Wykazana wrażliwość komórek linii DU-145 na działanie badanego kompleksu z cynkiem(II) znajduje istotne uzasadnienie w specyfice metabolizmu tego pierwiastka w obrębie gruczołu krokowego. W warunkach fizjologicznych prostata charakteryzuje się unikalną zdolnością do akumulacji cynku, którego stężenie może być nawet dziesięciokrotnie wyższe niż w pozostałych tkankach miękkich [278]. Proces karcynogenezy wiąże się jednak z drastycznym spadkiem wewnątrzkomórkowej puli jonów Zn^{2+} , której poziom w tkance nowotworowej wynosi zaledwie 10–25% wartości obserwowanych w komórkach zdrowych. Zjawisko to wynika bezpośrednio z rearanżacji ekspresji specyficznych transporterów cynku oraz metabolicznego przeprogramowania komórek – przejścia z fenotypu wydzielającego cytryniany na fenotyp zdolny do ich utleniania, co promuje progresję nowotworu [279].

Dostępne dane literaturowe wskazują, że przywrócenie homeostazy cynku może indukować supresję proliferacji oraz szlak apoptozy w komórkach raka prostaty [280]. Uzzo i wsp. wykazali, że suplementacja cynkiem w liniach DU-145 i PC-3 prowadzi do inhibicji szlaku sygnałowego czynnika jądrowego NF- κ B, będącego kluczowym regulatorem odpowiedzi zapalnej i przeżywalności komórek. Ponadto zaobserwowano obniżenie ekspresji markerów związanych z angiogenezą i potencjałem metastatycznym, takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), interleukina 6 (IL-6, ang. *interleukin 6*) oraz metaloproteinaza macierzy 9 (MMP-9, ang. *matrix metalloproteinase 9*) [281]. Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie korelują z powyższymi doniesieniami, sugerując, że kompleks Zn(II)-3HF aktywnie interferuje z zależnymi od cynku szlakami sygnałowymi, specyficznymi dla złośliwego fenotypu komórek prostaty.

Ważną kwestią podczas poszukiwania nowych środków o działaniu cytotoksycznym jest ich selektywność wobec komórek nowotworowych. W niniejszej pracy wykorzystano linie komórkowe: prawidłowych ludzkich fibroblastów (BJ, ATCC CRL-2522), prawidłowych komórek epitelialnych prostaty (RWPE-2, ATCC CRL-3608) oraz spontanicznie unieśmiertelnioną ludzką linię keratynocytów (HaCaT, Cytion 300493) w celu porównania wpływu badanych związków na komórki prawidłowe i nowotworowe.

W przeciwieństwie do komórek linii raka gruczołu krokowego DU-145, komórki linii referencyjnych BJ, RWPE-2 i HaCaT wykazały znacząco niższą wrażliwość na działanie badanych związków. W przypadku ekspozycji na 3HF oraz jego kompleksy, żywotność komórek linii BJ i HaCaT nie spadła poniżej poziomu 60% w całym badanym zakresie stężeń, co uniemożliwiło wyznaczenie wartości IC_{50} . Co istotne, kompleks Zn(II)-3HF nie obniżył przeżywalności komórek linii RWPE-2, BJ oraz HaCaT poniżej 50% nawet przy zastosowaniu maksymalnego stężenia roboczego. Wynik ten wskazuje na korzystny profil bezpieczeństwa badanych substancji oraz sugeruje ich wysoką selektywność cytotoksyczną względem komórek nowotworowych prostaty. Analogiczną selektywność działania kompleksów cynku(II) wobec linii nowotworowych udokumentowano już w literaturze przedmiotu [282]. Ponadto ograniczona cytotoksyczność względem HaCaT koresponduje z doniesieniami wskazującymi, że w keratynocytach flawonoidy indukują częściej efekt regulacyjny lub cytostatyczny aniżeli bezpośredni szlak apoptozy [283,284].

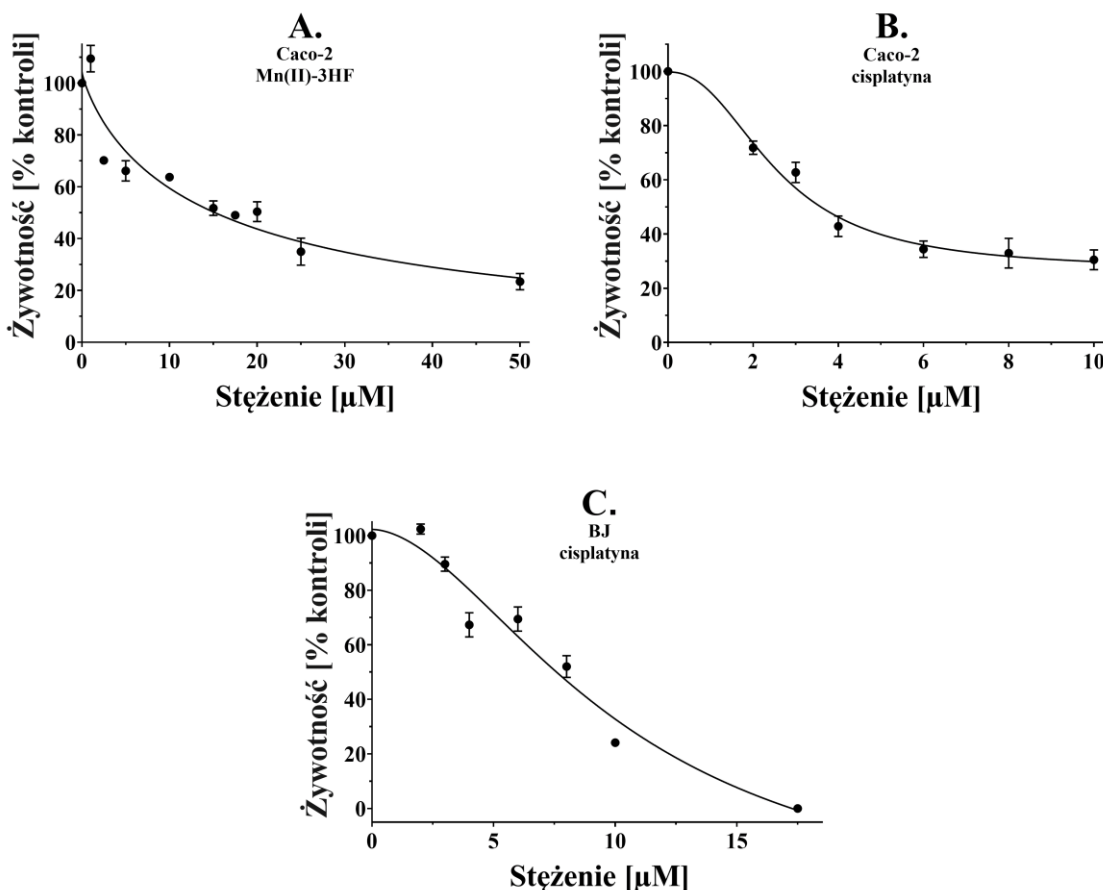
W badaniach cytotoksyczności wobec linii RWPE-2 wyznaczono wartości IC_{50} dla 3HF oraz kompleksu z manganem(II), niemniej jednak przy zastosowaniu najwyższego stężenia roboczego przeżywalność wynosiła odpowiednio ok. 37% i 18,5% (Rys. 21). Sugeruje to niepełny zakres odpowiedzi biologicznej w badanym układzie eksperymentalnym. W przypadku kompleksów kobaltu(II) i cynku(II) nie odnotowano spadku żywotności poniżej poziomu 50%. Uzyskane dane wskazują na ograniczoną toksyczność wobec niezłośliwego modelu komórek nabłonkowych prostaty, co w zestawieniu z wynikami dla linii nowotworowych może świadczyć o ich selektywności.



Rys. 21. Żywotność komórek linii RWPE-2 w zależności od stężenia: (A.) 3HF, (B.) Mn(II)-3HF. Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD. Linia ciągła przedstawia dopasowanie krzywej regresji nieliniowej, na podstawie której wyznaczono wartość IC_{50} .

Analizę przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.

Analogiczną zależność odnotowano w przypadku linii Caco-2. Choć dla kompleksu Mn(II)-3HF oraz cisplatyny matematyczna estymacja wartości IC_{50} była możliwa, minimalna przeżywalność komórek przy najwyższych stężeniach utrzymywała się w zakresie 24–40%, co sugeruje, że wygenerowane modele regresji nie odzwierciedlają w pełni profilu odpowiedzi cytotoksycznej w badanym zakresie stężeń (Rys. 22A., B.).



Rys. 22. Żywotność komórek linii Caco-2 w zależności od stężenia: (A.) Mn(II)-3HF i (B.) cisplatyny oraz linii BJ w zależności od stężenia: (C.) cisplatyny. Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD. Linia ciągła przedstawia dopasowanie krzywej regresji nieliniowej, na podstawie której wyznaczono wartość IC_{50} . Analizę przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.

Warto podkreślić, iż w odniesieniu do selektywności działania, cisplatyna wykazała istotnie wyższą aktywność wobec linii nowotworowej DU-145 w porównaniu z liniami nienowotworowymi. Należy jednak zaznaczyć, że mimo matematycznej korelacji umożliwiającej wyznaczenie relatywnie niskich wartości IC_{50} dla linii BJ oraz Caco-2, rzeczywisty efekt biologiczny w przypadku komórek prawidłowych był mniej wyraźny niż w modelu nowotworowym (Rys. 22C.). Sugeruje to, że wyznaczone parametry nie odzwierciedlają pełnego profilu odpowiedzi cytotoksycznej.

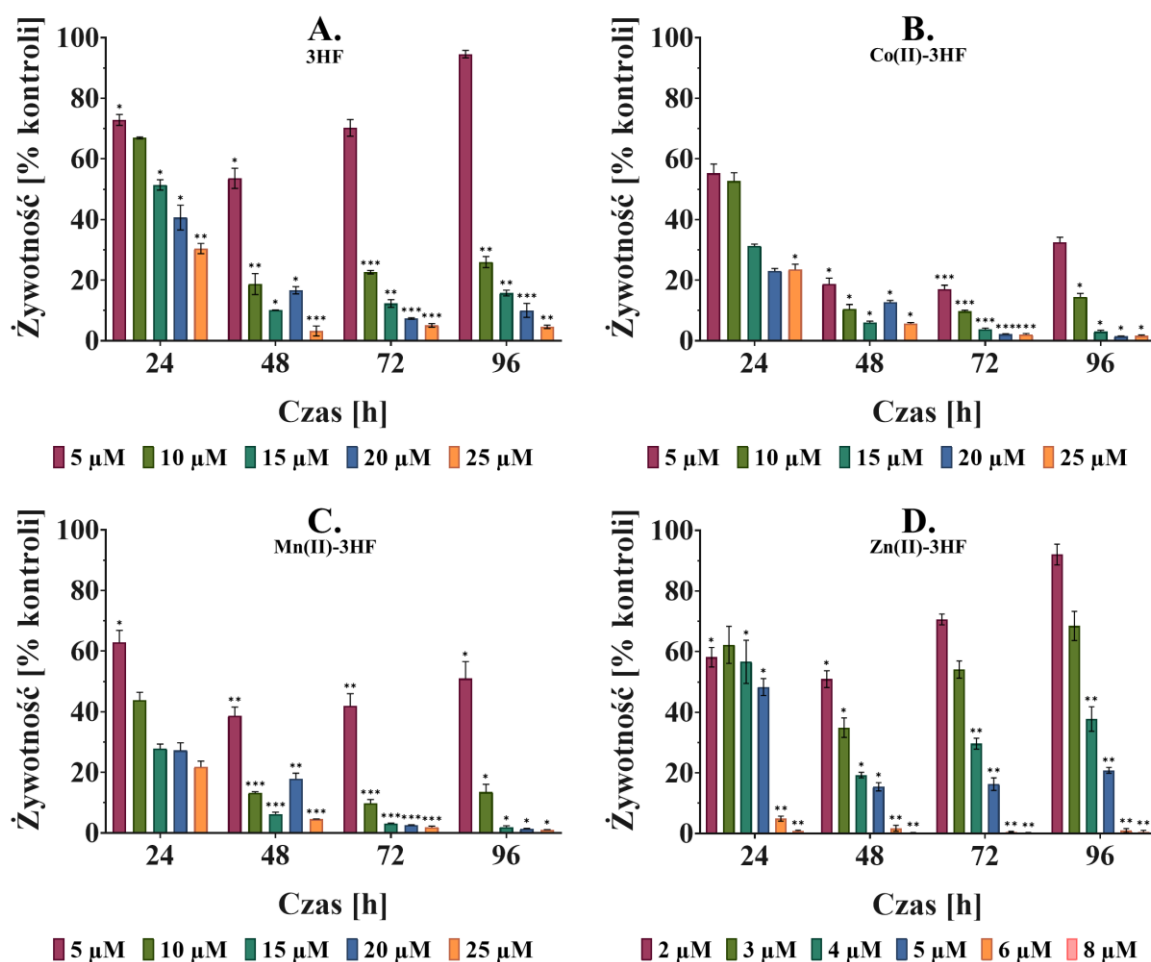
Analiza zgromadzonego materiału badawczego wskazuje, że kompleksy 3-hydroksyflawonu (3HF) z jonami metali d-elektronowych wykazują istotnie odmienną aktywność biologiczną w porównaniu z wolnym ligandem. Spośród zsyntetyzowanych związków, najbardziej obiecującym profilem farmakologicznym charakteryzował się kompleks Zn(II)-3HF. Wykazano jego wysoką cytotoksyczność wobec komórek raka gruczołu krokowego przy jednoczesnym zachowaniu ograniczonej toksyczności względem komórek prawidłowych, co determinuje korzystny indeks terapeutyczny. Mimo wystąpienia w wybranych układach niepełnej odpowiedzi komórkowej (plateau żywotności), ogólny profil aktywności badanych pochodnych 3HF wskazuje na ich wysoki potencjał aplikacyjny w projektowaniu nowych strategii chemoterapeutycznych.

4.4.2 Ocena kinetyki wzrostu komórek po usunięciu związków

W celu uzupełnienia wyników testów cytotoksyczności oraz rozróżnienia efektu cytostatycznego od trwałego, nieodwracalnego uszkodzenia komórek, przeprowadzono analizę potencjału proliferacyjnego komórek linii DU-145 po zakończeniu inkubacji. Doświadczenie obejmowało 48-godziną ekspozycję komórek na działanie 3-hydroksyflawonu oraz jego kompleksów metalicznych w zakresach stężeń 5–25 μM dla 3HF, Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF oraz 2–8 μM dla Zn(II)-3HF. Po upływie 48-godzin, badane związki zostały usunięte przez aspirację i zastąpione świeżym podłożem hodowlanym. Dalsza obserwacja zdolności komórek do re-populacji oraz regeneracji metabolicznej pozwoliła na ocenę trwałości indukowanych uszkodzeń komórkowych oraz określenie, czy zahamowanie wzrostu komórek linii DU-145 ma charakter stały, czy też jest efektem przejściowej supresji cyklu komórkowego [220].

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano, iż charakter oddziaływania 3-hydroksyflawonu na linię DU-145 jest ściśle związany z zastosowanym stężeniem związku. Trwały, nieodwracalny efekt cytotoksyczny odnotowano po ekspozycji komórek na 3HF w stężeniach przekraczających wartość IC_{50} (tj. powyżej 20,99 μM) (Rys. 23A.). W przypadku zastosowania niższych dawek (w zakresie 5–20 μM), po usunięciu czynnika badanego i wprowadzeniu świeżej pożywki, zaobserwowano statystycznie istotną zdolność populacji komórkowej do częściowej regeneracji metabolicznej. Analogiczną zależność stwierdzono dla kompleksu Zn(II)-3HF, pomimo jego znacząco wyższej aktywności pierwotnej wykazanej w teście z czerwienią obojętną (NR) (Rys. 23D.).

Wyniki te sugerują, że mechanizm działania badanych związków, choć wysoce efektywny, może mieć charakter odwracalny przy stężeniach niższych od wyznaczonych wartości IC_{50} , co wskazuje na dominację efektu cytostatycznego nad proapoptotycznym w tym zakresie stężeń [285].



Rys. 23. Żywotność komórek linii DU-145 w wybranych punktach czasowych po usunięciu badanych związków: (A.) 3HF, (B.) Co(II)-3HF, (C.) Mn(II)-3HF, (D.) Zn(II)-3HF, określona przy użyciu testu z czerwiecią obojętną. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD (GraphPad Prism 8.0.1).

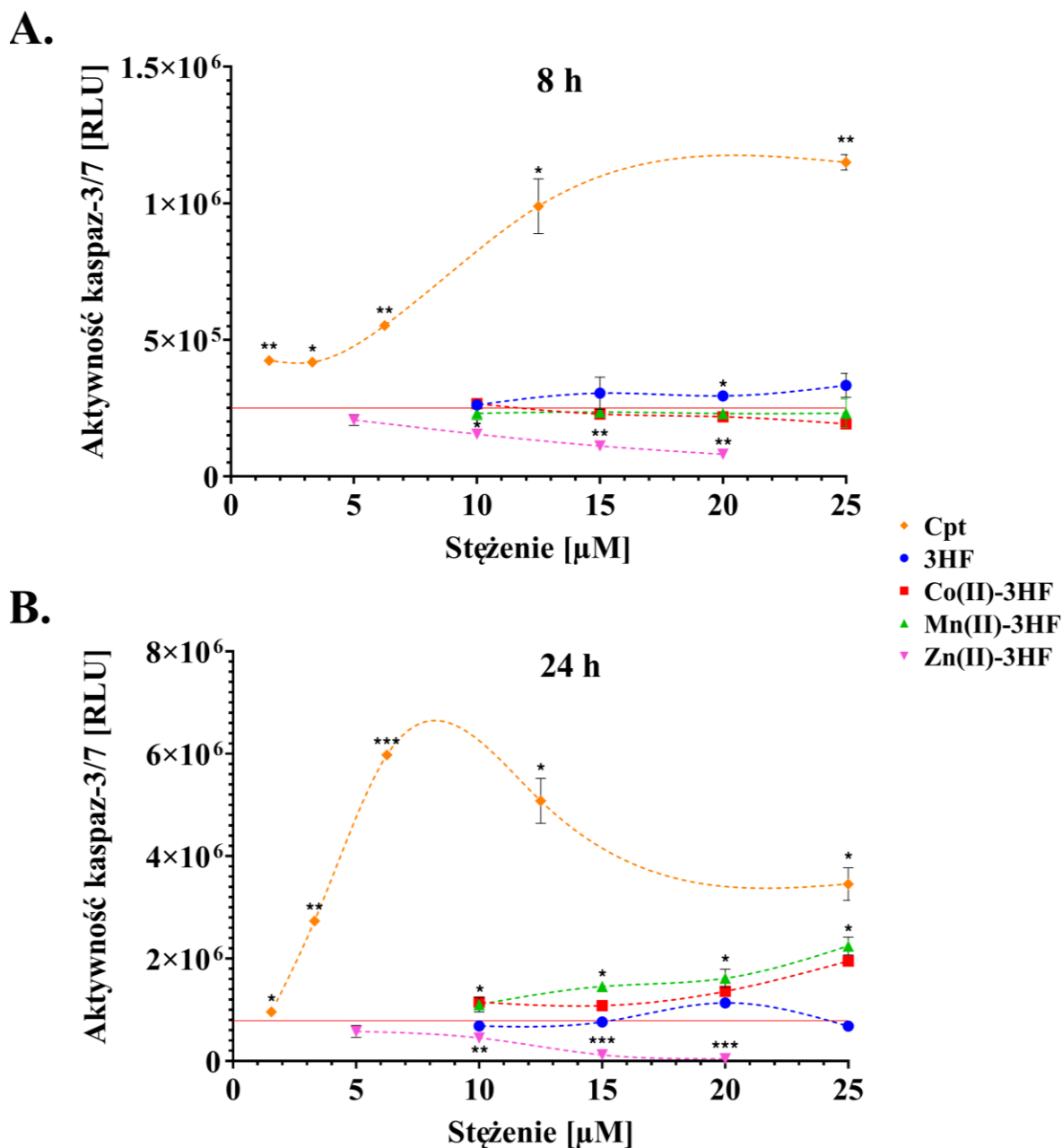
Uzyskane dane korelują z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi modulacji żywotności komórek przez związki cynku. Przykładowo, w badaniach nad wpływem nanocząstek ZnO na mysią linię spermatogonialną GC-1 spg (ATCC CRL-2053) wykazano, że po eliminacji ksenobiotyku z mikrośrodowiska hodowli, komórki zachowywały zdolność do dalszej proliferacji. Niemniej jednak, podobnie jak w niniejszej pracy, powrót żywotności do poziomu grupy kontrolnej był niepełny, co może świadczyć o trwałym upośledzeniu wybranych szlaków metabolicznych lub indukcji starzenia komórkowego [286].

Odmiennej profil aktywności biologicznej odnotowano w przypadku kompleksów Co(II)-3HF oraz Mn(II)-3HF (Rys. 23B.,C.). W przeciwieństwie do efektów obserwowanych dla liganda i kompleksu z cynkiem, oba te związki indukowały trwałe obniżenie żywotności komórek linii DU-145, które utrzymywało się po usunięciu czynnika cytotoksycznego z medium hodowlanego. Co szczególnie istotne, efekt ten odnotowano już przy stężeniu 15 μM , a więc poniżej wyznaczonych wartości IC_{50} (wynoszących odpowiednio 17,44 μM dla kompleksu kobaltu oraz 20,20 μM dla kompleksu manganu). Całkowity brak zdolności komórek do regeneracji metabolicznej sugeruje, że związki te inicjują kaskadę zdarzeń molekularnych prowadzących do nieodwracalnej śmierci komórkowej w krótkim czasie od momentu ekspozycji. Obserwacja ta znajduje potwierdzenie w literaturze dotyczącej kompleksów flawonoidów z jonami metali przejściowych. Utrzymujący się efekt cytotoksyczny tych związków koordynacyjnych jest często wiązany z zaburzeniem wewnątrzkomórkowej homeostazy redoks [287]. Zjawisko to może wynikać z właściwości redoks jonów metali przejściowych, sprzyjających generowaniu nadmiaru reaktywnych form tlenu, co prowadzi do permanentnego stresu oksydacyjnego [288,289]. W konsekwencji dochodzi do aktywacji szlaków efektorowych programowanej śmierci komórki, w szczególności apoptozy zależnej od mitochondriów, wywołanej uszkodzeniami DNA i peroksydacją lipidów błonowych [290].

4.4.3 Wyniki testu *ApoTox-GloTM Triplex Assay*

Test *ApoTox-GloTM Triplex Assay* umożliwia jednoczesną ocenę żywotności, cytotoksyczności oraz aktywacji apoptozy w tej samej populacji komórek. W niniejszej pracy skupiono się na aktywności kluczowych efektorowych kaspaz -3 i -7, aktywowanych przez inicjatorowe kaspazy-8 lub -9, w odpowiedzi zarówno na sygnały zewnątrzkomórkowe (cytokiny), jak i sygnały stresu wewnątrzkomórkowego. Badania przeprowadzono dla komórek linii raka prostaty DU-145, po inkubacji komórek z cisplatyną oraz badanymi związkami przez 8 i 24 godziny.

Po inkubacji, do dołków dodano odczynnik Caspase-Glo[®] 3/7, powodujący lizę komórek. W swoim składzie zawiera on substrat sprzężony z sekwencją DEVD, specyficznie rozpoznawaną przez kaspazy-3 i -7. Rozszczepienie substratu przez kaspazy powoduje uwolnienie aminolucyferyny, która w reakcji katalizowanej przez lucyferazę generuje sygnał luminescencyjny, proporcjonalny do aktywności kaspaz-3 i -7 [221]. Wyniki przeprowadzonego testu przedstawiono na rysunku 24.



Rys. 24. Aktywność kaspaz-3 i -7 w komórkach raka prostaty DU-145 po (A.) 8-godzinnej i (B.) 24-godzinnej inkubacji z cisplatyną (Cpt) i badanymi związkami, oznaczona przy użyciu testu ApoTox-Glo™ Triplex Assay. Dane przedstawiono jako średnie wartości sygnału luminescencyjnego (RLU) \pm SD. Istotność statystyczną pomiędzy grupami traktowanymi badanym związkiem a grupą kontrolną oceniano przy użyciu testu t dla prób niezależnych z korektą Holm-Sidak (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; wyniki nieoznaczone są nieistotne statystycznie). Czerwona linia pozioma oznacza aktywność kaspaz w kontroli. Krzywe przedstawiają poglądowy, wygładzony trend danych. Analizy wykonano przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.

Po 8-godzinnej ekspozycji komórek na działanie cisplatyny odnotowano zależny od dawki wzrost poziomu luminescencji (Rys. 24A.). Obserwowana zależność koreluje z powszechnie uznanym mechanizmem cytotoksyczności tego związku, obejmującym indukcję stresu oksydacyjnego, generowanie trwałych uszkodzeń w obrębie jądrowego i mitochondrialnego DNA oraz dysfunkcję mitochondriów, co w konsekwencji prowadzi do kaskadowej aktywacji programowanej śmierci komórki na drodze apoptozy [291,292]. W przeciwieństwie do cytostatyka, 3-hydroksyflawon oraz jego kompleksy metaliczne indukowały niewielkie zmiany w aktywności kaspaz, oscylujące na poziomie zbliżonym do grupy kontrolnej. Najniższą wartość sygnału luminescencyjnego odnotowano w przypadku kompleksu Zn(II)-3HF. Brak aktywacji kaspaz sugeruje, iż w badanym punkcie czasowym (8 godzin) apoptoza nie stanowi dominującego mechanizmu cytotoksyczności tych związków, a inicjacja odpowiedzi komórkowej może wymagać dłuższego czasu ekspozycji lub być związana ze szlakami niezależnymi od kaspaz.

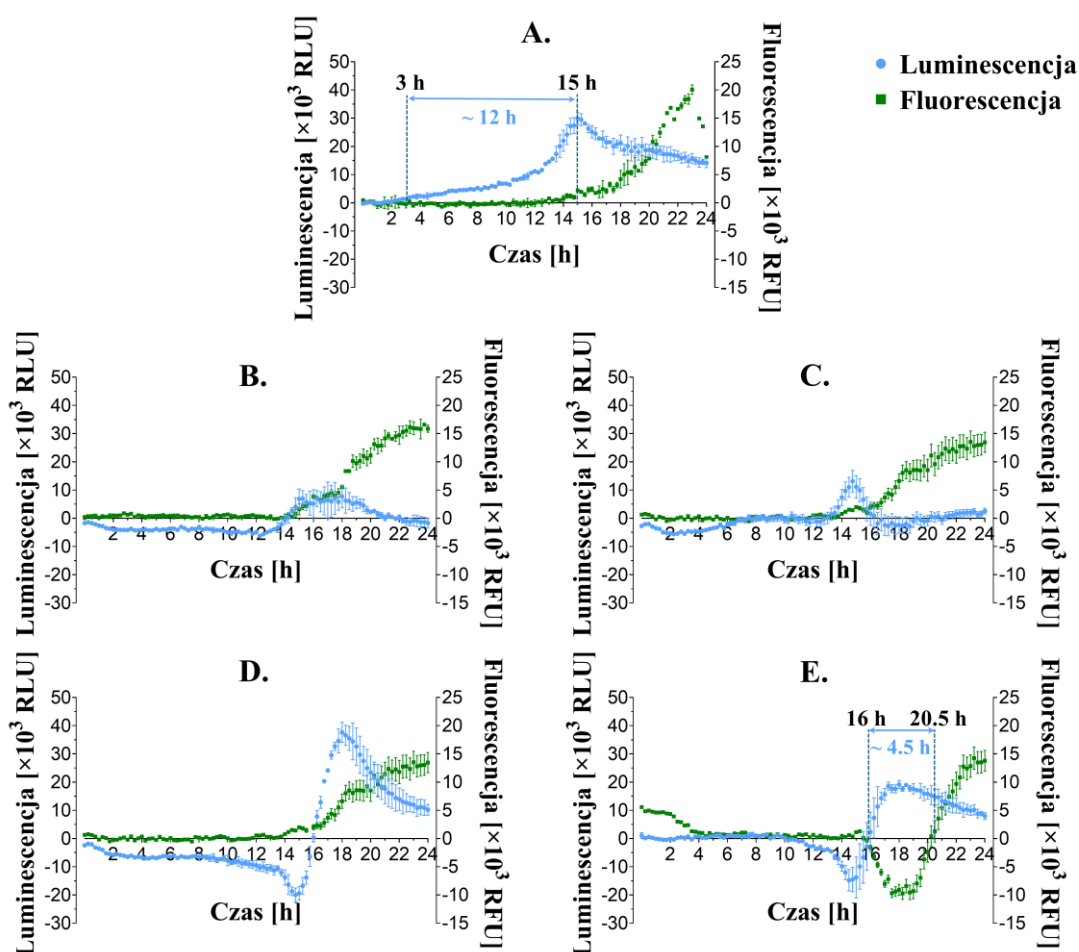
Po 24-godzinnej inkubacji profile aktywności kaspaz uległy zmianie w zależności od rodzaju związku (Rys. 24B.). Po zastosowaniu cisplatyny aktywność kaspaz-3/7 wciąż była wysoka, przy czym maksymalny sygnał luminescencji zaobserwowano przy stężeniu niższym, niż po krótszej inkubacji. Spadek sygnału przy wysokim stężeniu związku może świadczyć o szybkim przejściu komórek w nekrozę wtórną, podczas której dochodzi do utraty integralności błony komórkowej i wygaśnięcia aktywności kaspaz [293]. Kompleksy Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF wykazały zwiększoną zdolność do aktywacji kaspaz -3 i -7 w sposób zależny od stężenia w porównaniu z wolnym ligandem, przy czym efekt jest szczególnie widoczny dla kompleksu z manganem(II). Wynik wskazuje na udział klasycznej apoptozy, co jest zgodne z doniesieniami o zdolności kompleksów tego metalu do generowania reaktywnych form tlenu, uszkodzeń mitochondriów i aktywacji szlaków związanych z kaspazami, przy czym możliwy jest również udział autofagii [289,294]. Kompleks Co(II)-3HF spowodował nieznaczny wzrost aktywności kaspaz, co może wskazywać, że mimo zdolności jonów tego metalu do indukcji stresu oksydacyjnego i zaburzeń mitochondrialnych, proces śmierci komórkowej może przebiegać z udziałem szlaków niezależnych od kaspaz [295].

Najbardziej charakterystyczny profil odpowiedzi komórkowej wykazał kompleks Zn(II)-3HF (Rys. 24), dla którego zaobserwowano znaczny spadek sygnału luminescencyjnego wraz ze wzrostem stężenia, mimo wykazywanej wcześniej cytotoksyczności w teście z czerwienią obojętną.

Jest to zgodne z udokumentowaną zdolnością jonów cynku do hamowania aktywności kaspaz inicjatorowych i wykonawczych poprzez konkurowanie z ich centrami aktywnymi. Niski sygnał nie świadczy o braku indukcji śmierci komórkowej, lecz może wskazywać na udział mechanizmów niezależnych od aktywności kaspaz [296,297].

4.4.4 Wyniki testu *RealTime-GloTM Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay*

Zastosowanie testu *RealTime-GloTM Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay* umożliwiło kinetyczną ocenę przebiegu śmierci komórek linii raka prostaty DU-145, z rozróżnieniem wczesnej apoptozy oraz wtórnej nekrozy. Nielityczny charakter tej metody pozwolił na jednoczesny pomiar luminescencji, związanej z translokacją fosfatydyloseryny (PS) do zewnętrznej błony komórkowej oraz fluorescencji, będącej wynikiem przenikania barwnika fluorescencyjnego wiążącego DNA do wnętrza komórki po utracie integralności błony [298]. Wyniki pomiarów przedstawiono na rysunku 25.



Rys. 25. Profile kinetyczne ekspozycji PS (luminescencja) i utraty integralności błony komórkowej (fluorescencja) dla: (A.) 2 μ M cisplatyny, (B.) 10 μ M 3HF, (C.) 10 μ M Co(II)-3HF, (D.) 10 μ M Mn(II)-3HF, (E.) 2 μ M Zn(II)-3HF.

Dane przedstawiono jako średnia \pm SD (GraphPad Prism 8.0.1).

Jako związek referencyjny zastosowano cisplatynę, która w stężeniu zbliżonym do $\frac{1}{2}$ IC₅₀ wykazała klasyczny, apoptotyczny profil odpowiedzi komórkowej (Rys. 25A.). Wzrost sygnału luminescencji nastąpił szybko, po około 3 godzinach od rozpoczęcia testu, osiągając maksimum po około 15 h. Po tym czasie sygnał zaczął spadać, a jednocześnie zaobserwowano wzrost fluorescencji. Obserwowana luka czasowa pomiędzy tymi dwoma sygnałami wskazuje na indukcję apoptozy, która następnie przechodzi w etap wtórnej nekrozy [223]. Obserwacja ta potwierdza udokumentowany mechanizm działania cisplatyny, która w komórkach nowotworowych powoduje uszkodzenia DNA oraz indukuje stres oksydacyjny, co prowadzi do aktywacji szlaków apoptotycznych, a następnie do rozpadu komórek [292].

W przeciwieństwie do cisplatyny, 3-hydroksyflawon i jego kompleksy wywołały mierzalną odpowiedź komórkową znacznie później, po około 14 godzinach od ekspozycji. Sugeruje to odmienny, wydłużony w czasie mechanizm inicjacji śmierci komórkowej, przypuszczalnie związany z powolniejszą kinetyką działania i stopniowym narastaniem wewnątrzkomórkowych zmian (np. zaburzeń równowagi redoks), co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi wskazującymi, że działanie flawonoidów ma charakter zależny od czasu, a wyraźne efekty cytotoksyczne zauważalne są dopiero po dłuższej inkubacji komórek [299].

3HF i kompleks Co(II)-3HF wykazały zbliżony profil odpowiedzi komórkowej (Rys. 25B,C). W obu przypadkach zaobserwowano niewielki i krótkotrwały wzrost sygnału luminescencyjnego, który następnie ustępował wyraźnemu i utrzymującemu się sygnałowi fluorescencyjnemu. Taki przebieg wskazuje, że apoptoza nie jest dominującym mechanizmem indukowanym przez te związki, a proces prowadzi raczej do nekrozy lub nekroptozy. Powyższy profil koresponduje z właściwościami opisanymi dla polifenoli oraz wybranych kompleksów kobaltu, których aktywność biologiczna nie zawsze związana jest z aktywacją klasycznych szlaków apoptotycznych, a która silnie zależy od rodzaju liganda i struktury kompleksu [300,301].

Odmienny profil odpowiedzi wykazał kompleks z manganem(II), dla którego zauważono gwałtowny wzrost sygnału luminescencyjnego (Rys. 25D.). Krótco po osiągnięciu maksimum luminescencja zaczęła spadać, a niemal równocześnie zauważono wzrost sygnału fluorescencyjnego. Taki przebieg procesu wskazuje na indukcję apoptozy, która jednak szybko przechodzi w nekrozę wtórną. Zjawisko to tłumaczy udowodniona zdolność kompleksów manganu do wywołania zwiększonej produkcji

reaktywnych form tlenu, co prowadzi do uszkodzeń mitochondriów, aktywacji szlaków apoptozy oraz rozpadu błon komórkowych [302].

Dla kompleksu Zn(II)-3HF zauważono profil odpowiedzi komórkowej zbliżony do działania cisplatyny (Rys. 25E.). Zauważono wyraźny wzrost zarówno luminescencji, jak i fluorescencji, a opóźnienie (około 4,5 h) pomiędzy maksimum luminescencji a gwałtownym wzrostem sygnału fluorescencji wskazuje na sekwencyjny przebieg procesu apoptozy zakończony wtórną nekrozą, co jest charakterystyczne dla zaprogramowanej śmierci komórkowej [223]. Podobny efekt opisywano wcześniej w badaniach, w których naruszenie homeostazy cynku prowadziło do indukcji stresu oksydacyjnego, dysfunkcji mitochondriów oraz indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych [303].

Liczne badania dowodzą, że flawonoidy i ich pochodne mogą indukować apoptozę w komórkach raka prostaty DU-145, między innymi poprzez modulację szlaków związanych z przeżyciem komórki [304–306], aktywację kaskad prowadzących do zaprogramowanej śmierci oraz regulację białek z rodziny Bcl-2 [307–309]. Apoptoza uważana jest za pożądany mechanizm, ponieważ umożliwia eliminację komórek nowotworowych bez wywoływania reakcji zapalnej, charakterystycznej dla nekrozy [310]. Uzyskane wyniki pozwalają na wstępne rozróżnienie procesów apoptozy i nekrozy, jednak do jednoznacznej identyfikacji szlaków molekularnych niezbędne byłoby wykonanie dalszych badań, takich jak na przykład analiza poziomu ekspresji białek pro- i antyapoptycznych, precyzyjne różnicowanie stadiów śmierci komórkowej za pomocą cytometrii przepływowej czy też bezpośredni pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia reaktywnych form tlenu [97].

Podsumowanie wyników testów ApoTox-Glo™ oraz RealTime-Glo™ Annexin V

Porównanie wyników uzyskanych dzięki zastosowaniu testów ApoTox-Glo™ Triplex Assay oraz RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis & Necrosis Assay wykazało, że badane kompleksy indukują odmienne mechanizmy śmierci komórkowej w komórkach linii DU-145. W przypadku cisplatyny oba testy wykazały zgodny profil odpowiedzi komórkowej, świadczący o aktywacji kaspaz-3 i -7 oraz o sekwencyjnym przejściu apoptozy w nekrozę wtórną, co stanowi klasyczny obraz działania tego cytostatyka [311]. 3-hydroksyflawon i jego kompleks z kobaltem nie wykazały aktywacji kaspaz-3 i -7, przy jednoczesnych zmianach fenotypowych w teście z aneksyną V, co sugeruje dominację mechanizmów śmierci komórkowej niezależnych od kaspaz. Kompleks Mn(II)-3HF

indukował krótkotrwałą aktywację apoptozy, szybko przechodzącą w nekrozę wtórną, przy zwiększonej aktywności kaspaz-3/7, co jest charakterystyczne dla silnego stresu oksydacyjnego i dysfunkcji mitochondriów. Interesującą odpowiedź komórkową wykazał kompleks Zn(II)-3HF, dla którego wyniki testu z aneksyną V wskazały na indukcję apoptozy, podczas gdy aktywność kaspaz-3 i -7 pozostawała niska. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być udowodniona w literaturze zdolność jonów cynku do hamowania aktywności kaspaz efektorowych [296,297]. Analiza wyników obu testów wskazuje, że badane kompleksy różnią się nie tylko siłą działania cytotoksycznego, ale również mechanizmem indukowanej śmierci komórkowej.

5 Podsumowanie

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza oraz ocena fizykochemiczna i biologiczna nowych kompleksów 3-hydroksyflawonu z wybranymi jonami metali przejściowych. Przeprowadzone badania umożliwiły realizację założonych celów, a na ich podstawie sformułowano następujące wnioski:

1. Potwierdzono skuteczną syntezę nowych kompleksów o charakterze mononuklearnym i ogólnym wzorze $ML_2 \cdot nH_2O$ ($M = Co(II), Mn(II)$ lub $Zn(II)$; $L = C_{15}H_9O_3^-$), przy czym liczba cząsteczek wody wynosi $n = 2$ dla kompleksów kobaltu(II) i manganu(II) oraz $n = 1$ dla kompleksu cynku(II).

2. Wyniki analiz spektroskopowych (UV-Vis, FT-IR, NMR) wskazały, że koordynacja jonów metali zachodzi poprzez układ 3-hydroksy-4-karbonyłowy liganda.

3. Analiza widm masowych potwierdziła obecność jonów molekularnych typu ML_2 , co jest zgodne z proponowaną stechiometrią kompleksów.

4. Badania aktywności przeciwutleniającej wykazały, że kompleksowanie 3-hydroksyflawonu z jonami metali prowadzi do obniżenia zdolności zmiatania rodników DPPH•, co można wiązać z zaangażowaniem grupy hydroksylowej w proces koordynacji. Efekt ten był najbardziej widoczny dla kompleksu cynku(II).

5. Wykazano, że kompleksowanie wpływa na aktywność przeciwbakteryjną 3-hydroksyflawonu w sposób zależny od jonu metalu oraz badanego szczepu. Wobec *Escherichia coli* największą poprawę właściwości zaobserwowano dla kompleksów $Zn(II)$ -3HF i $Co(II)$ -3HF, natomiast w przypadku bakterii Gram-dodatnich wyraźny efekt odnotowano dla szczepu *Staphylococcus epidermidis*, wobec którego kompleksy $Co(II)$ -3HF i $Mn(II)$ -3HF wykazały wyższą aktywność niż wolny ligand, również wobec szczepu niewrażliwego na oksacylinę. Wszystkie badane związki wykazały działanie bakteriostatyczne.

6. Kompleksy wykazały zależną od stężenia aktywność cytotoksyczną, przy czym największy efekt odnotowano wobec linii komórek raka prostaty DU-145. Badane związki nie wykazały istotnej cytotoksyczności wobec komórek nienowotworowych, co wskazuje na wysoką selektywność działania. Najwyższą aktywność, a zarazem najbardziej obiecujący profil terapeutyczny wykazał kompleks $Zn(II)$ -3HF.

7. Analiza regeneracji komórek po ekspozycji na związki wykazała, że 3HF i Zn(II)-3HF wywołują efekt częściowo odwracalny (cytostatyczny przy niższych stężeniach), natomiast kompleksy Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF powodują trwałe uszkodzenie komórek.

8. Wykazano, że badane kompleksy indukują różne mechanizmy śmierci komórkowej: wolny ligand i kompleks Co(II)-3HF wywołują głównie śmierć nieapoptyczną, Mn(II)-3HF wywołuje apoptozę przechodzącą w nekrozę wtórną, natomiast Zn(II)-3HF apoptozę niezależną od kaspaz.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że po raz pierwszy zsyntetyzowano kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami kobaltu(II), manganu(II) i cynku(II), które poddano kompleksowej charakterystyce fizykochemicznej, umożliwiającej określenie ich struktury oraz właściwości. Przeprowadzone badania biologiczne wykazały, że kompleksowanie wpływa na aktywność przeciwbakteryjną badanych związków, a uzyskane efekty wskazują na ich potencjalne znaczenie aplikacyjne. Najbardziej istotne rezultaty uzyskano w badaniach cytotoksyczności, w których wykazano wysoką aktywność oraz selektywność działania kompleksów względem komórek nowotworowych, szczególnie dla kompleksu Zn(II)-3HF. Otrzymane wyniki wskazują, że badane związki stanowią interesującą grupę układów koordynacyjnych o potencjale biologicznym, a dalsze badania, obejmujące pogłębioną analizę mechanizmów działania oraz modyfikację struktury ligandów, mogą przyczynić się do zwiększenia ich aktywności i poszerzenia możliwości zastosowań.

6 Spis tabel

Tab. 1. Skład roztworów wyjściowych wykorzystywanych do syntez	50
Tab. 2. Właściwości otrzymanych kompleksów	70
Tab. 3. Skład zsyntezowanych kompleksów	70
Tab. 4. Wyniki analizy termogravimetrycznej dla kompleksów z jonami Co(II), Mn(II), Zn(II)...	73
Tab. 5. Wyniki analizy DSC dla kompleksów z jonami Co(II), Mn(II), Zn(II)	75
Tab. 6. Rodzaje drgań i położenie pasm w widmach IR 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II)	83
Tab. 7. Wyniki analizy MS dla kompleksów z jonami Co(II), Mn(II), Zn(II)	90
Tab. 8. Wartości procentowej inhibicji rodnika DPPH [•] względem kontroli po 30 minutach inkubacji	92
Tab. 9. Wartości MIC 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów wobec szczepów <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i>	96
Tab. 10. Wartości IC ₅₀ [μM] badanych związków po 48-godzinnej inkubacji wyznaczone przy użyciu testu z czerwienią obojętną	100

7 Spis rysunków

Rys. 1. Podstawowy szkielet węglowy flawonoidów (2-fenylchromen) wraz z numeracją atomów węgla i oznaczeniem pierścieni. Opracowanie własne w programie ChemSketch 2024.2.0 w oparciu o [8]	9
Rys. 2. Główne klasy flawonoidów, opracowanie własne w programie ChemSketch 2024.2.0 w oparciu o [3]	10
Rys. 3. Struktura chemiczna 3-hydroksyflawonu wraz z numeracją atomów węgla. Opracowanie własne w programie ChemSketch 2024.2.0 w oparciu o [44]	16
Rys. 4. Schemat zasady działania testu ApoTox-Glo™ Triplex Assay w zakresie oceny zaawansowania apoptozy. Kaspazy-3/7 rozszczepiają substrat luminogeniczny DEVD-aminolucyferyny, co prowadzi do wygenerowania sygnału luminescencyjnego. Opracowano w oparciu o [221]	63
Rys. 5. Zasada działania testu RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay. W zdrowej komórce (A.) fosfatydyloseryna (PS) znajduje się wyłącznie w wewnętrznej warstwie błony komórkowej, a integralność błony jest zachowana; nie obserwuje się sygnału luminescencyjnego ani fluorescencyjnego. Podczas wczesnej apoptozy (B.) następuje translokacja PS do zewnętrznej warstwy, co umożliwia zbliżenie białek fuzyjnych aneksyny V i podjednostek lucyferazy, przy nienaruszonej błonie komórkowej obecny jest sygnał luminescencyjny. W przypadku wtórnej nekrozy (C.) dochodzi do zaburzenia integralności błony komórkowej, barwnik wiążący DNA przenika do wnętrza komórki – obserwowany jest jednocześnie sygnał luminescencyjny i fluorescencyjny. Opracowano w oparciu o [222]	65

- Rys. 6.** Kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami metali po syntezie: (A.) próbki bezpośrednio po zakończeniu reakcji (na mokro); (B.) próbki po procesie suszenia. Oznaczenia: (1) Zn(II)-3HF, (2) Mn(II)-3HF, (3) Co(II)-3HF.69
- Rys. 7.** Krzywe TG-DTG/DSC, zarejestrowane w atmosferze powietrza dla kompleksu: (A.) Co(II)-3HF, (B.) Mn(II)-3HF, (C.) Zn(II)-3HF.71
- Rys. 8.** Termogramy DSC, zarejestrowane w atmosferze azotu dla kompleksów: (A.) Zn(II)-3HF, (B.) Co(II)-3HF i (C.) Mn(II)-3HF.74
- Rys. 9.** Widma absorpcyjne 3HF ($c = 40 \mu\text{M}$) oraz nasyconych roztworów metanolowych jego kompleksów z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II).76
- Rys. 10.** Widma emisji fluorescencji 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II) w DMSO ($c = 40 \mu\text{M}$), zarejestrowane przy długościach fal wzbudzenia: (A.) 259 nm, (B.) 346 nm, (C.) 418 nm.78
- Rys. 11.** Porównanie widm FT-IR 3-hydroksyflawonu i kompleksów z jonami metali.81
- Rys. 12.** Widma FT-IR otrzymanych kompleksów: (A.) Co(II)-3HF, (B.) Mn(II)-3HF i (C.) Zn(II)-3HF. Pomarańczowe linie przedstawiają widma zarejestrowane bezpośrednio po wysuszeniu danego związku, niebieskie linie przedstawiają widma kompleksów po 24 miesiącach.84
- Rys. 13.** Widma $^1\text{H-NMR}$: (A.) 3-hydroksyflawonu i (B.) kompleksu Zn(II)-3HF. W ramach przedstawiono powiększony obszar widm obejmujący wybrane przesunięcia chemiczne (δ , ppm).86
- Rys. 14.** Widma $^1\text{H-NMR}$ kompleksów: (A.) Co(II)-3HF i (B.) Mn(II)-3HF.87
- Rys. 15.** Widma MS kompleksów: (A.) Co(II)-3HF, (B.) Mn(II)-3HF i (C.) Zn(II)-3HF.89
- Rys. 16.** Proponowana struktura kompleksów wybranych metali z 3-hydroksyflawonem: (A.) Co(II)-3HF i Mn(II)-3HF, gdzie $M = \text{Co(II)}$ lub Mn(II) , (B.) Zn(II)-3HF.91
- Rys. 17.** Zmiana absorbancji roztworu rodnika DPPH $^{\bullet}$ w funkcji czasu w obecności 3-hydroksyflawonu i jego kompleksów z jonami Co(II), Mn(II) i Zn(II).93
- Rys. 18.** Wzrost kolonii bakterii *Staphylococcus epidermidis* na podłożu MHA po posiewie zawartości dołków odpowiadających stężeniom MIC, $2 \times \text{MIC}$ oraz $4 \times \text{MIC}$ badanych związków: (A.) 3HF, (B.) Co(II)-3HF, (C.) Mn(II)-3HF i (D.) Zn(II)-3HF.99
- Rys. 19.** Wpływ związków na żywotność komórek po 48-godzinnej inkubacji z różnymi stężeniami: (A.) 3HF, (B.) Co(II)-3HF, (C.) Mn(II)-3HF, (D.) Zn(II)-3HF, (E.): cisplatyna. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD. Istotność statystyczną względem kontroli oceniano z wykorzystaniem analizy wariancji (ANOVA) oraz testu Dunnetta do porównań z grupą kontrolną (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; wyniki nieoznaczone są nieistotne statystycznie). Analizy wykonano przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.101
- Rys. 20.** Żywotność komórek linii DU-145 w zależności od stężenia: (A.) 3HF, (B.) Co(II)-3HF, (C.) Mn(II)-3HF, (D.) Zn(II)-3HF, (E.): cisplatyny. Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD. Linia ciągła przedstawia dopasowanie krzywej regresji nieliniowej, na podstawie której wyznaczono wartość IC_{50} . Analizę przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.103
- Rys. 21.** Żywotność komórek linii RWPE-2 w zależności od stężenia: (A.) 3HF, (B.) Mn(II)-3HF. Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD. Linia ciągła przedstawia dopasowanie krzywej

regresji nieliniowej, na podstawie której wyznaczono wartość IC ₅₀ . Analizę przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.	105
Rys. 22. Żywotność komórek linii Caco-2 w zależności od stężenia: (A.) Mn(II)-3HF i (B.) cisplatyny oraz linii BJ w zależności od stężenia: (C.) cisplatyny. Dane przedstawiono jako wartości średnie ± SD. Linia ciągła przedstawia dopasowanie krzywej regresji nieliniowej, na podstawie której wyznaczono wartość IC ₅₀ . Analizę przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.	106
Rys. 23. Żywotność komórek linii DU-145 w wybranych punktach czasowych po usunięciu badanych związków: (A.) 3HF, (B.) Co(II)-3HF, (C.) Mn(II)-3HF, (D.) Zn(II)-3HF, określona przy użyciu testu z czerwienią obojętną. Dane przedstawiono jako średnie ± SD (GraphPad Prism 8.0.1).	108
Rys. 24. Aktywność kaspaz-3 i -7 w komórkach raka prostaty DU-145 po (A.) 8-godzinnej i (B.) 24-godzinnej inkubacji z cisplatyną (Cpt) i badanymi związkami, oznaczona przy użyciu testu ApoTox-Glo™ Triplex Assay. Dane przedstawiono jako średnie wartości sygnału luminescencyjnego (RLU) ± SD. Istotność statystyczną pomiędzy grupami traktowanymi badanym związkiem a grupą kontrolną oceniano przy użyciu testu t dla prób niezależnych z korektą Holm-Sidak (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001; wyniki nieoznaczone są nieistotne statystycznie). Czerwona linia pozioma oznacza aktywność kaspaz w kontroli. Krzywe przedstawiają poglądowy, wygładzony trend danych. Analizy wykonano przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.1.	110
Rys. 25. Profile kinetyczne ekspozycji PS (luminescencja) i utraty integralności błony komórkowej (fluorescencja) dla: (A.) 2 μM cisplatyny, (B.) 10 μM 3HF, (C.) 10 μM Co(II)-3HF, (D.) 10 μM Mn(II)-3HF, (E.) 2 μM Zn(II)-3HF. Dane przedstawiono jako średnia ± SD (GraphPad Prism 8.0.1).	112

8 Literatura

- [1] S. Chen, X. Wang, Y. Cheng, H. Gao, X. Chen, A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids, *Molecules* 28 (2023) 4982. <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>.
- [2] A. Ullah, S. Munir, S.L. Badshah, N. Khan, L. Ghani, B.G. Poulson, A.H. Emwas, M. Jaremko, Important flavonoids and their role as a therapeutic agent, *Molecules* 25 (2020) 5243. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>.
- [3] H. Guven, A. Arici, O. Simsek, Flavonoids in Our Foods: A Short Review, *J. Basic Clin. Health Sci.* (2019) 96–106. <https://doi.org/10.30621/jbachs.2019.555>.
- [4] U. Mathesius, Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms, *Plants* 7 (2018) 30. <https://doi.org/10.3390/plants7020030>.
- [5] A. Samanta, G. Das, S.K. Das, Roles of flavonoids in plants, *Int. J. Pharm. Sci. Tech.* 6 (2011) 12–35.
- [6] Y. Mao, J. Luo, Z. Cai, Biosynthesis and Regulatory Mechanisms of Plant Flavonoids: A Review, *Plants* 14 (2025) 1847. <https://doi.org/10.3390/plants14121847>.
- [7] A. Shomali, S. Das, N. Arif, M. Sarraf, N. Zahra, V. Yadav, S. Aliniaiefard, D.K. Chauhan, M. Hasanuzzaman, Diverse Physiological Roles of Flavonoids in Plant Environmental Stress Responses and Tolerance, *Plants* 11 (2022) 3158. <https://doi.org/10.3390/plants11223158>.
- [8] PubChem, 2-fenylochromen ($C_{15}H_{12}O$, CID 11805918), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11805918> (data dostępu: 11.01.2026).
- [9] J. Xiao, Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (2017) 1874–1905. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400>.
- [10] D. Leonte, D. Ungureanu, V. Zaharia, Flavones and Related Compounds: Synthesis and Biological Activity, *Molecules* 28 (2023) 6528. <https://doi.org/10.3390/molecules28186528>.
- [11] W.B. Zhuang, Y.H. Li, X.C. Shu, Y.T. Pu, X.J. Wang, T. Wang, Z. Wang, The Classification, Molecular Structure and Biological Biosynthesis of Flavonoids, and Their Roles in Biotic and Abiotic Stresses, *Molecules* 28 (2023) 3599. <https://doi.org/10.3390/molecules28083599>.
- [12] K.M. Brodowska, Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues, *Eur. J. Biol. Res.* 7 (2017) 108–123. <https://doi.org/10.5281/zenodo.545778>.
- [13] P. Karak, Biological activities of flavonoids: an overview, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 10 (2019) 1567–1574. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).1567-74](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74).

- [14] N. Shen, T. Wang, Q. Gan, S. Liu, L. Wang, B. Jin, Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity, *Food Chem.* 383 (2022) 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>.
- [15] M. Zahra, H. Abrahamse, B.P. George, Flavonoids: Antioxidant Powerhouses and Their Role in Nanomedicine, *Antioxidants* 13 (2024) 922. <https://doi.org/10.3390/antiox13080922>.
- [16] X. Zheng, X. Zhang, F. Zeng, Biological Functions and Health Benefits of Flavonoids in Fruits and Vegetables: A Contemporary Review, *Foods* 14 (2025) 155. <https://doi.org/10.3390/foods14020155>.
- [17] A. Moazzen, N. Öztinen, E. Ak-Sakalli, M. Koşar, Structure-antiradical activity relationships of 25 natural antioxidant phenolic compounds from different classes, *Heliyon* 8 (2022) e10467. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10467>.
- [18] Y. Zeng, J. Song, M. Zhang, H. Wang, Y. Zhang, H. Suo, Comparison of in vitro and in vivo antioxidant activities of six flavonoids with similar structures, *Antioxidants* 9 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.3390/antiox9080732>.
- [19] K.Y. Rodríguez-Valdovinos, R. Salgado-Garciglia, M. Vázquez-Sánchez, D. Álvarez-Bernal, E. Oregel-Zamudio, L.F. Ceja-Torres, J.R. Medina-Medrano, Quantitative analysis of rutin by hptlc and in vitro antioxidant and antibacterial activities of phenolic-rich extracts from *verbescina sphaerocephala*, *Plants* 10 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants10030475>.
- [20] W. Wang, X. Zhang, Q. Liu, Y. Lin, Z. Zhang, S. Li, Study on Extraction and Antioxidant Activity of Flavonoids from *Hemerocallis fulva* (Daylily) Leaves, *Molecules* 27 (2022) 2916. <https://doi.org/10.3390/molecules27092916>.
- [21] J.M. Al-Khayri, G.R. Sahana, P. Nagella, B. V. Joseph, F.M. Alessa, M.Q. Al-Mssallem, Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review, *Molecules* 27 (2022) 2901. <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>.
- [22] H. Chávez, A.T. Alvarado, N. Tasayco-Yataco, M.P. Pérez, J.A. García, M.R. Bendezú, F. Surco-Laos, J.J. Palomino-Jhong, D. Laos-Anchante, E.J. Melgar-Merino, N. Vega-Ramos, C. Ferreyra-Paredes, P.E. Yarasca-Carlos, D.F. Calderón-Huamani, M. Bolarte-Arteaga, B. Loja-Herrera, Anti-inflammatory effect of the total flavonoid content of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Senna alata* (L.) Roxb. in an experimental model of acute inflammation, *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 13 (2025) 444–458. https://doi.org/10.56499/jppres24.2100_13.2.444.
- [23] M. Reyzov, D. Pavlov, M. Novakovic, V. Tesevic, A. Georgieva, M. Eftimov, M. Todorova, S. Valcheva-Kuzmanova, The flavonoid fustin exerts anti-inflammatory effect in a model of carrageenan-induced paw oedema, *Acta Aliment.* (2023) 155–162. <https://doi.org/10.1556/066.2022.00226>.
- [24] A.M. El-Feky, A.A. El-Rashedy, Anti-inflammatory and cytotoxic assessment of flavonoids isolated from *Viola odorata* flowers with computer-guided docking study, *Sci. Rep.* 15 (2025) 32602. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-19442-4>.

- [25] K.Y. Park, G.O. Jung, K.T. Lee, J. Choi, M.Y. Choi, G.T. Kim, H.J. Jung, H.J. Park, Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*, *J. Ethnopharmacol.* 90 (2004) 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.043>.
- [26] C.G. Park, H. Bin Lim, Evaluation of Antimutagenic and Antioxidant Properties in *Fomes fomentarius* L.: Potential Development as Functional Food, *Appl. Sci.* 14 (2024) 3927. <https://doi.org/10.3390/app14093927>.
- [27] A.K. Celik, N.C. Usta, Y. Baba, A. Cimen, A.U. Turker, Phenolic characterization, antimutagenic, antioxidant and antibacterial capacities of seven endemic *Dianthus* species from Turkey, *S. Afr. J. Bot.* 164 (2024) 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.11.032>.
- [28] M. Alcaraz, A. Olivares, D.G. Achel, J.A. García-gamuz, J. Castillo, M. Alcaraz-saura, Genoprotective effect of some flavonoids against genotoxic damage induced by x-rays in vivo: Relationship between structure and activity, *Antioxidants* 11 (2022) 94. <https://doi.org/10.3390/antiox11010094>.
- [29] M. Farhan, A. Rizvi, M. Aatif, A. Ahmad, Current Understanding of Flavonoids in Cancer Therapy and Prevention, *Metabolites* 13 (2023) 481. <https://doi.org/10.3390/metabo13040481>.
- [30] S.M. Wang, P.W. Yang, X.J. Feng, Y.W. Zhu, F.J. Qiu, X.D. Hu, S.H. Zhang, Apigenin Inhibits the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells by Affecting the Expression of microRNA Transcriptome, *Front. Oncol.* 11 (2021) 657665. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.657665>.
- [31] Z. Zhang, H. Wang, X. Liu, M. He, Y. Lin, Exploring the mechanism of Naringenin in the treatment of hepatocellular carcinoma based on mRNA sequencing and experimental validation, *Sci. Rep.* 15 (2025) 23109. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-09013-y>.
- [32] R. Wang, Z. Deng, Z. Zhu, J. Wang, X. Yang, M. Xu, X. Wang, Q. Tang, Q. Zhou, X. Wan, W. Wu, S. Wang, Kaempferol promotes non-small cell lung cancer cell autophagy via restricting Met pathway, *Phytomedicine* 121 (2023) 155090. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155090>.
- [33] A. Rugamba, D.Y. Kang, N. Sp, E.S. Jo, J.M. Lee, S.W. Bae, K.J. Jang, Silibinin regulates tumor progression and tumorsphere formation by suppressing PD-L1 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, *Cells* 10 (2021) 1632. <https://doi.org/10.3390/cells10071632>.
- [34] G. Varlı, F.A.B. Yıldırım, Ö. Albuz, N. Sağlam, M. Türk, Quercetin/curcumin suppresses pancreatic tumor growth and enhances chemosensitivity in a Capan-1 xenograft model, *BMC Cancer* 26 (2025) 155–168. <https://doi.org/10.1186/s12885-025-15477-y>.
- [35] C.H. Jang, N. Moon, J. Lee, M.J. Kwon, J. Oh, J.S. Kim, Luteolin Synergistically Enhances Antitumor Activity of Oxaliplatin in Colorectal Carcinoma via AMPK Inhibition, *Antioxidants* 11 (2022) 626. <https://doi.org/10.3390/antiox11040626>.

- [36] Y. Wang, J. Su, Z. Zhou, J. Yang, W. Liu, Y. Zhang, P. Zhang, T. Guo, G. Li, Baicalein Resensitizes Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens to Doxycycline, *Microbiol. Spectr.* 11 (2023) 1–18. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04702-22>.
- [37] H. Kim, D.G. Lee, Nitric oxide-inducing Genistein elicits apoptosis-like death via an intense SOS response in *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (2020) 10711–10724. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11003-1>.
- [38] F.M. Husain, K. Perveen, F.A. Qais, I. Ahmad, A.H. Alfarhan, M.A. El-Sheikh, Naringin inhibits the biofilms of metallo- β -lactamases (M β LS) producing *Pseudomonas species* isolated from camel meat, *Saudi J. Biol. Sci.* 28 (2021) 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.009>.
- [39] L. Wang, B.B. Li, X. Si, X. Liu, X. Deng, X. Niu, Y. Jin, D. Wang, J. Wang, Quercetin protects rats from catheter-related *Staphylococcus aureus* infections by inhibiting coagulase activity, *J. Cell. Mol. Med.* 23 (2019) 4808–4818. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14371>.
- [40] H. Woo Kim, H. Jun Woo, J. Yeong Yang, J.-B. Kim, S.-H. Kim, Factors and Growth of *Helicobacter pylori*, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 10035. <https://doi.org/10.3390/ijms221810035>.
- [41] N. Jubair, R. Mogana, A. Fatima, Y.K. Mahdi, N.H. Abdullah, Evaluation of Catechin Synergistic and Antibacterial Efficacy on Biofilm Formation and *acrA* Gene Expression of Uropathogenic *E. coli* Clinical Isolates, *Antibiotics* 11 (2022) 1223. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091223>.
- [42] V. Singh, A. Pal, M.P. Darokar, Glabridin synergy with norfloxacin induces ROS in multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 67 (2021) 269–272. <https://doi.org/10.2323/jgam.2021.06.002>.
- [43] B. Butun, G. Topcu, T. Ozturk, Recent Advances on 3-Hydroxyflavone Derivatives: Structures and Properties, *Mini Rev. Med. Chem.* 18 (2018). <https://doi.org/10.2174/1389557517666170425102827>.
- [44] PubChem, 3-hydroksyflawon (C₁₅H₁₀O₃, CID: 11349), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11349> (data dostępu: 05.02.2026).
- [45] M.A. Smith, R.M. Neumann, R.A. Webb, A modification of the Algar-Flynn-Oyamada Preparation of flavonoids, *J. Heterocycl. Chem.* 5 (1968) 425–426. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570050323>.
- [46] S. Gunduz, A.C. Goren, T. Ozturk, Facile syntheses of 3-hydroxyflavones, *Org. Lett.* 14 (2012) 1576–1579. <https://doi.org/10.1021/ol300310e>.
- [47] E. Kostrzewa-Susłow, J. Dmochowska-Gładysz, A. Białońska, Z. Ciunik, Microbial transformations of flavanone by *Aspergillus niger* and *Penicillium chermesinum* cultures, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 52–53 (2008) 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.01.002>.

- [48] A.J.G. Strandjord, P.F. Barbara, Proton-Transfer Kinetics of 3-Hydroxyflavone: Solvent Effects, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 2355–2361. <https://doi.org/10.1021/j100257a041>.
- [49] X. Zhao, X. Li, S. Liang, X. Dong, Z. Zhang, 3-Hydroxyflavone derivatives: promising scaffolds for fluorescent imaging in cells, *RSC Adv.* 11 (2021) 28851–28862. <https://doi.org/10.1039/d1ra04767a>.
- [50] L. Feng, Z.M. Liu, J. Hou, X. Lv, J. Ning, G.B. Ge, J.N. Cui, L. Yang, A highly selective fluorescent ESIPT probe for the detection of human carboxylesterase 2 and its biological applications, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.002>.
- [51] A.C. Sedgwick, W.T. Dou, J.B. Jiao, L. Wu, G.T. Williams, A.T.A. Jenkins, S.D. Bull, J.L. Sessler, X.P. He, T.D. James, An ESIPT Probe for the Ratiometric Imaging of Peroxynitrite Facilitated by Binding to A β -Aggregates, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 14267–14271. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08457>.
- [52] S. Sathish, G. Narayan, N. Rao, C. Janardhana, A self-organized ensemble of fluorescent 3-hydroxyflavone-Al (III) complex as sensor for fluoride and acetate ions, *J. Fluoresc.* 17 (2007) 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10895-006-0137-1>.
- [53] H. Gao, X. Wu, A 3-hydroxyflavone derivative as fluorescence chemosensor for copper and zinc ions, *Chem. Heterocycl. Compd. (N. Y.)* 54 (2018) 125–129. <https://doi.org/10.1007/s10593-018-2243-9>.
- [54] S.M.Z. AL-Kindy, K.H. Al-Hinai, F.E.O. Suliman, H.J. Al-Lawati, A. Pillay, Development of a selective fluorimetric technique for rapid trace determination of zinc using 3-hydroxyflavone, *Arab. J.Chem.* 4 (2011) 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.06.029>.
- [55] X. Li, J. Li, X. Dong, X. Gao, D. Zhang, C. Liu, A novel 3-Hydroxychromone fluorescence sensor for intracellular Zn²⁺ and its application in the recognition of prostate cancer cells, *Sens. Actuators B Chem.* 245 (2017) 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.170>.
- [56] X. Wang, L. Zhang, X. Yang, Q. Zhang, 3-Hydroxyflavone - bovine serum albumin complex used as fluorescent probe for the detection of pepsin, *Anal. Biochem.* 662 (2023) 115003. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.115003>.
- [57] C.Y. Fu, I.S. Lay, M.A. Shibu, Y.S. Tseng, W.W. Kuo, J.J. Yang, T.F. Wang, B.M. Bharath, Y.L. Yeh, C.Y. Huang, Selective activation of ZAK β expression by 3-hydroxy-2-phenylchromone inhibits human osteosarcoma cells and triggers apoptosis via JNK activation, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3366. <https://doi.org/10.3390/ijms21093366>.
- [58] Q. Lang, H. Zhang, J. Li, F. Xie, Y. Zhang, B. Wan, L. Yu, 3-Hydroxyflavone inhibits endogenous Aurora B and induces growth inhibition of cancer cell line, *Mol. Biol. Rep.* 37 (2010) 1577–1583. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9562-y>.

- [59] S.C. Shen, C.H. Ko, K.C. Hsu, Y.C. Chen, 3-OH flavone inhibition of epidermal growth factor-induced proliferation through blocking prostaglandin E2 production, *Int. J. Cancer* 108 (2004) 502–510. <https://doi.org/10.1002/ijc.11581>.
- [60] M. Pilátová, V. Stupáková, L. Varinská, M. Šarišský, L. Mirossay, A. Miroššay, P. Gál, V. Kraus, K. Dianišková, J. Mojžiš, Effect of selected flavones on cancer and endothelial cells, *Gen. Physiol. Biophys.* 29 (2010) 134–143. https://doi.org/10.4149/gpb_2010_02_134.
- [61] J.H. Kim, M. Song, G.H. Kang, E.R. Lee, H.Y. Choi, C. Lee, J.H. Kim, Y. Kim, B.N. Koo, S.G. Cho, Combined treatment of 3-hydroxyflavone and imatinib mesylate increases apoptotic cell death of imatinib mesylate-resistant leukemia cells, *Leuk. Res.* 36 (2012) 1157–1164. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.05.018>.
- [62] S.J. Uhm, M.K. Gupta, Z.C. Das, K.T. Lim, J.H. Yang, H.T. Lee, Effect of 3-hydroxyflavone on pig embryos produced by parthenogenesis or somatic cell nuclear transfer, *Reprod. Toxicol.* 31 (2011) 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.11.007>.
- [63] B. Sengupta, M. Sahihi, M. Dehkhodaei, D. Kelly, I. Arany, Differential roles of 3-Hydroxyflavone and 7-Hydroxyflavone against nicotine-induced oxidative stress in rat renal proximal tubule cells, *PLoS One* 12 (2017) 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179777>.
- [64] S. Biswas, N.D. Reddy, B.S. Jayashree, C.M. Rao, Evaluation of novel 3-hydroxyflavone analogues as HDAC inhibitors against colorectal cancer, *Adv. Pharmacol. Sci.* 2018 (2018) 4751806. <https://doi.org/10.1155/2018/4751806>.
- [65] M. Znati, C. Bordes, V. Forquet, P. Lantéri, H. Ben Jannet, J. Bouajila, Synthesis, molecular properties, anti-inflammatory and anticancer activities of novel 3-hydroxyflavone derivatives, *Bioorg. Chem.* 89 (2019) 103009. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103009>.
- [66] P.K. Walencik, R. Choińska, E. Gołębowska, M. Kalinowska, Metal–Flavonoid Interactions—From Simple Complexes to Advanced Systems, *Molecules* 29 (2024) 2573. <https://doi.org/10.3390/molecules29112573>.
- [67] M. Khater, D. Ravishankar, F. Greco, H.M.I. Osborn, Metal complexes of flavonoids: Their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities, *Future Med. Chem.* 11 (2019) 2845–2867. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0237>.
- [68] M. Samsonowicz, E. Regulska, M. Kalinowska, Hydroxyflavone metal complexes - molecular structure, antioxidant activity and biological effects, *Chem. Biol. Interact.* 273 (2017) 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.016>.
- [69] Z.T. Birgani, N. Gharraee, A. Malhotra, C.A. Van Blitterswijk, P. Habibovic, Combinatorial incorporation of fluoride and cobalt ions into calcium phosphates to stimulate osteogenesis and angiogenesis, *Biomed. Mater.* 11 (2016) 015020. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/015020>.

- [70] J. Grujicic, A.R. Allen, Manganese Superoxide Dismutase: Structure, Function, and Implications in Human Disease, *Antioxidants* 14 (2025) 848. <https://doi.org/10.3390/antiox14070848>.
- [71] M.I. Costa, A.B. Sarmiento-Ribeiro, A.C. Gonçalves, Zinc: From Biological Functions to Therapeutic Potential, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 4822. <https://doi.org/10.3390/ijms24054822>.
- [72] E. Halevas, B. Mavroidi, D. Varna, G. Zahariou, G. Litsardakis, M. Pelecanou, A.G. Hatzidimitriou, Structurally Characterized Cobalt and Nickel Complexes of Flavonoid Chrysin as Potential Radical Scavenging Compounds, *Inorganics (Basel)*. 13 (2025) 230. <https://doi.org/10.3390/inorganics13070230>.
- [73] H. Dong, X. Yang, J. He, S. Cai, K. Xiao, L. Zhu, Enhanced antioxidant activity, antibacterial activity and hypoglycemic effect of luteolin by complexation with manganese(II) and its inhibition kinetics on xanthine oxidase, *RSC Adv.* 7 (2017) 53385–53395. <https://doi.org/10.1039/c7ra11036g>.
- [74] Y. Xu, L.L. Qian, J. Yang, R.M. Han, J.P. Zhang, L.H. Skibsted, Kaempferol Binding to Zinc(II), Efficient Radical Scavenging through Increased Phenol Acidity, *J. Phys. Chem. B* 122 (2018) 10108–10117. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b08284>.
- [75] Y.H. Lee, P.T. Tuyet, Synthesis and biological evaluation of quercetin–zinc (II) complex for anti-cancer and anti-metastasis of human bladder cancer cells, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 55 (2019) 395–404. <https://doi.org/10.1007/s11626-019-00363-2>.
- [76] M. Nakamura, D. Urakawa, Z. He, I. Akagi, D.X. Hou, K. Sakao, Apoptosis Induction in HepG2 and HCT116 Cells by a Novel Quercetin-Zinc (II) Complex: Enhanced Absorption of Quercetin and Zinc (II), *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 17457. <https://doi.org/10.3390/ijms242417457>.
- [77] M.M. Dell’Anna, V. Censi, B. Carrozzini, R. Caliandro, N. Denora, M. Franco, D. Veclani, A. Melchior, M. Tolazzi, P. Mastroilli, Triphenylphosphane Pt(II) complexes containing biologically active natural polyphenols: Synthesis, crystal structure, molecular modeling and cytotoxic studies, *J. Inorg. Biochem.* 163 (2016) 346–361. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.08.006>.
- [78] A. Kurzwernhart, W. Kandioller, É.A. Enyedy, M. Novak, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, 3-Hydroxyflavones vs. 3-hydroxyquinolinones: Structure-activity relationships and stability studies on RuII(arene) anticancer complexes with biologically active ligands, *Dalton Transactions* 42 (2013) 6193–6202. <https://doi.org/10.1039/c2dt32206d>.
- [79] I. Mármol, P. Castellnou, R. Alvarez, M.C. Gimeno, M.J. Rodríguez-Yoldi, E. Cerrada, Alkynyl Gold(I) complexes derived from 3-hydroxyflavones as multi-targeted drugs against colon cancer, *Eur. J. Med. Chem.* 183 (2019) 111661. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111661>.
- [80] V.L. Gantsho, M. Dotou, M. Jakubaszek, B. Goud, G. Gasser, H.G. Visser, M. Schutte-Smith, Synthesis, characterization, kinetic investigation and biological

- evaluation of Re(I) di- And tricarbonyl complexes with tertiary phosphine ligands, *Dalton Transactions* 49 (2019) 35–46. <https://doi.org/10.1039/c9dt04025k>.
- [81] K.J. Burke, L.J. Stephens, M. V. Werrett, P.C. Andrews, Bismuth(III) Flavonolates: The Impact of Structural Diversity on Antibacterial Activity, *Mammalian Cell Viability and Cellular Uptake*, *Chem. Eur. J.* 26 (2020) 7657–7671. <https://doi.org/10.1002/chem.202000562>.
- [82] S.I. Pillai, S.P. Subramanian, M. Kandaswamy, Evaluation of antioxidant efficacy of vanadium-3-hydroxyflavone complex in streptozotocin-diabetic rats, *Chem. Biol. Interact.* 204 (2013) 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.04.012>.
- [83] É. Balogh-Hergovich, G. Speier, G. Argay, The Oxygenation of Flavonol by Copper(I) and Copper(II) Flavonolate Complexes. The Crystal and Molecular Structure of Bis(flavonolato)copper(II), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 55 (1991) 551–552. <https://doi.org/10.1039/C39910000551>.
- [84] É. Balogh-Hergovich, J. Kaizer, G. Speier, G. Argay, L. Párkányi, Kinetic studies on the copper(II)-mediated oxygenolysis of the flavonolate ligand, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1999) 3847–3854. <https://doi.org/10.1039/A905684J>.
- [85] Q.Q. Huang, A novel nickel complex with 3-Hydroxyflavone: Synthesis, Crystal Structure and reactivity towards O₂ of Ni₄(C₁₅O₃H₉)₄(CH₃O)₄(H₂O)₄, *Inorg. Chem. Commun.* 132 (2021) 108795. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108795>.
- [86] F.B.A. El Amrani, L. Perelló, J.A. Real, M. González-Alvarez, G. Alzuet, J. Borrás, S. García-Granda, J. Montejo-Bernardo, Oxidative DNA cleavage induced by an iron(III) flavonoid complex: Synthesis, crystal structure and characterization of chlorobis(flavonolato)(methanol) iron(III) complex, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1208–1218. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.036>.
- [87] M. Moravcová, Z. Lomozová, R. Kučera, P. Mladěnka, 3-Hydroxyflavone is a mildly active and safe cobalt chelator while cobalt markedly enhances baicalein toxicity toward erythrocytes, *RSC Adv.* 13 (2023) 29242–29251. <https://doi.org/10.1039/d3ra02735j>.
- [88] J.P. Cornard, L. Dangleterre, C. Lapouge, DFT and TD-DFT investigation and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Zn(II)-3-hydroxyflavone complex, *Chem. Phys. Lett.* 419 (2006) 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.11.101>.
- [89] C. Lapouge, L. Dangleterre, J.P. Cornard, Spectroscopic and theoretical studies of the Zn(II) chelation with hydroxyflavones, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 12494–12500. <https://doi.org/10.1021/jp064362q>.
- [90] T. Fesenko, I. Laguta, P. Kuzema, O.N. Stavinskaya, Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometric Analysis of Some Synthetic Flavonoids and Their Complexes with Zn and Fe, *Mater. Sci.* 16 (2010) 272–277.
- [91] C.H. Sarowar, G. Moran, G.D. Willett, A study of divalent metal cations Cu²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ attachment to 3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone and 5-methoxyflavone

- by nanoelectrospray ionization LTQ Orbitrap mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 333 (2013) 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2012.08.037>.
- [92] M. Michalík, M. Biela, D. Cagardová, V. Lukeš, Chelates of 3- and 5-hydroxyflavone: Quantum chemical study, *Chem. Phys. Lett.* 762 (2021) 138142. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2020.138142>.
- [93] L. Pavun, A. Janošević-Ležaić, S. Uskoković-Marković, Comparative spectrophotometric determination of 3-hydroxyflavone based on zinc and aluminium complexes and their antioxidative profiles, *Arh. Farm. (Belgr).* 74 (2024) 92–104. <https://doi.org/10.5937/arhfarm74-48637>.
- [94] K. Vijayaraghavan, S. Iyyam Pillai, S.P. Subramanian, Design, synthesis and characterization of zinc-3 hydroxy flavone, a novel zinc metallo complex for the treatment of experimental diabetes in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 680 (2012) 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.01.022>.
- [95] K. Newton, A. Strasser, N. Kayagaki, V.M. Dixit, Cell death, *Cell* 187 (2024) 235–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.044>.
- [96] L. V. Loftus, S.R. Amend, K.J. Pienta, Interplay between Cell Death and Cell Proliferation Reveals New Strategies for Cancer Therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23094723>.
- [97] L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E.S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D.W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E.H. Baehrecke, N.A. Barlev, N.G. Bazan, F. Bernassola, M.J.M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F.K.M. Chan, N.S. Chandel, E.H. Cheng, J.E. Chipuk, J.A. Cidlowski, A. Ciechanover, G.M. Cohen, M. Conrad, J.R. Cubillos-Ruiz, P.E. Czabotar, V. D'Angiolella, T.M. Dawson, V.L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K.M. Debatin, R.J. Deberardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V.M. Dixit, S.J. Dixon, C.S. Duckett, B.D. Dynlacht, W.S. El-Deiry, J.W. Elrod, G.M. Fimia, S. Fulda, A.J. García-Sáez, A.D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D.R. Green, L.A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J.M. Hardwick, I.S. Harris, M.O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jäättelä, B. Joseph, P.J. Jost, P.P. Juin, W.J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R.N. Kitsis, D.J. Klionsky, R.A. Knight, S. Kumar, S.W. Lee, J.J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S.A. Lipton, R.A. Lockshin, C. López-Otín, S.W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J.C. Marine, S.J. Martin, J.C. Martinou, J.P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E.A. Miao, J.D. Molkenkin, U.M. Moll, C. Muñoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nuñez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J.M. Penninger, D.M. Pereira, S. Pervaiz, M.E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J.H.M. Prehn, H. Puthalakath, G.A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C.M.P. Rodrigues, D.C. Rubinsztein, T. Rudel, K.M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H.U. Simon, A. Sistigu, B.R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S.W.G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M.G. Vander Heiden, A. Villunger, H.W. Virgin, K.H. Vousden, D. Vucic, E.F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J.A. Wells, W. Wood, J.

- Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino, G. Kroemer, Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018, *Cell Death Differ.* 25 (2018) 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- [98] M.S. Lotfi, F.B. Rassouli, Navigating the complexities of cell death: Insights into accidental and programmed cell death, *Tissue Cell* 91 (2024) 102586. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102586>.
- [99] J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26 (1972) 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
- [100] R. Jan, G. e. S. Chaudhry, Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics, *Adv. Pharm. Bull.* 9 (2019) 205–218. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.024>.
- [101] Y. Furuta, Z. Zhou, How do necrotic cells expose phosphatidylserine to attract their predators—What’s unique and what’s in common with apoptotic cells, *Front. Cell Dev. Biol.* 11 (2023) 1170551. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1170551>.
- [102] S. Kari, K. Subramanian, I.A. Altomonte, A. Murugesan, O. Yli-Harja, M. Kandhavelu, Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison, *Apoptosis* 27 (2022) 482–508. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01735-y>.
- [103] D.R. McIlwain, T. Berger, T.W. Mak, Caspase functions in cell death and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>.
- [104] E.K. Nadendla, R.E. Tweedell, G. Kasof, T.D. Kanneganti, Caspases: structural and molecular mechanisms and functions in cell death, innate immunity, and disease, *Cell Discov.* 11 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41421-025-00791-3>.
- [105] S.H. Dho, M. Cho, W. Woo, S. Jeong, L.K. Kim, Caspases as master regulators of programmed cell death: apoptosis, pyroptosis and beyond, *Exp. Mol. Med.* 57 (2025) 1121–1132. <https://doi.org/10.1038/s12276-025-01470-9>.
- [106] T.J. Sayers, Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy, *Cancer Immunol. Immunother.* 60 (2011) 1173–1180. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1008-4>.
- [107] J. Rodríguez-González, L. Gutiérrez-Kobeh, Apoptosis and its pathways as targets for intracellular pathogens to persist in cells, *Parasitol. Res.* 123 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08031-x>.
- [108] C.M. Pfeffer, A.T.K. Singh, Apoptosis: A target for anticancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>.
- [109] K. Sinha, J. Das, P.B. Pal, P.C. Sil, Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis, *Arch. Toxicol.* 87 (2013) 1157–1180. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4>.

- [110] T.T. Nguyen, S. Wei, T.H. Nguyen, Y. Jo, Y. Zhang, W. Park, K. Gariani, C.M. Oh, H.H. Kim, K.T. Ha, K.S. Park, R. Park, I.K. Lee, M. Shong, R.H. Houtkooper, D. Ryu, Mitochondria-associated programmed cell death as a therapeutic target for age-related disease, *Exp. Mol. Med.* 55 (2023) 1595–1619. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01046-5>.
- [111] S. Wang, S. Guo, J. Guo, Q. Du, C. Wu, Y. Wu, Y. Zhang, Cell death pathways: molecular mechanisms and therapeutic targets for cancer, *MedComm (Beijing)*. 5 (2024) e693. <https://doi.org/10.1002/mco2.693>.
- [112] Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim, Y. Baran, Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis, *Tumor Biology* 37 (2016) 8471–8486. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>.
- [113] S. Dehghan, N. Kheshtchin, S. Hassannezhad, M. Soleimani, Cell death classification: A new insight based on molecular mechanisms, *Exp. Cell Res.* 433 (2023) 113860. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113860>.
- [114] M.A.L. Escobar, O.M. Echeverría, G.H. Vázquez-Nin, Necrosis as Programmed Cell Death, w: Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis, InTech, 2015, <https://doi.org/10.5772/61483>.
- [115] O. Krysko, T.L. Aaes, V.E. Kagan, K. D’Herde, C. Bachert, L. Leybaert, P. Vandenabeele, D. V. Krysko, Necroptotic cell death in anti-cancer therapy, *Immunol. Rev.* 280 (2017) 207–219. <https://doi.org/10.1111/imr.12583>.
- [116] M. Sachet, Y.Y. Liang, R. Oehler, The immune response to secondary necrotic cells, *Apoptosis* 22 (2017) 1189–1204. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1413-z>.
- [117] M.T. Silva, Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program, *FEBS Lett.* 584 (2010) 4491–4499. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.046>.
- [118] Y.S. Cho, The role of necroptosis in the treatment of diseases, *BMB Rep.* 51 (2018) 219–224. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.5.074>.
- [119] R. Weinlich, A. Oberst, H.M. Beere, D.R. Green, Necroptosis in development, inflammation and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 127–136. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.149>.
- [120] X. Li, S. He, B. Ma, Autophagy and autophagy-related proteins in cancer, *Mol. Cancer* 19 (2020) 12–27. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1138-4>.
- [121] J. Debnath, N. Gammoh, K.M. Ryan, Autophagy and autophagy-related pathways in cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 24 (2023) 560–575. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00585-z>.
- [122] I. Soerjomataram, K. Shield, C. Marant-Micallef, J. Vignat, C. Hill, A. Rogel, G. Menvielle, L. Dossus, J.N. Ormsby, J. Rehm, L. Rushton, P. Vineis, M. Parkin, F. Bray, Cancers related to lifestyle and environmental factors in France in 2015, *Eur. J. Cancer* 105 (2018) 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.09.009>.

- [123] K.B. Tran, J.J. Lang, K. Compton, R. Xu, A.R. Acheson, H.J. Henrikson, J.M. Kocarnik, L. Penberthy, A. Aali, Q. Abbas, B. Abbasi, M. Abbasi-Kangevari, Z. Abbasi-Kangevari, H. Abbastabar, M. Abdelmasseh, S. Abd-Elsalam, A.A. Abdelwahab, G. Abdoli, H.A. Abdulkadir, A. Abedi, K.H. Abegaz, H. Abidi, R.G. Aboagye, H. Abolhassani, A. Absalan, Y.D. Abtey, H. Abubaker Ali, E. Abu-Gharbieh, B. Achappa, J.M. Acuna, D. Addison, I.Y. Addo, O.A. Adegboye, M.A. Adesina, M. Adnan, Q.E.S. Adnani, S.M. Advani, S. Afrin, M.S. Afzal, M. Aggarwal, B.O. Ahinkorah, A.R. Ahmad, R. Ahmad, S. Ahmad, S. Ahmad, S. Ahmadi, H. Ahmed, L.A. Ahmed, M.B. Ahmed, T. Ahmed Rashid, W. Aiman, M. Ajami, G.T. Akalu, M. Akbarzadeh-Khiavi, A. Aklilu, M. Akonde, C.J. Akunna, H. Al Hamad, F. Alahdab, F.M. Alanezi, T.M. Alanzi, S.A. Alessy, A.M. Algammal, M.K. Al-Hanawi, R.K. Alhassan, B.A. Ali, L. Ali, S.S. Ali, Y. Alimohamadi, V. Alipour, S.M. Aljunid, M. Alkhayyat, S.A.A. Al-Maweri, S. Almustanyir, N. Alonso, S. Alqalyoobi, R.M. Al-Raddadi, R.H.H. Al-Rifai, S.K. Al-Sabah, A.B. Al-Tammemi, H. Altawalah, N. Alvis-Guzman, F. Amare, E.K. Ameyaw, J.J. Aminian Dehkordi, M.H. Amirzade-Iranaq, H. Amu, G.A. Amusa, R. Ancuceanu, J.A. Anderson, Y.A. Animut, A. Anoushiravani, A.A. Anoushirvani, A. Ansari-Moghaddam, M.G. Ansha, B. Antony, M.H. Antwi, S.L. Anwar, R. Anwer, A.E. Anyasodor, J. Arabloo, M. Arab-Zozani, O. Aremu, A.M. Argaw, H. Ariffin, T. Aripov, M. Arshad, A. Artaman, J. Arulappan, R.T. Aruleba, A. Aryannejad, M. Asaad, M.A. Asemahagn, Z. Asemi, M. Asghari-Jafarabadi, T. Ashraf, R. Assadi, M. Athar, S.S. Athari, M.M.W. Atout, S. Attia, A. Aujayeb, M. Ausloos, L. Avila-Burgos, A.F. Awedew, M.A. Awoke, T. Awoke, B.P. Ayala Quintanilla, T.M. Ayana, S.S. Ayen, D. Azadi, S. Azadnajafabad, S. Azami-Aghdash, M.M. Azanaw, M. Azangou-Khyavy, A. Azari Jafari, H. Azizi, A.Y.Y. Azzam, A. Babajani, M. Badar, A.D. Badiye, N. Baghcheghi, N. Bagheri, S. Bagherieh, S. Bahadory, A.A. Baig, J.L. Baker, A. Bakhtiari, R.K. Bakshi, M. Banach, I. Banerjee, M. Bardhan, F. Barone-Adesi, F. Barra, A. Barrow, N.Z. Bashir, A. Bashiri, S. Basu, A.-M.M. Batiha, A. Begum, A.B. Bekele, A.S. Belay, M.A. Belete, U.I. Belgaumi, A.W. Bell, L. Belo, H. Benzian, A.Y. Berhie, A.N.C. Bermudez, E. Bernabe, A.S. Bhagavathula, N. Bhala, B.B. Bhandari, N. Bhardwaj, P. Bhardwaj, K. Bhattacharyya, V.S. Bhojaraja, S.S. Bhuyan, S. Bibi, A.H. Bilchut, B.S. Bintoro, A. Biondi, M.G.B. Birega, H.E. Birhan, T. Bjørge, O. Blyuss, B.B.A. Bodicha, S.R. Bolla, A. Bolor, C. Bosetti, D. Braithwaite, M. Brauer, H. Brenner, A.N. Briko, N.I. Briko, C.M. Buchanan, N.B. Bulamu, M.T. Bustamante-Teixeira, M.H. Butt, N.S. Butt, Z.A. Butt, F.L. Caetano dos Santos, L.A. Cámera, C. Cao, Y. Cao, G. Carreras, M. Carvalho, F. Cembranel, E. Cerin, P.A. Chakraborty, P. Charalampous, V.K. Chattu, O. Chimed-Ochir, J.L. Chirinos-Caceres, D.Y. Cho, W.C.S. Cho, D.J. Christopher, D.-T. Chu, I.S. Chukwu, A.J. Cohen, J. Conde, S. Cortés, V.M. Costa, N. Cruz-Martins, G.T. Culbreth, O. Dadras, F.T. Dagnaw, S.M.A. Dahlawi, X. Dai, L. Dandona, R. Dandona, P. Daneshpajouhnejad, A. Danielewicz, A.T.M. Dao, R. Darvishi Cheshmeh Soltani, A.M. Darwesh, S. Das, D.V. Davitoui, E. Davtalab Esmaeili, F.P. De la Hoz, S.A. Debela, A. Dehghan, B. Demisse, F.W. Demisse, E. Denova-Gutiérrez, A. Derakhshani, M. Derbew Molla, D. Dereje, K.S. Deribe, R. Desai, M.D. Desalegn, F.N. Dessalegn, S.A.A. Dessalegni, G. Dessie, A.A. Desta, S.M.R. Dewan, S.D. Dharmaratne, M. Dhimal, M. Dianatinasab, N. Diao, D. Diaz, L.E. Digesa, S.G. Dixit, S. Doaei, L.P. Doan, P.N. Doku, D. Dongarwar, W.M. dos Santos, T.R. Driscoll, H.L. Dsouza, O.C. Durojaiye, S. Edalati, F. Eghbalian, E. Ehsani-Chimeh, E. Eini, M. Ekholuenetale, T.C. Ekundayo, D.U. Ekwueme, M. El Tantawi, M.A. Elbahnasawy, I. Elbarazi, H. Elghazaly, M. Elhadi, W. El-Huneidi, M.H. Emamian, L. Engelbert Bain, D.B.

Enyew, R. Erkhembayar, T. Eshetu, B. Eshrati, S. Eskandarieh, J. Espinosa-Montero, F. Etaee, A. Etemadimanesh, T. Eyayu, I.J. Ezeonwumelu, S. Ezzikouri, A.F. Fagbamigbe, S. Fahimi, I.R. Fakhradiyev, E.J.A. Faraon, J. Fares, A. Farmany, U. Farooque, H. Farrokhpour, A.O. Fasanmi, A. Fatehizadeh, W. Fatima, H. Fattahi, G. Fekadu, B.E. Feleke, A.A. Ferrari, S. Ferrero, L. Ferro Desideri, I. Filip, F. Fischer, R. Foroumadi, M. Foroutan, T. Fukumoto, P.A. Gaal, M.M. Gad, M.A. Gadanya, A. Gaipov, N. Galehdar, S. Gallus, T. Garg, M. Gaspar Fonseca, Y.H. Gebremariam, T.G. Gebremeskel, M.A. Gebremichael, Y.F. Geda, Y.Y. Gela, B.N.B. Gemed, M. Getachew, M.E. Getachew, K. Ghaffari, M. Ghafourifard, S.-H. Ghamari, M. Ghasemi Nour, F. Ghassemi, A. Ghimire, N. Ghith, M. Gholamalizadeh, J. Gholizadeh Navashenaq, S. Ghozy, S.A. Gilani, P.S. Gill, T.G. Ginindza, A.T.T. Gizaw, J.C. Glasbey, J. Godos, A. Goel, M. Golechha, P. Goleij, D. Golinelli, M. Golitaleb, G. Gorini, B.N.G. Goulart, G. Grosso, H.A. Guadie, M.I.M. Gubari, T.W. Gudayu, M.R. Guerra, D.A. Gunawardane, B. Gupta, S. Gupta, V.B. Gupta, V.K. Gupta, M.K. Gurara, A. Guta, P. Habibzadeh, A. Haddadi Avval, N. Hafezi-Nejad, A. Hajj Ali, A. Haj-Mirzaian, E.S. Halboub, A. Halimi, R. Halwani, R.R. Hamadeh, S. Hameed, S. Hamidi, A. Hanif, S. Hariri, N.I. Harlianto, J.M. Haro, R.K. Hartono, A.I. Hasaballah, S.M.M. Hasan, H. Hasani, S.M. Hashemi, A.M. Hassan, S. Hassanipour, K. Hayat, G. Heidari, M. Heidari, Z. Heidarymeybodi, B.Y. Herrera-Serna, C. Herteliu, K. Hezam, Y. Hiraike, M.M. Hlongwa, R. Holla, M. Holm, N. Horita, M. Hoseini, M.M. Hossain, M.B.H. Hossain, M.-S. Hosseini, A. Hosseinzadeh, M. Hosseinzadeh, M. Hostiuc, S. Hostiuc, M. Househ, J. Huang, F.N. Hugo, A. Humayun, S. Hussain, N.R. Hussein, B.-F. Hwang, S.E. Ibitoye, P.M. Iftikhar, K.S. Ikuta, O.S. Ilesanmi, I.M. Ilic, M.D. Ilic, M. Immurana, K. Innos, P. Iranpour, L.M. Irham, M.S. Islam, R.M. Islam, F. Islami, N.E. Ismail, G. Isola, M. Iwagami, L.M. J, A. Jaiswal, M. Jakovljevic, M. Jalili, S. Jalilian, E. Jamshidi, S.-I. Jang, C.T. Jani, T. Javaheri, U.U. Jayarajah, S. Jayaram, S.B. Jazayeri, R. Jebai, B. Jemal, W. Jeong, R.P. Jha, H.A. Jindal, Y.O. John-Akinola, J.B. Jonas, T. Joo, N. Joseph, F. Joukar, J.J. Jozwiak, M. Jürisson, A. Kabir, S.E.O. Kacimi, V. Kadashetti, F. Kahe, P.V. Kakodkar, L.R. Kalankesh, L.R. Kalankesh, R. Kalhor, V.K. Kamal, F. Kamangar, A. Kamath, T. Kanchan, E. Kandaswamy, H. Kandel, H. Kang, G.G. Kanno, N. Kapoor, S.S. Kar, S.D. Karanth, I.M. Karaye, A. Karch, A. Karimi, B.G. Kassa, P.D. Katoto, J.H. Kauppila, H. Kaur, A.G. Kebede, L. Keikavoosi-Arani, G.G. Kejela, P.M. Kemp Bohan, M. Keramati, M. Keykhaei, H. Khajuria, A. Khan, A.A.K. Khan, E.A. Khan, G. Khan, M.N. Khan, M.A. Khan, J. Khanali, K. Khatib, M.M. Khatatbeh, M.N. Khatib, M. Khayamzadeh, H.R. Khayat Kashani, M.A. Khazeei Tabari, M. Khezeli, M. Khodadost, M.S. Kim, Y.J. Kim, A. Kisa, S. Kisa, M. Klugar, J. Klugarová, A.-A. Kolahi, P. Kolkhir, F. Kompani, P.A. Koul, S.L. Koulmane Laxminarayana, A. Koyanagi, K. Krishan, Y. Krishnamoorthy, B. Kucuk Bicer, N. Kugbey, M. Kulimbet, A. Kumar, G.A. Kumar, N. Kumar, O.P. Kurmi, A. Kuttikkattu, C. La Vecchia, A. Lahiri, D.K. Lal, J. Lám, Q. Lan, I. Landires, B. Larijani, S. Lasrado, J. Lau, P. Lauriola, C. Ledda, S. Lee, S.W.H. Lee, W.-C. Lee, Y.Y. Lee, Y.H. Lee, S.M. Legesse, J. Leigh, E. Leong, M.-C. Li, S.S. Lim, G. Liu, J. Liu, C.-H. Lo, A. Lohiya, P.D. Lopukhov, L. Lorenzovici, M. Lotfi, J.A. Loureiro, R. Lunevicius, F. Madadizadeh, A.R. Mafi, S. Magdeldin, S. Mahjoub, A. Mahmoodpoor, M. Mahmoudi, M. Mahmoudimanesh, R.A. Mahumud, A. Majeed, J. Majidpoor, A. Makki, K.C. Makris, E. Malakan Rad, M.-R. Malekpour, R. Malekzadeh, A.A. Malik, T.H. Mallhi, S.D. Mallya, M.A. Mamun, A.L. Manda, F. Mansour-Ghanaei, B. Mansouri, M.A. Mansournia, L.G. Mantovani, S. Martini, M. Martorell, S. Masoudi, S.Z. Masoumi, C.N. Matei, E. Mathews, M.R. Mathur, V.

Mathur, M. McKee, J.K. Meena, K. Mehmood, E. Mehrabi Nasab, R. Mehrotra, A. Melese, W. Mendoza, R.G. Menezes, Si.D. Mengesha, L.G. Mensah, A.-F.A. Mentis, A.Y.M. Mera-Mamián, T.J. Meretoja, M.W. Merid, A.G. Mersha, B.T. Meselu, M. Meshkat, T. Mestrovic, J. Miao Jonasson, T. Miazgowski, I.M. Michalek, G.F.W. Mijena, T.R. Miller, S.A. Mir, S.K. Mirinezhad, S. Mirmoeeni, M. Mirza-Aghazadeh-Attari, H. Mirzaei, H.R. Mirzaei, A.S. Misganaw, S. Misra, K.A. Mohammad, E. Mohammadi, M. Mohammadi, A. Mohammadian-Hafshejani, R. Mohammadpourhodki, A. Mohammed, S. Mohammed, S. Mohan, M. Mohseni, N. Moka, A.H. Mokdad, A. Molassiotis, M. Molokhia, K. Momenzadeh, S. Momtazmanesh, L. Monasta, U. Mons, A. Al Montasir, F. Montazeri, A. Montero, M.A. Moosavi, A. Moradi, Y. Moradi, M. Moradi Sarabi, P. Moraga, L. Morawska, S.D. Morrison, J. Morze, A. Mosapour, E. Mostafavi, S.M. Mousavi, H. Mousavi Isfahani, A. Mousavi Khaneghah, C. Mpundu-Kaambwa, S. Mubarik, F. Mulita, D. Munblit, S.B. Munro, E. Murillo-Zamora, J. Musa, A.F. Nabhan, A.J. Nagarajan, S.P. Nagaraju, G. Nagel, M. Naghipour, M.D. Naimzada, T.S. Nair, A.A. Naqvi, S. Narasimha Swamy, A.I. Narayana, H. Nassereldine, Z.S. Natto, B.P. Nayak, R. Ndejjo, S.O. Nduaguba, W.W. Negash, S.A. Nejadghaderi, K. Nejati, S. Neupane Kandel, H.V.N. Nguyen, R.K. Niazi, N.M. Noor, M. Noori, N. Noroozi, H. Nouraei, A. Nowroozi, V. Nuñez-Samudio, C.I. Nzoputam, O.J. Nzoputam, B. Oancea, O.O. Odukoya, O.B. Oghenetega, R.E. Ogunsakin, A.S. Oguntade, I.-H. Oh, H. Okati-Aliabad, A.P. Okekunle, A.T. Olagunju, T.O. Olagunju, B.O. Olakunde, I.I. Olufadewa, E. Omer, A.E.E. Omonisi, S. Ong, O.E. Onwujekwe, H. Orru, S.S. Otstavnov, A. Oulhaj, B. Oumer, O.F. Owopetu, B.E. Oyinloye, M. P A, A. Padron-Monedero, J.R. Padubidri, B. Pakbin, K. Pakshir, R. Pakzad, T. Palicz, A. Pana, A. Pandey, A. Pandey, S. Pant, S. Pardhan, E.-C. Park, E.-K. Park, S. Park, J. Patel, S. Pati, R. Paudel, U. Paudel, M. Paun, H. Pazoki Toroudi, M. Peng, J. Pereira, R.B. Pereira, S. Perna, N. Perumalsamy, R.G. Pestell, R. Pezzani, C. Piccinelli, J.D. Pillay, Z.Z. Piracha, T. Pischon, M.J. Postma, A. Pourabhari Langroudi, A. Pourshams, N. Pourtaheri, A. Prashant, M.M.F. Qadir, Z. Quazi Syed, M. Rabiee, N. Rabiee, A. Radfar, R.A. Radhakrishnan, V. Radhakrishnan, M. Raeisi, A. Rafiee, A. Rafiei, N. Raheem, F. Rahim, M.O. Rahman, M. Rahman, M.A. Rahman, A.M. Rahmani, S. Rahmani, V. Rahmanian, N. Rajai, A. Rajesh, P. Ram, K. Ramezanzadeh, J. Rana, K. Ranabhat, P. Ranasinghe, C.R. Rao, S.J. Rao, S. Rashedi, A. Rashidi, M. Rashidi, M.-M. Rashidi, Z.A. Ratan, D.L. Rawaf, S. Rawaf, L. Rawal, R. Rawassizadeh, M.S. Razeghinia, A.U. Rehman, I. ur Rehman, M.B. Reitsma, A.M.N. Renzaho, M. Rezaei, N. Rezaei, N. Rezaei, N. Rezaei, S. Rezaei, M. Rezaeian, A. Rezapour, A. Riad, R. Rikhtegar, M. Rios-Blancas, T.J. Roberts, P. Rohloff, E. Romero-Rodríguez, G. Roshandel, G.M. Rwegerera, M. S, M.M. Saber-Ayad, B. Saberzadeh-Ardestani, S. Sabour, B. Saddik, E. Sadeghi, M.R. Saeb, U. Saeed, M. Safaei, A. Safary, M. Sahebazamani, A. Sahebkar, H. Sahoo, M.R. Sajid, H. Salari, S. Salehi, M.R. Salem, H. Salimzadeh, Y.L. Samodra, A.M. Samy, J. Sanabria, S. Sankararaman, F. Sanmarchi, M.M. Santric-Milicevic, M.A.N. Saqib, A. Sarvezad, F. Sarvi, B. Sathian, M. Satpathy, N. Sayegh, I.J.C. Schneider, M. Schwarzingler, M. Šekerija, S. Senthilkumaran, S.G. Sepanlou, A. Seylani, K. Seyoum, F. Sha, O. Shafaat, P.A. Shah, S. Shahabi, I. Shahid, M.A. Shahrbaaf, H.R. Shahsavari, M.A. Shaikh, M.F. Shaka, E. Shaker, M. Shannawaz, M.M.S. Sharew, A. Sharifi, J. Sharifi-Rad, P. Sharma, B.B. Shashamo, A. Sheikh, M. Sheikh, S. Sheikhbaheai, R.A. Sheikhi, A. Sheikhy, P.R. Shepherd, A. Shetty, J.K. Shetty, R.S. Shetty, K. Shibuya, R. Shirkoohi, H. Shirzad-Aski, K.M. Shivakumar, S. Shivalli, V. Shivarov, P. Shobeiri, Z. Shokri Varniab, S.A. Shorofi, S. Shrestha, M.M. Sibhat, S.K. Siddappa Malleshappa, N.B.

Sidemo, D.A.S. Silva, L.M.L.R. Silva, G. Silva Julian, N. Silvestris, W. Simegn, A.D. Singh, A. Singh, G. Singh, H. Singh, J.A. Singh, J.K. Singh, P. Singh, S. Singh, D.N. Sinha, A.H. Sinke, M.S. Siraj, F. Sitas, S.S. Siwal, V.Y. Skryabin, A.A. Skryabina, B. Socea, M.J. Soeberg, A. Sofi-Mahmudi, Y. Solomon, M.S. Soltani-Zangbar, S. Song, Y. Song, R.J.D. Sorensen, S. Soshnikov, H. Sotoudeh, A. Sowe, M.B. Sufiyan, R. Suk, M. Suleman, R. Suliankatchi Abdulkader, S. Sultana, D. Sur, M. Szócska, S.P. Tabaeian, R. Tabarés-Seisdedos, S.M. Tabatabaei, T. Tabuchi, H. Tadbiri, E. Taheri, M. Taheri, M. Taheri Soodejani, K. Takahashi, I.M. Talaat, M. Tampa, K.-K. Tan, N.Y. Tat, V.Y. Tat, A. Tavakoli, A. Tavakoli, A. Tehrani-Banihashemi, Y. Tekalegn, F.H. Tesfay, R. Thapar, A. Thavamani, V. Thoguluva Chandrasekar, N. Thomas, N.K. Thomas, J.H.V. Ticoalu, A. Tiyyuri, D.N. Tollosa, R. Topor-Madry, M. Touvier, M.R. Tovani-Palone, E. Traini, M.T.N. Tran, J.P. Tripathy, G.G. Ukke, I. Ullah, S. Ullah, S. Ullah, B. Unnikrishnan, M. Vacante, M. Vaezi, S. Valadan Tahbaz, P.R. Valdez, C. Vardavas, S.B. Varthya, S. Vaziri, D.Z. Velazquez, M. Veroux, P.J. Villeneuve, F.S. Violante, S.K. Vladimirov, V. Vlassov, B. Vo, L.G. Vu, A.W. Wadood, Y. Waheed, M.T. Walde, R.G. Wamai, C. Wang, F. Wang, N. Wang, Y. Wang, P. Ward, A. Waris, R. Westerman, N.D. Wickramasinghe, M. Woldemariam, B. Woldu, H. Xiao, S. Xu, X. Xu, L. Yadav, S.H. Yahyazadeh Jabbari, L. Yang, F. Yazdanpanah, Y. Yeshaw, Y. Yismaw, N. Yonemoto, M.Z. Younis, Z. Yousefi, F. Yousefian, C. Yu, Y. Yu, I. Yunusa, M. Zahir, N. Zaki, B.A. Zaman, M. Zangiabadian, F. Zare, I. Zare, Z. Zareshahrabadi, A. Zarrantan, M.S. Zastrozhin, M.A. Zeineddine, D. Zhang, J. Zhang, Y. Zhang, Z.-J. Zhang, L. Zhou, S. Zodpey, M. Zoladl, T. Vos, S.I. Hay, L.M. Force, C.J.L. Murray, The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *The Lancet* 400 (2022) 563–591. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01438-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01438-6).

- [124] F. Bray, M. Laversanne, H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, I. Soerjomataram, A. Jemal, Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 74 (2024) 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
- [125] S. Sarkar, G. Horn, K. Moulton, A. Oza, S. Byler, S. Kokolus, M. Longacre, Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 21087–21113. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>.
- [126] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre, *Cell* 100 (2000) 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- [127] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [128] D. Hanahan, Hallmarks of Cancer: New Dimensions, *Cancer Discov.* 12 (2022) 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- [129] M. Tufail, J.J. Hu, J. Liang, C.Y. He, W.D. Wan, Y.Q. Huang, C.H. Jiang, H. Wu, N. Li, Hallmarks of cancer resistance, *IScience* 27 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109979>.

- [130] P.B. Tchounwou, S. Dasari, F.K. Noubissi, P. Ray, S. Kumar, Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy, *J. Exp. Pharmacol.* 13 (2021) 303–328. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267383>.
- [131] P. Dasgupta, P.D. Baade, J.F. Aitken, N. Ralph, S.K. Chambers, J. Dunn, Geographical variations in prostate cancer outcomes: A systematic review of international evidence, *Front. Oncol.* 9 (2019). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00238>.
- [132] M.B.B. Culp, I. Soerjomataram, J.A. Efstathiou, F. Bray, A. Jemal, Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates, *Eur. Urol.* 77 (2020) 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.005>.
- [133] J.A. Didkowska, U. Wojciechowska, K. Barańska, M. Miklewska, I. Michałek, P. Olasek, Nowotwory złośliwe w Polsce w 2021 roku, Narodowy Instytut Onkologii, Warszawa, 2023, ISSN 0867-8251.
- [134] P. Rawla, Epidemiology of Prostate Cancer, *World J. Oncol.* 10 (2019) 63–89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>.
- [135] A. Mansinho, D. Macedo, I. Fernandes, L. Costa, Castration-Resistant Prostate Cancer: Mechanisms, Targets and Treatment, w: *Molecular & Diagnostic Imaging in Prostate Cancer*, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99286-0>.
- [136] M.S. Litwin, H.J. Tan, The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review, *JAMA - Journal of the American Medical Association* 317 (2017) 2532–2542. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>.
- [137] K.J. Pienta, Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer, *Semin. Oncol.* 28 (2001) 3–7. <https://doi.org/10.1053/sonc.2001.26892>.
- [138] K.R. Stone, D.D. Mickey, H. Wunderli, G.H. Mickey, D.F. Paulson, Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145), *Int. J. Cancer* 21 (1978) 274–281. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910210305>.
- [139] ATCC, DU 145 (HTB-81™) Product Sheet, American Type Culture Collection, 2024. www.atcc.org.
- [140] Cellosaurus, DU145 (CVCL_0105), https://www.cellosaurus.org/CVCL_0105 (data dostępu: 22.02.2026).
- [141] F. Alimirah, J. Chen, Z. Basrawala, H. Xin, D. Choubey, DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation, *FEBS Lett.* 580 (2006) 2294–2300. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.041>.
- [142] A.G. Carroll, H. James Voeller, L. Sugars, E.P. Gelmann, p53 Oncogene Mutations in Three Human Prostate Cancer Cell Lines, *Prostate* 23 (1993) 123–134. <https://doi.org/10.1002/pros.2990230206>.

- [143] B. Paule, S. Terry, L. Kheuang, P. Soyeux, F. Vacherot, A. de Taille, The NF- κ B/IL-6 pathway in metastatic androgen-independent prostate cancer: New therapeutic approaches?, *World J. Urol.* 25 (2007) 477–489. <https://doi.org/10.1007/s00345-007-0175-6>.
- [144] C.L. Armstrong, R. Galisteo, S.A.N. Brown, J.A. Winkles, TWEAK activation of the non-canonical NF- κ B signaling pathway differentially regulates melanoma and prostate cancer cell invasion, *Oncotarget* 7 (2016) 81474–81492. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13034>.
- [145] B.Y. Shorning, M.S. Dass, M.J. Smalley, H.B. Pearson, The PI3K-AKT-mTOR pathway and prostate cancer: At the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–47. <https://doi.org/10.3390/ijms21124507>.
- [146] B.A. Carneiro, W.S. El-Deiry, Targeting apoptosis in cancer therapy, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17 (2020) 395–417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.
- [147] B. Kumar, S. Koul, L. Khandrika, R.B. Meacham, H.K. Koul, Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype, *Cancer Res.* 68 (2008) 1777–1785. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5259>.
- [148] P. Sutkowy, P. Czeleń, Redox Balance in Cancer in the Context of Tumor Prevention and Treatment, *Biomedicines* 13 (2025). <https://doi.org/10.3390/biomedicines13051149>.
- [149] D. Bello, M.M. Webber, H.K. Kleinman, D.D. Wartinger, J.S. Rhim, Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18 useful cell culture models for studies on prostate growth regulation and carcinogenesis, *Carcinogenesis* 18 (1997) 1215–1223. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.6.1215>.
- [150] ATCC, RWPE-2 (CRL-3608TM) Product Sheet, American Type Culture Collection, 2024. www.atcc.org.
- [151] Cellosaurus, RWPE-2 (CVCL_3792). https://www.cellosaurus.org/CVCL_3792 (data dostępu: 22.02.2026).
- [152] M.M. Webber, D. Bello, S. Quader, Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: Characteristics and applications part 2. Tumorigenic cell lines, *Prostate* 30 (1997) 58–64. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(19970101\)30:1<58::AID-PROS9>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19970101)30:1<58::AID-PROS9>3.0.CO;2-H).
- [153] A.A. Naeem, S.A. Abdulsamad, A. Al Bayati, J. Zhang, M.I. Malki, H. Ma, Y. Ke, Prostate Cell Lines, (2022). <https://doi.org/10.32474/OAJOM.2021.05.000208>.
- [154] ATCC, BJ (CRL-2522TM) Product Sheet, American Type Culture Collection, 2024. www.atcc.org.
- [155] Cellosaurus, BJ (CVCL_3653). https://www.cellosaurus.org/CVCL_3653 (data dostępu: 22.02.2026).

- [156] M. V. Plikus, X. Wang, S. Sinha, E. Forte, S.M. Thompson, E.L. Herzog, R.R. Driskell, N. Rosenthal, J. Biernaskie, V. Horsley, Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease, *Cell* 184 (2021) 3852–3872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>.
- [157] M. Lorenz, G. Saretzki, N. Sitte, S. Metzkwow, T. Von Zglinicki, BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of the hTERT transfection, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 824–831. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00664-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00664-5).
- [158] W.C. Hahn, C.M. Counter, A.S. Lundberg, R.L. Beijersbergen, M.W. Brooks, R.A. Weinberg, Creation of human tumour cells with different genetic elements, *Nature* 400 (1999). <https://doi.org/10.1038/22780>.
- [159] A.G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, S.E. Holt, C.-P. Chiu, G.B. Morin, C.B. Harley, J.W. Shay, S. Lichtsteiner, W.E. Wright, Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells, *Science* (1979). 279 (1998) 349–352. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>.
- [160] N. Sitte, K. Merker, T. von Zglinick, K.J.A. Davies, T. Grune, Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II—aging of nondividing cells, *The FASEB Journal* 14 (2000) 2503–2510. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0210com>.
- [161] J.P. de Magalhães, F. Chainiaux, J. Remacle, O. Toussaint, Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts, *FEBS Lett.* 523 (2002) 157–162. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02973-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02973-3).
- [162] J. Broniarczyk, N. Ring, P. Massimi, M. Giacca, L. Banks, HPV-16 virions can remain infectious for 2 weeks on senescent cells but require cell cycle re-activation to allow virus entry, *Sci. Rep.* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18809-6>.
- [163] G. Campadelli-Fiume, M. Arsenakis, F. Farabegoli, A.B. Roizman², Entry of Herpes Simplex Virus 1 in BJ Cells That Constitutively Express Viral Glycoprotein D Is by Endocytosis and Results in Degradation of the Virus, *J. Virol.* 62 (1988) 159–167. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.1.159-167.1988>.
- [164] Y. Mikawa, M.T. Alam, E. Hossain, A. Yanagawa-Matsuda, T. Kitamura, M. Yasuda, U. Habiba, I. Ahmed, Y. Kitagawa, M. Shindoh, F. Higashino, Conditionally replicative adenovirus controlled by the stabilization system of AU-rich elements containing mRNA, *Cancers (Basel)*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12051205>.
- [165] J. Fogh, J.M. Fogh, T. Orfeo, One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice 1.2.3, *J. Natl. Cancer Inst.* 59 (1977) 221–226. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.1.221>.
- [166] ATCC, Caco-2 (HTB-37™) Product Sheet, American Type Culture Collection, 2025. www.atcc.org.
- [167] Cellosaurus, Caco-2 (CVCL_0025). https://www.cellosaurus.org/CVCL_0025 (data dostępu: 22.02.2026).

- [168] I.J. Hidalgo, T.J. Raub, R.T. Borchardt, Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology* 96 (1989) 736–749. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)90897-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)90897-4).
- [169] X. Ding, X. Hu, Y. Chen, J. Xie, M. Ying, Y. Wang, Q. Yu, Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends, *Trends Food Sci. Technol.* 107 (2021) 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.015>.
- [170] M. Kus, I. Ibragimow, H. Piotrowska-Kempisty, Caco-2 Cell Line Standardization with Pharmaceutical Requirements and In Vitro Model Suitability for Permeability Assays, *Pharmaceutics* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112523>.
- [171] ICH M9 on biopharmaceutics classification system based biowaivers - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-scientific-guideline> (data dostępu: 22.02.2026).
- [172] M9 Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers | FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers> (data dostępu: 22.02.2026).
- [173] P. Boukamp, R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N.E. Fusenig, Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line, *J. Cell Biol.* 106 (1988) 761–771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>.
- [174] Cytion, HaCat (nr kat. 300493), Product Sheet, CLS Cell Line Service GmbH, 2024. www.cytion.com.
- [175] Cellosaurus, HaCaT (CVCL_0038). https://www.cellosaurus.org/CVCL_0038 (data dostępu: 22.02.2026).
- [176] T.A. Lehman, R. Modali, P. Boukamp, J. Stanek, W.P. Bennett, J.A. Welsh, R.A. Metcalf, M.R. Stampfer, N. Fusenig, E.M. Rogan, C.C. Harris, p53 Mutations in human immortalized epithelial cell lines, *Carcinogenesis* 14 (1993) 833–839. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.5.833>.
- [177] D.D. Romashin, A.L. Rusanov, P.M. Kozhin, M.N. Karagyaur, O. V. Tikhonova, V.G. Zgoda, N.G. Luzgina, Impact of p53 knockdown on protein dataset of HaCaT cells, *Data Brief* 42 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108274>.
- [178] O. Pleguezuelos, S. Kapas, Differentiation of the HaCaT keratinocyte cell line: Modulation by adrenomedullin, *Br. J. Dermatol.* 154 (2006) 602–608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.07117.x>.
- [179] G. Blanchard, C. Pich, D. Hohl, HaCaT cells as a model system to study primary cilia in keratinocytes, *Exp. Dermatol.* 31 (2022) 1276–1280. <https://doi.org/10.1111/exd.14626>.

- [180] I. Colombo, E. Sangiovanni, R. Maggio, C. Mattozzi, S. Zava, Y. Corbett, M. Fumagalli, C. Carlino, P.A. Corsetto, D. Scaccabarozzi, S. Calvieri, A. Gismondi, D. Taramelli, M. Dell'Agli, HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes, *Mediators Inflamm.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/7435621>.
- [181] S.A. Adu, M.S. Twigg, P.J. Naughton, R. Marchant, I.M. Banat, Characterisation of cytotoxicity and immunomodulatory effects of glycolipid biosurfactants on human keratinocytes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 107 (2023) 137–152. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12302-5>.
- [182] V. Ölschläger, A. Schrader, S. Hockertz, Comparison of Primary Human Fibroblasts and Keratinocytes with Immortalized Cell Lines Regarding their Sensitivity to Sodium Dodecyl Sulfate in a Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay, *Arzneimittelforschung* 59 (2009) 146–152. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296378>.
- [183] F. Piras, V. Sogos, F. Pollastro, G. Appendino, A. Rosa, Arzanol, a natural phloroglucinol α -pyrone, protects HaCaT keratinocytes against H₂O₂-induced oxidative stress, counteracting cytotoxicity, reactive oxygen species generation, apoptosis, and mitochondrial depolarization, *J. Appl. Toxicol.* 44 (2024) 720–732. <https://doi.org/10.1002/jat.4570>.
- [184] B. Lehmann, HaCaT Cell Line as a Model System for Vitamin D₃ Metabolism in Human Skin, *J. Invest. Dermatol* 108 (1997) 78–82. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12285640>.
- [185] K. Kehe, M. Abend, K. Kehe, R. Ridi, Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line, *Arch. Dermatol. Res.* 291 (1999) 600–605. <https://doi.org/10.1007/s004030050461>.
- [186] E. Pavez Lorie, N. Stricker, B. Plitta-Michalak, I.P. Chen, B. Volkmer, R. Greinert, A. Jauch, P. Boukamp, A. Rapp, Characterisation of the novel spontaneously immortalized and invasively growing human skin keratinocyte line HaSKpw, *Sci. Rep.* 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71315-0>.
- [187] I.N. Okeke, M.E.A. de Kraker, T.P. Van Boeckel, C.K. Kumar, H. Schmitt, A.C. Gales, S. Bertagnolio, M. Sharland, R. Laxminarayan, The scope of the antimicrobial resistance challenge, *The Lancet* 403 (2024) 2426–2438. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00876-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00876-6).
- [188] C.J. Murray, K.S. Ikuta, F. Sharara, L. Swetschinski, G. Robles Aguilar, A. Gray, C. Han, C. Bisignano, P. Rao, E. Wool, S.C. Johnson, A.J. Browne, M.G. Chipeta, F. Fell, S. Hackett, G. Haines-Woodhouse, B.H. Kashef Hamadani, E.A.P. Kumaran, B. McManigal, R. Agarwal, S. Akech, S. Albertson, J. Amuasi, J. Andrews, A. Aravkin, E. Ashley, F. Bailey, S. Baker, B. Basnyat, A. Bekker, R. Bender, A. Bethou, J. Bielicki, S. Boonkasidecha, J. Bukosia, C. Carvalheiro, C. Castañeda-Orjuela, V. Chansamouth, S. Chaurasia, S. Chiurchiù, F. Chowdhury, A.J. Cook, B. Cooper, T.R. Cressey, E. Criollo-Mora, M. Cunningham, S. Darboe, N.P.J. Day, M. De Luca, K. Dokova, A. Dramowski, S.J. Dunachie, T. Eckmanns, D. Eibach, A. Emami, N. Feasey, N. Fisher-Pearson, K. Forrest, D. Garrett, P. Gastmeier, A.Z. Giref, R.C. Greer, V. Gupta, S. Haller, A. Haselbeck, S.I. Hay, M. Holm, S. Hopkins, K.C. Iregbu,

- J. Jacobs, D. Jarovsky, F. Javanmardi, M. Khorana, N. Kissoon, E. Kobeissi, T. Kostyaney, F. Krapp, R. Krumkamp, A. Kumar, H.H. Kyu, C. Lim, D. Limmathurotsakul, M.J. Loftus, M. Lunn, J. Ma, N. Mturi, T. Munera-Huertas, P. Musicha, M.M. Mussi-Pinhata, T. Nakamura, R. Nanavati, S. Nangia, P. Newton, C. Ngoun, A. Novotney, D. Nwakanma, C.W. Obiero, A. Olivas-Martinez, P. Olliaro, E. Ooko, E. Ortiz-Brizuela, A.Y. Peleg, C. Perrone, N. Plakkal, A. Ponce-de-Leon, M. Raad, T. Ramdin, A. Riddell, T. Roberts, J.V. Robotham, A. Roca, K.E. Rudd, N. Russell, J. Schnall, J.A.G. Scott, M. Shivamallappa, J. Sifuentes-Osornio, N. Steenkeste, A.J. Stewardson, T. Stoeva, N. Tasak, A. Thaiprakong, G. Thwaites, C. Turner, P. Turner, H.R. van Doorn, S. Velaphi, A. Vongpradith, H. Vu, T. Walsh, S. Waner, T. Wangrangsimakul, T. Wozniak, P. Zheng, B. Sartorius, A.D. Lopez, A. Stergachis, C. Moore, C. Dolecek, M. Naghavi, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *The Lancet* 399 (2022) 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- [189] C.S. Ho, C.T.H. Wong, T.T. Aung, R. Lakshminarayanan, J.S. Mehta, S. Rauz, A. McNally, B. Kintsjes, S.J. Peacock, C. de la Fuente-Nunez, R.E.W. Hancock, D.S.J. Ting, Antimicrobial resistance: a concise update, *Lancet Microbe* 6 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.07.010>.
- [190] B.J. Langford, M. So, M. Simeonova, V. Leung, J. Lo, T. Kan, S. Raybardhan, M.E. Sapin, K. Mponponsoo, A. Farrell, E. Leung, J.P.R. Soucy, A. Cassini, D. MacFadden, N. Daneman, S. Bertagnolio, Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Microbe* 4 (2023) e179–e191. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00355-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00355-X).
- [191] M. Oliveira, W. Antunes, S. Mota, Á. Madureira-Carvalho, R.J. Dinis-Oliveira, D. Dias da Silva, An Overview of the Recent Advances in Antimicrobial Resistance, *Microorganisms* 12 (2024). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091920>.
- [192] R. Urban-Chmiel, A. Marek, D. Stępień-Pyśniak, K. Wieczorek, M. Dec, A. Nowaczek, J. Osek, Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review, *Antibiotics* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>.
- [193] F.L. Holmes, Elementary Analysis ant the Origins of Physiological Chemistry, *ISIS* 54 (1963) 50–81. <https://doi.org/10.1086/349664>.
- [194] D.C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, 2007, ISBN 0-7167-7041-5.
- [195] D. Harvey, Modern Analytical Chemistry, McGraw-Hill, New York, 2000, ISBN 0-07-237547-7.
- [196] M.E. Brown, Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001, ISBN 0-7923-4259-4.
- [197] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, Introduction to Spectroscopy, Brooks/Cole (Thomson Learning), Belmont, 2001, ISBN 0-03-031961-7.
- [198] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer, New York, 2006, ISBN 978-0-387-31278-1.

- [199] B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2004, ISBN 0-470-85427-8.
- [200] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007, ISBN 978-0-470-03310-4.
- [201] R. Kaufmann, Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology, *J. Biotechnol.* 41 (1995) 155–175. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00009-F](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00009-F).
- [202] J. Nizioł, W. Rode, B. Laskowska, T. Ruman, Novel monoisotopic ¹⁰⁹AgNPET for laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 1926–1931. <https://doi.org/10.1021/ac303770y>.
- [203] C.C. Hu, M.F. Huang, H.T. Chang, Quantitative surface-assisted laser desorption/ionization-MS approaches for bioanalysis, *Bioanalysis* 5 (2013) 633–635. <https://doi.org/10.4155/bio.13.4>.
- [204] S.B. Kedare, R.P. Singh, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *J. Food Sci. Technol.* 48 (2011) 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.
- [205] M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 181 (1958) 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- [206] R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- [207] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [208] N.G. Heatley, A Method for the Assay of Penicillin, *Biochem. J.* 38 (1943) 61–65. <https://doi.org/10.1042/bj0380061>.
- [209] CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*, CLSI document M07-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2012.
- [210] A. Ishak, N. Mazonakis, N. Spernovasilis, K. Akinosoglou, C. Tsioutis, Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice, *J. Antimicrob. Chemother.* 80 (2025) 1–17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae380>.
- [211] E. Borenfreund, J.A. Puerner, A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays, *J. Tissue Cult. Methods* 9 (1985) 7–9. <https://doi.org/10.1007/BF01666038>.

- [212] T.M. Tsubone, W.K. Martins, C. Pavani, H.C. Junqueira, R. Itri, M.S. Baptista, Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage, *Sci. Rep.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06788-7>.
- [213] Ö.S. Aslantürk, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, in: *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, InTech, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
- [214] M. V. Berridge, P.M. Herst, A.S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, *Biotechnol. Annu. Rev.* 11 (2005) 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7).
- [215] E. Woźnicka, A. Miłoś, L. Zapała, M. Kosińska-Pezda, E. Ciszkowicz, Ł. Byczyński, Synthesis, spectroscopic, and photophysical studies of Mn(II), Co(II), and Zn(II) complexes with 3-hydroxyflavone: Insights into anticancer activity against prostate cancer cells, *J. Inorg. Biochem.* 274 (2026) 113084. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2025.113084>.
- [216] G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>.
- [217] G. Ates, T. Vanhaecke, V. Rogiers, R.M. Rodrigues, Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay, in: *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2017: pp. 19–26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2.
- [218] E. Borenfreund, J.A. Puerner, Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicol. Lett.* 24 (1985) 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3).
- [219] J.L. Sebaugh, Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation, *Pharm. Stat.* 10 (2011) 128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>.
- [220] S. Karmakar, S. Chatterjee, K. Purkait, A. Mukherjee, Anticancer activity of a chelating nitrogen mustard bearing tetrachloridoplatinum(IV) complex: Better stability yet equipotent to the Pt(II) analogue, *Dalton Transactions* 45 (2016) 11710–11722. <https://doi.org/10.1039/c6dt00831c>.
- [221] Promega Corporation, ApoTox-Glo™ Triplex Assay. Technical Manual, TM322, Madison, WI, 2015.
- [222] Promega Corporation, RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay. Technical Manual, TM507, Madison, WI, 2017.
- [223] K. Kupcho, J. Shultz, R. Hurst, J. Hartnett, W. Zhou, T. Machleidt, J. Grailer, T. Worzella, T. Riss, D. Lazar, J.J. Cali, A. Niles, A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis, *Apoptosis* 24 (2019) 184–197. <https://doi.org/10.1007/s10495-018-1502-7>.
- [224] W.J. Geary, The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81–122. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0).

- [225] B.Z. Momeni, F. Rahimi, F. Rominger, Preparation of Co₃O₄ Nanoparticles via Thermal Decomposition of Three New Supramolecular Structures of Co(II) and (III) Containing 4'-Hydroxy-2,2':6',2''-Terpyridine: Crystal Structures and Thermal Analysis Studies, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 28 (2018) 235–250. <https://doi.org/10.1007/s10904-017-0706-6>.
- [226] A.D. Khalaji, M. Ghorbani, Mn₂O₃ nanoparticles synthesized from thermal decomposition of manganese(II) Schiff base complexes, *Acta Phys. Pol. A* 133 (2018) 7–9. <https://doi.org/10.12693/APHYSPOLA.133.7>.
- [227] M. Kalinowska, G. Świdorski, M. Matejczyk, W. Lewandowski, Spectroscopic, thermogravimetric and biological studies of Na(I), Ni(II) and Zn(II) complexes of quercetin, *J. Therm. Anal. Calorim.* 126 (2016) 141–148. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5362-5>.
- [228] D.D. Yang, H.W. Zheng, J.H. Xue, Y.Y. Yang, B. Jin, Effect of lattice water on the photochromic property/photochromism of a Zn(II)-viologen coordination polymers, *J. Mol. Struct.* 1311 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138340>.
- [229] G. Świdorski, M. Kalinowska, I. Rusinek, M. Samsonowicz, Z. Rzączyńska, W. Lewandowski, Spectroscopic (IR, Raman) and thermogravimetric studies of 3d-metal cinchoneronates and dinicotinates, *J. Therm. Anal. Calorim.* 126 (2016) 1521–1532. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5818-7>.
- [230] W. Ferenc, B. Cristóvão, J. Sarzyński, P. Sadowski, Complexes of the selected transition metal ions with 4-methoxycinnamic acid: Physico-chemical properties, in: *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2012: pp. 739–748. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1935-5>.
- [231] G. Świdorski, R. Świsłocka, R. Łyszczek, S. Wojtulewski, M. Samsonowicz, W. Lewandowski, Thermal, spectroscopic, X-ray and theoretical studies of metal complexes (sodium, manganese, copper, nickel, cobalt and zinc) with pyrimidine-5-carboxylic and pyrimidine-2-carboxylic acids, *J. Therm. Anal. Calorim.* 138 (2019) 2813–2837. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08594-x>.
- [232] T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Berlin Heidelberg, 1970. https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0_5.
- [233] S. Tommasini, M.L. Calabrò, P. Donato, D. Raneri, G. Guglielmo, P. Ficarra, R. Ficarra, Comparative photodegradation studies on 3-hydroxyflavone: Influence of different media, pH and light sources, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 389–397. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00586-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00586-7).
- [234] E. Woźnicka, L. Zapała, A. Miłoś, E. Ciszakowicz, K. Lecka-Szlachta, P. Woźnicki, A. Przygórzewska, M. Kosińska-Pezda, Ł. Byczyński, Synthesis, spectroscopic characterization and biological activities of complexes of light lanthanide ions with 3-hydroxyflavone, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 322 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124870>.

- [235] M. Guo, C. Perez, Y. Wei, E. Rapoza, G. Su, F. Bou-Abdallah, N.D. Chasteen, Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects, *Dalton Trans.* (2007) 4951–4961. <https://doi.org/10.1039/b705136k>.
- [236] R.F.V. De Souza, E.M. Sussuchi, W.F. De Giovani, Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions, *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry* 33 (2003) 1125–1144. <https://doi.org/10.1081/SIM-120023482>.
- [237] V.I. Tomin, Investigation of excited-state proton transfer in 3-hydroxyflavone molecules, *Opt. Spectrosc.* 108 (2010) 544–552. <https://doi.org/10.1134/S0030400X10040089>.
- [238] S. Protti, A. Mezzetti, J.P. Cornard, C. Lapouge, M. Fagnoni, Hydrogen bonding properties of DMSO in ground-state formation and optical spectra of 3-hydroxyflavone anion, *Chem. Phys. Lett.* 467 (2008) 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.11.005>.
- [239] H. Roohi, Recent progress in ESIPT-based fluorescent chemosensors for detection of Zn^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} , *Dyes and Pigments* 233 (2025) 112509. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2024.112509>.
- [240] K.P. Carter, A.M. Young, A.E. Palmer, Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems, *Chem. Rev.* 114 (2014) 4564–4601. <https://doi.org/10.1021/cr400546e>.
- [241] J.J. Lee, S.A. Lee, H. Kim, L. Nguyen, I. Noh, C. Kim, A highly selective CHEF-type chemosensor for monitoring Zn^{2+} in aqueous solution and living cells, *RSC Adv.* 5 (2015) 41905–41913. <https://doi.org/10.1039/c5ra05080d>.
- [242] S. Bhogal, P. Sharma, P. Rani, K. Kaur, A.K. Malik, Synchronous Fluorescence Determination of Al^{3+} Using 3-Hydroxy-2-(4-Methoxy Phenyl)-4H-Chromen-4-One as a Fluorescent Probe, *J. Fluoresc.* 32 (2022) 359–367. <https://doi.org/10.1007/s10895-021-02855-5>.
- [243] F.J. Aparicio, M. Alcaire, A. Borrás, J.C. Gonzalez, F. López-Arbeloa, I. Blaszczyk-Lezak, A.R. González-Elipé, A. Barranco, Luminescent 3-hydroxyflavone nanocomposites with a tuneable refractive index for photonics and UV detection by plasma assisted vacuum deposition, *J. Mater. Chem. C Mater.* 2 (2014) 6561–6573. <https://doi.org/10.1039/c4tc00294f>.
- [244] Y.A. Davila, M.I. Sancho, M.C. Almandoz, S.E. Blanco, Structural and spectroscopic study of $Al(III)$ -3-hydroxyflavone complex: Determination of the stability constants in water-methanol mixtures, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 95 (2012) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.04.034>.
- [245] R.M. Silverstein, F.X. Webster, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1998, ISBN 978-0-471-33635-8.
- [246] M. Dymarska, T. Janeczko, E. Kostrzewa-Susłów, Glycosylation of 3-Hydroxyflavone, 3-Methoxyflavone, quercetin and baicalein in fungal cultures of the genus *isaria*, *Molecules* 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23102477>.

- [247] J. Novotný, M. Sojka, S. Komorovsky, M. Nečas, R. Marek, Interpreting the Paramagnetic NMR Spectra of Potential Ru(III) Metallodrugs: Synergy between Experiment and Relativistic DFT Calculations, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 8432–8445. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02749>.
- [248] R. Jirásko, M. Holčapek, Structural analysis of organometallic compounds with soft ionization mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 1013–1036. <https://doi.org/10.1002/mas.20309>.
- [249] E. Stulz, C.C. Mak, J.K.M. Sanders, Matrix assisted laser desorption/ionisation (MALDI)-TOF mass spectrometry of supramolecular metalloporphyrin assemblies: A survey, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* (2001) 586–592. <https://doi.org/10.1039/b008638j>.
- [250] G. Wu, A.J. Stace, Gas phase studies of metal dimer complexes, $M_2L_n^+$, where $M = Zn$ and Mn , and $L = pyrrole$ and $furan$, for n in the range 1–5, *Int. J. Mass Spectrom.* 249–250 (2006) 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2005.12.014>.
- [251] K.J. Endres, K. Barthelmes, A. Winter, R. Antolovich, U.S. Schubert, C. Wesdemiotis, Collision cross-section analysis of self-assembled metallomacrocyclic isomers and isobars via ion mobility mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 34 (2020). <https://doi.org/10.1002/rcm.8717>.
- [252] A. Seyoum, K. Asres, F.K. El-Fiky, Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Phytochemistry* 67 (2006) 2058–2070. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.002>.
- [253] M. Musialik, R. Kuzmicz, T.S. Pawlowski, G. Litwinienko, Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 2699–2709. <https://doi.org/10.1021/jo802716v>.
- [254] A. Masek, E. Chrzescijanska, M. Latos, M. Zaborski, Influence of hydroxyl substitution on flavanone antioxidants properties, *Food Chem.* 215 (2017) 501–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.183>.
- [255] X. Tang, L. Wang, Y. Zhang, C. Sun, Relationship between antioxidant activity and ESIPT process based on flavonoid derivatives: A comprehensive analysis, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 327 (2025) 125370. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2024.125370>.
- [256] C. Sun, H. Zhao, X. Liu, H. Yin, Y. Shi, Tunable ESIPT reaction and antioxidant activities of 3-hydroxyflavone and its derivatives by altering atomic electronegativity, *Organic Chemistry Frontiers* 5 (2018) 3435–3442. <https://doi.org/10.1039/c8qo00998h>.
- [257] E. Rodríguez-Arce, M. Saldías, Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases, *Biomed. Pharmacother.* 143 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112236>.

- [258] R.F.V. de Souza, W.F. De Giovani, Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions, *Redox Report* 9 (2004) 97–104. <https://doi.org/10.1179/135100004225003897>.
- [259] M. Vakarelska-Popovska, V. Karadjova, Z. Velkov, Synthesis, structure and prooxidant activity of 3-hydroxyflavone complexes with Cu(II), *J. Chem. Technol. Metall.* 57 (2022) 419–432.
- [260] G. Dehghan, Z. Khoshkam, Tin(II)-quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity, *Food Chem.* 131 (2012) 422–426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.074>.
- [261] A.H. Yang, X.Y. Shi, X. Li, F.F. Li, Q.Q. Zhang, S.X. Jiang, J.Z. Cui, H.L. Gao, Spectroscopic and electrochemical studies on the evaluation of the radical scavenging activities of luteolin by chelating iron, *RSC Adv.* 4 (2014) 25227–25233. <https://doi.org/10.1039/c4ra01396d>.
- [262] M. M. Bratu, S. Birghila, H. Miresan, T. Negreanu-Pirjol, C. Prajitura, M. Calinescu, Biological Activities of Zn(II) and Cu(II) Complexes with Quercetin and Rutin: Antioxidant Properties and UV-Protection Capacity, *Rev. Chim.* 65 (2014) 544–549.
- [263] I.I. Lungu, D. Marin-Batîr, A. Panainte, C. Mircea, C. Tuchiluş, A. Ştefanache, F.A. Szasz, D. Grigorie, S. Robu, O. Cioancă, M. Hăncianu, Catechin-zinc-complex: synthesis, characterization and biological activity assessment, *Farmacia* 71 (2023) 755–763. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2023.4.11>.
- [264] K. Bush, P.A. Bradford, β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6 (2016). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>.
- [265] E.A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, S.A. Darst, Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase Mutations conferring Rif resistance (Rif^R) map almost exclusively to the rpoB gene (encoding the RNAP subunit) in every organism tested, including *E. coli* netic analyses have provided molecular details of amino, *Cell* 104 (2001) 901–912. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00286-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00286-0).
- [266] H. Nikaido, Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 593–656. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003>.
- [267] C. Maher, K.A. Hassan, The Gram-negative permeability barrier: tipping the balance of the in and the out, *MBio* 14 (2023) 1–15. <https://doi.org/10.1128/mbio.01205-23>.
- [268] M. Duffey, R.P. Jumde, R.M.A. da Costa, H.K. Ropponen, B. Blasco, L.J.V. Piddock, Extending the Potency and Lifespan of Antibiotics: Inhibitors of Gram-Negative Bacterial Efflux Pumps, *ACS Infect. Dis.* 10 (2024) 1458–1482. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00091>.
- [269] D. Mazzantini, M. Massimino, M. Calvigioni, V. Rossi, F. Celandroni, A. Lupetti, G. Batoni, E. Ghelardi, Anti-staphylococcal activity of a polyphenol-rich citrus extract: synergy with β -lactams and low proficiency to induce resistance, *Front. Microbiol.* 15 (2024) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1415400>.

- [270] W.M. Dunne, E.O. Mason, S.L. Kaplan, Diffusion of Rifampin and Vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* Biofilm, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 (1993) 2522–2526. <https://doi.org/10.1128/aac.37.12.2522>.
- [271] K.E. Daffinee, E.C. Piehl, C. Bleick, K.L. LaPlante, Eradication of *Staphylococcus epidermidis* within Biofilms: Comparison of Systemic versus Supratherapeutic Concentrations of Antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* 67 (2023) 1–9. <https://doi.org/10.1128/aac.00108-23>.
- [272] D. Saxena, R. Maitra, R. Bormon, M. Czekanska, J. Meiers, A. Titz, S. Verma, S. Chopra, Tackling the outer membrane: facilitating compound entry into Gram-negative bacterial pathogens, *Npj Antimicrob. Resist.* 1 (2023) 17. <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00016-1>.
- [273] C. Pitchumani Violet Mary, R. Shankar, S. Vijayakumar, Theoretical insights into the metal chelating and antimicrobial properties of the chalcone based Schiff bases, *Mol. Simul.* 45 (2019) 636–645. <https://doi.org/10.1080/08927022.2019.1573370>.
- [274] A.K. Renfrew, Transition metal complexes with bioactive ligands: Mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery, *Metallomics* 6 (2014) 1324–1335. <https://doi.org/10.1039/c4mt00069b>.
- [275] X. Qian, J. Zhang, Z. Gu, Y. Chen, Nanocatalysts-augmented Fenton chemical reaction for nanocatalytic tumor therapy, *Biomaterials* 211 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.023>.
- [276] A. Xu, X. Li, S. Ye, G. Yin, Q. Zeng, Catalyzed oxidative degradation of methylene blue by in situ generated cobalt (II)-bicarbonate complexes with hydrogen peroxide, *Appl. Catal. B* 102 (2011) 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.11.022>.
- [277] R. Marullo, E. Werner, N. Degtyareva, B. Moore, G. Altavilla, S.S. Ramalingam, P.W. Doetsch, Cisplatin induces a mitochondrial-ros response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions, *PLoS One* 8 (2013) 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081162>.
- [278] L.C. Costello, R.B. Franklin, A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer, *Arch. Biochem. Biophys.* 611 (2016) 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.014>.
- [279] J. Zhao, Q. Wu, X. Hu, X. Dong, L. Wang, Q. Liu, Z. Long, L. Li, Comparative study of serum zinc concentrations in benign and malignant prostate disease: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Sci. Rep.* 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep25778>.
- [280] P.K. To, M.H. Do, J.H. Cho, C. Jung, Growth modulatory role of zinc in prostate cancer and application to cancer therapeutics, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 2991. <https://doi.org/10.3390/ijms21082991>.
- [281] R.G. Uzzo, P.L. Crispen, K. Golovine, P. Makhov, E.M. Horwitz, V.M. Kolenko, Diverse effects of zinc on NF- κ B and AP-1 transcription factors: Implications for prostate cancer progression, *Carcinogenesis* 27 (2006) 1980–1990. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl034>.

- [282] K.W. Tan, H.L. Seng, F.S. Lim, S.C. Cheah, C.H. Ng, K.S. Koo, M.R. Mustafa, S.W. Ng, M.J. Maah, Towards a selective cytotoxic agent for prostate cancer: Interaction of zinc complexes of polyhydroxybenzaldehyde thiosemicarbazones with topoisomerase α , *Polyhedron* 38 (2012) 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2012.03.014>.
- [283] E. Smolinska, M. Moskot, J. Jakóbkiewicz-Banecka, G. Wegrzyn, B. Banecki, A. Szczerkowska-Dobosz, D. Purzycka-Bohdan, M. Gabig-Ciminska, Molecular action of isoflavone genistein in the human epithelial cell line HaCaT, *PLoS One* 13 (2018) 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192297>.
- [284] E.R. Lee, Y.J. Kang, J.H. Kim, H.T. Lee, S.G. Cho, Modulation of apoptosis in HaCaT keratinocytes via differential regulation of ERK signaling pathway by flavonoids, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 31498–31507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505537200>.
- [285] I. Bravo-Espinoza, F. Hernández Rosas, M.E. Hernández-Aguilar, M. Godínez-Victoria, R.R. Ramos-Hernández, C.A. López-Rosas, S. González-Periañez, E. Cruz-Pérez, F.R. Ramos-Morales, T.J. Pawar, Cytostatic and Pro-Apoptotic Effects of *Justicia spicigera* Schltl. on LNCaP Prostate Cancer Cells: Role of G0/G1 Cell Cycle Arrest and Phytochemical Characterization, *Plants* 15 (2026) 944. <https://doi.org/10.3390/plants15060944>.
- [286] M. Vassal, C.D. Pereira, F. Martins, V.L.M. Silva, A.M.S. Silva, A.M.R. Senos, M.E. V. Costa, M. de L. Pereira, S. Rebelo, Different Strategies to Attenuate the Toxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Spermatogonia Cells, *Nanomaterials* 12 (2022) 3561. <https://doi.org/10.3390/nano12203561>.
- [287] M.I. Murillo, C. Gaiddon, R. Le Lagadec, Targeting of the intracellular redox balance by metal complexes towards anticancer therapy, *Front. Chem.* 10 (2022) 1–20. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.967337>.
- [288] S. Abdolmaleki, S. Khaksar, A. Aliabadi, A. Panjehpour, E. Motieian, D. Marabello, M.H. Faraji, M. Beihaghi, Cytotoxicity and mechanism of action of metal complexes: An overview, *Toxicology* 492 (2023) 153516. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153516>.
- [289] U. Jungwirth, C.R. Kowol, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, W. Berger, P. Heffeter, Anticancer activity of metal complexes: Involvement of redox processes, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011) 1085–1127. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3663>.
- [290] D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrd2803>.
- [291] T. Itoh, R. Terazawa, K. Kojima, K. Nakane, T. Deguchi, M. Ando, Y. Tsukamasa, M. Ito, Y. Nozawa, Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells, *Free Radic. Res.* 45 (2011) 1033–1039. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.591391>.
- [292] H. Huang, P. Li, X. Ye, F. Zhang, Q. Lin, K. Wu, W. Chen, Isoalantolactone Increases the Sensitivity of Prostate Cancer Cells to Cisplatin Treatment by Inducing Oxidative

Stress, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021) 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.632779>.

- [293] T.L. Riss, R.A. Moravec, Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays, *Assay Drug Dev. Technol.* 2 (2004) 51–62.
<https://doi.org/10.1089/154065804322966315>.
- [294] J. Liu, W. Guo, J. Li, X. Li, J. Geng, Q. Chen, J. Gao, Tumor-targeting novel manganese complex induces ROS-mediated apoptotic and autophagic cancer cell death, *Int. J. Mol. Med.* 35 (2015) 607–616. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2073>.
- [295] Y. He, X. Gan, L. Zhang, B. Liu, Z. Zhu, T. Li, J. Zhu, J. Chen, H. Yu, Y.H. CoCl₂ induces apoptosis via a ROS-dependent pathway and Drp1-mediated mitochondria fission in periodontal ligament stem cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 315 (2018) 389–397. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00248.2017.-Oxygen>.
- [296] S.J. Eron, D.J. Macpherson, K.B. Dagbay, J.A. Hardy, Multiple Mechanisms of Zinc-Mediated Inhibition for the Apoptotic Caspases-3, -6, -7, and -8, *ACS Chem. Biol.* 13 (2018) 1279–1290. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00064>.
- [297] K.L. Huber, J.A. Hardy, Mechanism of zinc-mediated inhibition of caspase-9, *Protein Science* 21 (2012) 1056–1065. <https://doi.org/10.1002/pro.2090>.
- [298] BMG LABTECH GmbH, Real-time assessment of apoptosis and necrosis, *Biotechniques* 64 (2018) 187–188. <https://doi.org/10.2144/BTN-2017-0129>.
- [299] M. Dükel, Z. Tavsan, H.A. Kayali, Flavonoids regulate cell death-related cellular signaling via ROS in human colon cancer cells, *Process Biochem.* 101 (2021) 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.10.002>.
- [300] X. An, W. Yu, J. Liu, D. Tang, L. Yang, X. Chen, Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities, *Cell Death Dis.* 15 (2024) 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06939-5>.
- [301] N.J. Alghamdi, L. Balaraman, K.A. Emhoff, A.M.H. Salem, R. Wei, A. Zhou, W.C. Boyd, Cobalt(II) Diphenylazodioxide Complexes Induce Apoptosis in SK-HEP-1 Cells, *ACS Omega* 4 (2019) 14503–14510. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01684>.
- [302] Q. Al-Anbaky, Z. Al-Karakooly, S.P. Kilaparty, M. Agrawal, Y.M. Albkuri, A.B. Rangumagar, A. Ghosh, N. Ali, Cytotoxicity of Manganese (III) Complex in Human Breast Adenocarcinoma Cell Line Is Mediated by the Generation of Reactive Oxygen Species Followed by Mitochondrial Damage, *Int. J. Toxicol.* 35 (2016) 672–682. <https://doi.org/10.1177/1091581816659661>.
- [303] H. Kocdor, H. Ates, S. Aydin, R. Cehreli, F. Soyarat, P. Kemanli, D. Harmanci, H. Cengiz, M.A. Kocdor, Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non-small-cell lung cancer, *Drug Des. Devel. Ther.* 9 (2015) 3899–3909. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S87662>.

- [304] K.-C. Chen, C.-L. Hsieh, C.-C. Peng, H.-M. Hsieh-Li, H.-S. Chiang, K.-D. Huang, R.Y. Peng, Brain Derived Metastatic Prostate Cancer DU-145 Cells Are Effectively Inhibited In Vitro by Guava (*Psidium guajava* L.) Leaf Extracts, *Nutr. Cancer* 58 (2007) 93–106. <https://doi.org/10.1080/01635580701308240>.
- [305] J. Ren, Q. Huang, Y. Xu, M. Yang, J. Yang, K. Hu, Isoflavone lupiwighteone induces cytotoxic, apoptotic, and antiangiogenic activities in DU-145 prostate cancer cells, *Anticancer Drugs* 26 (2015) 599–611. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000224>.
- [306] R. Lotfizadeh, H. Sepehri, F. Attari, L. Delphi, Flavonoid calycopterin induces apoptosis in human prostate cancer cells in-vitro, *Iran. J. Pharm. Res.* 19 (2020) 391–401. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.113410.14283>.
- [307] J. Chen, A. Creed, A.Y. Chen, H. Huang, Z. Li, G.O. Rankin, X. Ye, G. Xu, Y.C. harlie Chen, Nobiletin suppresses cell viability through AKT pathways in PC-3 and DU-145 prostate cancer cells, *BMC Pharmacol. Toxicol.* 15 (2014) 59. <https://doi.org/10.1186/2050-6511-15-59>.
- [308] K.H. Shen, S.H. Hung, L. Te Yin, C.S. Huang, C.H. Chao, C.L. Liu, Y.W. Shih, Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway, *Mol. Cell. Biochem.* 333 (2010) 279–291. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0229-8>.
- [309] Y.J. Jeon, S.N. Jung, J. Yun, C.W. Lee, J. Choi, Y.J. Lee, D.C. Han, B.M. Kwon, Ginkgetin inhibits the growth of DU-145 prostate cancer cells through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 activity, *Cancer Sci.* 106 (2015) 413–420. <https://doi.org/10.1111/cas.12608>.
- [310] H.-K. Chang, M.-S. Shin, H.-Y. Yang, J.-W. Lee, Y.-S. Kim, M.-H. Lee, J. Kim, K.-H. Kim, C.-J. Kim, Amygdalin Induces Apoptosis through Regulation of Bax and Bcl-2 Expressions in Human DU145 and LNCaP Prostate Cancer Cells, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 1597–1602. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1597>.
- [311] C. Zhang, C. Li, Y. Wang, L. Xu, X. He, Q. Zeng, C. Zeng, F. Mai, B. Hu, D. Ouyang, Chemotherapeutic paclitaxel and cisplatin differentially induce pyroptosis in A549 lung cancer cells via caspase-3/GSDME activation, *Apoptosis* 24 (2019) 312–325. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01515-1>.

Streszczenie

Flawonoidy, ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznej, stanowią istotną grupę związków o potencjalnym zastosowaniu w medycynie, a ich kompleksowanie z jonami metali może prowadzić do modyfikacji właściwości fizykochemicznych i biologicznych. W związku z tym potencjałem, w ramach niniejszej pracy zsyntetyzowano oraz scharakteryzowano kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami kobaltu(II), manganu(II) i cynku(II).

Strukturę otrzymanych związków potwierdzono z wykorzystaniem analizy elementarnej, miareczkowania kompleksometrycznego, metod spektroskopowych (UV-Vis, FT-IR, NMR), spektrometrii mas (SALDI-ToF-MS) oraz technik analizy termicznej. Wykazano, że kompleksy mają charakter mononuklearny i wzór ogólny $ML_2 \cdot nH_2O$ ($M = Co(II), Mn(II)$ lub $Zn(II)$), a koordynacja jonów metali zachodzi poprzez układ 3-hydroksy-4-karbonylowy liganda.

Ocena aktywności biologicznej wykazała, że kompleksowanie modyfikuje właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i cytotoksyczne 3-hydroksyflawonu. W testach z rodnikiem DPPH[•] zaobserwowano obniżenie aktywności przeciwutleniającej kompleksów w porównaniu z wolnym ligandem. Aktywność przeciwbakteryjną badano wobec wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych poprzez wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego metodą mikrorozcieńczeń. Wszystkie badane związki wykazały działanie bakteriostatyczne, ale nie bakteriobójcze, a kompleksowanie wpłynęło na aktywność przeciwbakteryjną w sposób zależny od metalu i szczepu. Najbardziej wyraźny wzrost aktywności względem wolnego liganda odnotowano dla kompleksów $Zn(II)$ i $Co(II)$ wobec *E. coli* oraz kompleksów $Co(II)$ i $Mn(II)$ wobec *S. epidermidis*.

Oceny aktywności cytotoksycznej dokonano z wykorzystaniem testu wychwytu czerwieni obojętnej, który wykazał zależny od stężenia spadek żywotności komórek. Największą wrażliwość odnotowano wobec komórek raka prostaty DU-145. Kompleks $Zn(II)$ -3HF odznaczał się najwyższą cytotoksycznością oraz korzystnym profilem selektywności względem komórek nienowotworowych. Analiza mechanizmów działania wykazała, że badane związki indukują różne typy śmierci komórkowej, w tym apoptozę oraz procesy niezależne od kaspaz.

Uzyskane wyniki wskazują, że kompleksy 3-hydroksyflawonu z jonami metali przejściowych wykazują zróżnicowaną aktywność biologiczną, przy czym najbardziej korzystny profil działania, obejmujący wysoką cytotoksyczność oraz selektywność względem komórek nowotworowych, zaobserwowano dla kompleksu Zn(II)-3HF, co czyni go interesującym obiektem dalszych badań.

Abstract

Due to their broad spectrum of biological activity, flavonoids constitute an important group of compounds with potential applications in medicine, and their complexation with metal ions can lead to modifications in physicochemical and biological properties. In view of this potential, complexes of 3-hydroxyflavone with cobalt(II), manganese(II), and zinc(II) ions were synthesized and characterized.

The structures of the obtained compounds were confirmed using elemental analysis, complexometric titration, spectroscopic methods (UV-Vis, FT-IR, NMR), mass spectrometry (SALDI-ToF-MS), and thermal analysis techniques. The complexes were shown to be mononuclear and to have the general formula $ML_2 \cdot nH_2O$ ($M = Co(II), Mn(II)$ or $Zn(II)$), and the coordination of metal ions occurs through the 3-hydroxy-4-carbonyl system of the ligand.

Assessment of biological activity showed that complexation modifies the antioxidant, antibacterial, and cytotoxic properties of 3-hydroxyflavone. In tests with the DPPH• radical, a decrease in the antioxidant activity of the complexes was observed compared to the free ligand. Antibacterial activity was assessed against selected strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria by determining the minimum inhibitory concentration using the microdilution method. All tested compounds demonstrated bacteriostatic, but not bactericidal, activity, and complexation influenced antibacterial activity in a metal- and strain-dependent manner. The most pronounced increase in activity relative to the free ligand was noted for Zn(II) and Co(II) complexes against *E. coli* and Co(II) and Mn(II) complexes against *S. epidermidis*.

Cytotoxic activity was assessed using a neutral red uptake assay, which demonstrated a concentration-dependent decrease in cell viability. The highest sensitivity was observed against DU-145 prostate cancer cells. The Zn(II)-3HF complex demonstrated the highest cytotoxicity and a favorable selectivity profile against non-cancerous cells. Analysis of the mechanisms of action demonstrated that the tested compounds induce various types of cell death, including apoptosis and caspase-independent processes.

The obtained results indicate that complexes of 3-hydroxyflavone with transition metal ions exhibit diverse biological activity, with the most favorable profile of action, including high cytotoxicity and selectivity towards cancer cells, observed for the Zn(II)-3HF complex, making it an interesting subject for further research.

Wykaz dorobku naukowego

A. Publikacje w czasopismach naukowych:

1. Woźnicka, E, **Miłoś, A.**, Zapała, L., Kosińska-Pezda, M., Ciszkowicz, E., Byczyński, Ł. Synthesis, spectroscopic, and photophysical studies of Mn(II), Co(II), and Zn(II) complexes with 3-hydroxyflavone: Insights into anticancer activity against prostate cancer cells, *JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY*, t. 274 (2026) **100 pkt MNiSW**, s. 1-18, ISSN: 0162-0134, **IF₂₀₂₄ = 3,2**
2. Woźnicka, E, **Miłoś, A.**, Zapała, L., Kosińska-Pezda, M., Lecka-Szlachta, K., Byczyński, Ł. Design and Characterization of Mn(II), Co(II), and Zn(II) Complexes with Chrysin: Spectroscopic, Antibacterial, and Anti-Biofilm Insights, *PROCESSES*, t. 13 (2025) **70 pkt MNiSW**, s. 1-21, ISSN: 2227-9717, **IF₂₀₂₄ = 2,8**
3. Dyba, B., **Miłoś, A.**, Woźnicka, E., Rudolphi-Szydło, E., Ciszkowicz, E. The effects of 3-hydroxyflavone complexes with transition metal ions on the physicochemical and microbial properties of bacterial cell membranes, *SCIENTIFIC REPORTS*, t. 15 (2025) **140 pkt MNiSW**, s. 1-15, ISSN: 2045-2322, **IF₂₀₂₄ = 3,9**
4. Ciszkowicz, E., **Miłoś, A.**, Łyskowski, A., Buczkowicz, J., Nieczaj, A., Lecka-Szlachta, K., Hus, K., Sikora, K., Neubauer, D., Bauer, M., Kamysz, W., Bocian, A. AMPEC4: *Naja ashei* Venom-Derived Peptide as a Stimulator of Fibroblast Migration with Antibacterial Activity, *MOLECULES*, t. 30 (2025) **140 pkt MNiSW**, s. 1-24, ISSN: 1420-3049, **IF₂₀₂₄ = 4,6**
5. Zapała, L., Ciszkowicz, E., Kosińska-Pezda, M., Maciołek, U., Koziół, A., **Miłoś, A.**, Woźnicka, E., Bocian, A., Zapała, W., Rydel-Ciszek, K., Perrone, M. Novel silver(I) complexes with fenamates: Insights into synthesis, spectral characterization, and bioactivity, *JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY*, t. 266 (2025) **100 pkt MNiSW**, s. 1-18 ISBN/ISSN: 0162-0134, **IF₂₀₂₄ = 3,8**
6. Woźnicka, E., Zapała, L., **Miłoś, A.**, Ciszkowicz, E., Lecka-Szlachta, K., Woźnicki, P., Przygórzewska, A., Kosińska-Pezda, M., Byczyński, Ł. Synthesis, spectroscopic characterization and biological activities of complexes of light lanthanide ions with 3-hydroxyflavone, *SPECTROCHIMICA ACTA PART A-MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, t. 322 (2024) **140 pkt MNiSW**, s. 1-13 ISBN/ISSN: 1386-1425, **IF₂₀₂₄ = 4,6**
7. Miłek, M., Ciszkowicz, E., Lecka-Szlachta, K., **Miłoś, A.**, Zaguła, G., Pasternakiewicz, A., Dżugan, M. Mineral Composition, Antioxidant, Anti-Urease, and Antibiofilm Potential of Juglans Regia Leaves and Unripe Fruits, *ACTA UNIVERSITATIS CIBINIENSIS - SERIES E: FOOD TECHNOLOGY*, t. 26, z. 1 (2022) **140 pkt MNiSW**, s. 69-82 ISBN/ISSN: 1221-4973

8. Karcz, D., Starzak, K., Ciszkowicz, E., Lecka-Szlachta, K., Kamiński, D., Creaven, B., **Miłoś, A.**, Jenkins, H., Ślusarczyk, L., Matwijczuk, A. Design, Spectroscopy, and Assessment of Cholinesterase Inhibition and Antimicrobial Activities of Novel Coumarin–Thiadiazole Hybrids, *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, t. 23, z. 11 (2022) **140 pkt MNiSW**, s. 1-20 ISBN/ISSN: 1422-0067 **IF₂₀₂₂ = 5,6**
9. Karcz, D., Starzak, K., Ciszkowicz, E., Lecka-Szlachta, K., Kamiński, D., Creaven, B., Jenkins, H., Radomski, P., **Miłoś, A.**, Ślusarczyk, L., Matwijczuk, A. Novel Coumarin-Thiadiazole Hybrids and Their Cu(II) and Zn(II) Complexes as Potential Antimicrobial Agents and Acetylcholinesterase Inhibitors, *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, t. 22, z. 18 (2021) **140 pkt MNiSW**, s. 1-23 ISBN/ISSN: 1422-0067, **IF₂₀₂₁ = 6,2**

B. Rozdziały w monografiach:

1. **Miłoś, A.**, Ciszkowicz, E., Lecka-Szlachta, K., Woźnicka, E., Kosińska-Pezda, M., Zapała, L. Analiza właściwości antybakteryjnych oraz cytotoksyczności kompleksów jonów Co(II), Mn(II) oraz Zn(II) z chryzyną oraz 3-hydroksyflawonem [w:] *Flawonoidy i ich pochodne w badaniach naukowych i praktyce*, OFICYNA WYDAWNICZA POLITECHNIKI RZESZOWSKIEJ (pod red.) Maria Kopacz, Janusz Pusz, Jan Kalembkiewicz (2022) **20 pkt MNiSW**, s. 133-144 ISBN/ISSN: 978-83-7934-619-6

C. Patenty

1. Hus, K., Bocian, A., Ciszkowicz, E., Lecka-Szlachta, K., Buczkowicz, J., Łyskowski, A., **Miłoś, A.** Nowy peptyd penetrujący oraz jego zastosowanie (2025).
2. Hus, K., Bocian, A., Ciszkowicz, E., Lecka-Szlachta, K., Buczkowicz, J., Łyskowski, A., **Miłoś, A.** Nowy peptyd penetrujący komórki oraz jego zastosowanie (2025).

D. Doniesienia konferencyjne

1. **Miłoś, A.**, Ciszkowicz, E., Woźnicka, E. Interakcje BSA z syntetycznymi kompleksami 3-hydroksyflawonu, referat, XIII Ogólnopolska Konferencja „Flawonoidy i ich zastosowanie”, konferencja krajowa, 08.09.2022.
2. **Miłoś, A.**, Ciszkowicz, E., Lecka-Szlachta, K., Kosińska-Pezda, M., Woźnicka, E., Zapała, L. Syntetyczne kompleksy chryzyny i 3-hydroksyflawonu – ocena właściwości przeciwbakteryjnych i cytotoksyczności, referat, XIII Ogólnopolska Konferencja „Flawonoidy i ich zastosowanie”, konferencja krajowa, 08.09.2022.

3. Ciszkowicz, E., **Miłoś, A.**, Zapała, L., Woźnicka, E. Cytotoxicity, DNA- and albumin-binding of the cobalt(II), iron(III) and nickel(II) complexes with the non-steroidal antiinflammatory drug niflumic acid, referat, 1st International Scientific Conference “Advances in Biomedical Research with Use of In Vitro Methods”, konferencja międzynarodowa, 17.06.2021.
4. **Miłoś, A.**, Ciszkowicz, E., Zapała, L. Przeciwbakteryjna aktywność kompleksów jonów kobaltu(II), cynku(II) oraz manganu(II) z kwasem niflumowym oraz kwasem niflumowym i 1,10-fenantroliną, referat, VI Ogólnopolska Mikrobiologiczna Konferencja Naukowa MICROBS, konferencja krajowa, 24.06.2022.
5. Ciszkowicz, E., Bocian, A., **Miłoś, A.**, Hus, K., Buczkowicz, J., Petrilla, V., Petrillova, M., Legath, J. Cytotoxicity of Phospholipases A2 and 3FTxs from *Naja ashei* venom, referat, 1st International Congress of the European Venom Network (EUVEN), konferencja międzynarodowa, 15.09.2021.