

STRESZCZENIE

W Laboratorium Przesiewowym Związków Przeciwnowotworowych istniejącym w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMiM PAN w Łodzi, przebadano serię 80 pochodnych benzo[b]furanów i dikarboksyimidów. Związki te oryginalnie zaprojektowano i zsyntetyzowano w Zespole Prof. Jerzego Kossakowskiego z Zakładu Chemii Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania nad właściwościami przeciwnowotworowymi i mechanizmem indukowanej przez te związki toksyczności w wybranych liniach komórek nowotworowych stały się przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej. Badania te miały na celu wyjaśnienie molekularnych mechanizmów obserwowanej toksyczności i wyselekcjonowanie potencjalnych kandydatów do opracowania nowych leków przeciwnowotworowych.

Pierwszym etapem przeprowadzonych badań było określenie, za pomocą testu MTT, właściwości cytotoksycznych badanych związków. Na tym etapie wyselekcjonowano 11 związków wykazujących cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych HeLa i/albo K562 (IC_{50} w zakresie 1-100 μM). Ponadto, co bardzo istotne, związki te nie były toksyczne dla komórek prawidłowych HUVEC. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż niektóre związki wykazywały selektywną aktywność cytotoksyczną (IC_{50} w zakresie 1-30 μM) wobec komórek białaczkowych K562, MOLT-4, HL-60, natomiast nie były toksyczne dla adherentnych komórek nowotworowych HeLa, CFPAC i prawidłowych HUVEC. Szczególnie selektywne właściwości cytotoksyczne wobec badanych komórek białaczkowych zaobserwowałam dla, będącego pochodną benzo[b]furanu, związku MKN (nr 14) oraz dla, będących pochodnymi dikarboksyimidów, związków BK 176.1, BK 176.2, BK 176.4, BK 176.5 i BK 124.1 (odpowiednio, nr 1,2,4,5 i 6). W dalszym etapie badań postanowiłam porównać poziom cytotoksyczności m.in. związku MKN (14), BK 124.1 (6) oraz związku BK 176.4 (4) z poziomem cytotoksyczności terapeutyków tj. cytarabiny, bortezomibu, sorafenibu, CPT-11 oraz doksorubicyny, stosowanych w leczeniu różnych typów nowotworów w tym białaczek. Uzyskane wyniki wskazują, iż toksyczność i selektywność badanych pochodnych wobec komórek białaczkowych jest znacznie wyższa, niż w przypadku referencyjnych cytostatyków. Co istotne, badane pochodne nie są toksyczne wobec komórek prawidłowych (HUVEC), czego nie można powiedzieć o związkach referencyjnych (poza cytarabiną).

W związku z wyraźnym efektem cytotoksycznym (IC_{50} w zakresie 1-100 μM) wybranych związków z grupy pochodnych benzo[b]furanów i dikarboksyimidów, dalsze badania miały na celu określenie, czy śmierć komórek nowotworowych następuje na drodze apoptozy czy nekrozy. Wzrost aktywności kaspaz wykonawczych procesu apoptozy tj. kaspazy 3 i 7 w badanych komórkach nowotworowych K562, MOLT-4, HeLa świadczył o uruchomieniu kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej nieodwracalnie do śmierci komórki na drodze apoptozy. Na szczególną uwagę zasługuje wynik świadczący o znacznym wzroście aktywności kaspazy 3 i 7 w komórkach białaczkowych K562 i MOLT-4, w obecności związków MKN i BK 176.4. Określając poziom fosfatydyloseryny (marker apoptozy) na powierzchni komórek białaczkowych K562 i MOLT-4 zauważyłam zwiększoną ilość komórek zarówno wczesno- jak i późno-apoptotycznych w hodowli, w której obecne były te dwa badane związki.

W celu identyfikacji szlaku apoptotycznego, prowadzącego do śmierci komórek białaczkowych w obecności związku MKN (**14**) oraz związku BK 176.4 (**4**), określiłam aktywność kaspazy 8, która jest charakterystyczna dla drogi receptorowej, oraz kaspazy 9 charakterystycznej dla szlaku mitochondrialnego. Prowadzone badania wykazały, iż związki **14** i **4** wywołują w komórkach K562 i MOLT-4, aktywację zarówno szlaku receptorowego, jak i mitochondrialnego apoptozy, o czym świadczy, odpowiednio, wzrost aktywności kaspazy 8 i 9.

Kolejnym etapem badań była analiza poziomu ekspresji genów zaangażowanych w proces apoptozy. Badanie to miało na celu wskazanie genów charakterystycznych dla szlaku, poprzez który powyższe związki MKN i BK 176.4 indukują proces apoptozy w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej K562. Przeprowadziłam analizę poziomu ekspresji 93 genów pro- i antyapoptotycznych z wykorzystaniem mikromacierzy DNA. Stwierdziłam, że w obecności badanych związków dochodzi do wzrostu ekspresji proapoptotycznych genów zaangażowanych zarówno w szlak receptorowy (m.in. *TNFRSF 10A*, *TNFRSF 10B*, *TNFRSF 21*, *CASP8*, *CASP10*, *RIPK1*), jak i szlak mitochondrialny (m.in. *BAX*, *BAD*, *BID*, *BAK*, *BIM*, *PUMA*, *NOXA*, *Smac/DIABLO*, *APAF1*). Poziom zmian ekspresji wybranych genów apoptotycznych został także zweryfikowany z wykorzystaniem techniki *real-time* RT-PCR.

W ostatniej części pracy wykonałam badania mające na celu identyfikację bezpośrednich przyczyn, jak i mechanizmów obserwowanej cytotoksyczności badanych pochodnych benzo[b]furanów i dikarboksyimidów. Mając na uwadze strukturę badanych związków (płaski układ aromatyczny cząsteczki), doniesienia literaturowe o możliwości interkalacji badanych pochodnych do DNA, oraz obecność elementu halogenku benzyłowego (tak jak w MKN) sprawdziłam, czy badane związki oddziałują z DNA i czy wpływają na konformację (strukturę) DNA. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, iż możliwym mechanizmem cytotoksycznego działania związków MKN (**14**) i BK 176.4 (**4**), może być alkilowanie lub/i interkalacja do DNA. Przemawia za tym obserwacja, że obydwa związki hamują cięcie plazmidowego DNA za pomocą enzymu restrykcyjnego *Bam*HI. Oddziaływanie badanych związków z DNA zostało także potwierdzone z wykorzystaniem techniki dichroizmu kołowego (CD). Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, iż obydwa badane związki, oddziałują z DNA, modyfikując jego strukturę na zasadzie interkalacji lub innych oddziaływań fizykochemicznych.

Dla badanych pochodnych benzo[b]furanów i dikarboksyimidów została przeprowadzona także analiza SAR (ang. *structure-activity relationship*) i zidentyfikowano najbardziej pożądane elementy struktury obu pochodnych, warunkujące ich aktywność przeciwnowotworową.

Silny potencjał biologiczny związku MKN oraz związku BK 176.4, może mieć dużą wartość farmakologiczną w poszukiwaniu nowych i lepszych leków, mających zastosowanie w leczeniu białaczek i chorób o podłożu proliferacyjnym.