

## STRESZCZENIE

Dane epidemiologiczne wskazują, że nowotwory stają się pierwszą przyczyną śmiertelności w Polsce i innych krajach europejskich, szczególnie w populacji osób poniżej 65. roku życia. Pomimo coraz lepszej diagnostyki i nowych metod leczenia, współczesna terapia onkologiczna w wielu przypadkach nadal jest bezradna. W związku z tym wyzwaniem dla współczesnych nauk medycznych jest znalezienie nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych. Wyniki badań przedklinicznych sugerują, że cząsteczek o takiej aktywności biologicznej należy poszukiwać między innymi wśród pochodnych *trans*-stilbenu. Najbardziej znanym przedstawicielem tej grupy związków jest resweratrol, który hamuje proces nowotworowy na wszystkich trzech etapach jego rozwoju. Podobne właściwości posiadają jego metabolity oraz pochodne. Wymienione związki są również inhibitorami cyklooksygenazy 2 (COX-2), która odgrywa ważną rolę w procesie onkogenezy.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena nowych pochodnych *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu jako cząsteczek o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych. Wybrane związki poddano badaniom *in vitro*, w których oznaczono zdolność do hamowania aktywności COX-2 oraz ich działanie cytotoksyczne względem linii komórkowej raka piersi MCF-7. Przeprowadzono również analizy *in silico*, w ramach których określono właściwości fizyko-chemiczne oraz zidentyfikowano fragmenty budowy odpowiedzialne za aktywność badanych związków względem COX-2. Wykonano także symulację dokowania, której celem była próba wyjaśnienia, w jaki sposób najbardziej selektywny inhibitor COX-2 może wiązać się z centrum aktywnym tego enzymu.

Analizowane związki poddano inkubacji z COX-1 i COX-2 w warunkach *in vitro*, a następnie oznaczono ich aktywność za pomocą testu immunoenzymatycznego, w którym mierzono stężenie prostaglandyny  $F_{2\alpha}$ . Spośród tych cząsteczek najsilniejszym inhibitorem prozapalnej cyklooksygenazy-2 był 4-nitro-3',4',5'-trihydrokso-*trans*-stilben, oznaczony symbolem N1 (COX-2  $IC_{50} = 0,279 \mu\text{mol/l}$ , 95% CI: 0,111 – 0,703), który jednocześnie był najbardziej selektywnym inhibitorem tego enzymu (wskaźnik selektywności powyżej 60). W badanym zakresie stężeń związek N1 hamował aktywność COX-2 również w komórkach MCF-7, które wykazują silną ekspresję tego enzymu. Potwierdzeniem tego działania było ponad 30% zmniejszenie stężenia  $PGE_2$  w supernatancie hodowlanym. Badany związek wykazywał jednak słabszą i mniej selektywną aktywność wobec COX-2 niż celekoksyb.

Działanie cytotoksyczne analizowanych związków oznaczono za pomocą testu MTT w komórkach raka piersi MCF-7. Równolegle zbadano aktywność celekoksybu jako związku referencyjnego. Najsilniejsze właściwości cytotoksyczne wykazywały dwie cząsteczki: 4-nitro-3',4',5'-trihydrokso-*trans*-stilben oraz 4-nitro-3',4',5'-trimetokso-*trans*-stilben. Obydwa związki

w stężeniu 12,5  $\mu\text{mol/l}$  spowodowały ponad 30% obniżenie żywotności komórek, co spełnia kryteria cytotoksyczności wg standardów ISO. Należy zaznaczyć, że siła działania obydwóch związków była podobna, pomimo wcześniej wykazanych znacznych różnic w bezpośrednim hamowaniu aktywności COX-2. Przypuszcza się, że porównywalna aktywność pochodnej metoksylowej może być wynikiem biotransformacji (O-demetylacji) do pochodnej hydroksylowej w komórkach MCF-7. Za właściwości cytotoksyczne badanych związków może również odpowiadać grupa nitrowa. W przeprowadzonym teście MTT zaobserwowano, że wszystkie pięć cząsteczek posiadających tę grupę wykazywało większą aktywność niż pochodna chlorowa. Prawdopodobny mechanizm wyjaśniający tę obserwację może wynikać z redukcji grupy nitrowej do jej toksycznych pochodnych uszkadzających białka i DNA. Nie badano aktywności pochodnych *trans*-stilbenu w stężeniach powyżej 12,5  $\mu\text{mol/l}$  z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność w medium hodowlanym. Celekoksyb w identycznym zakresie stężeń charakteryzował się słabszym działaniem, ale w większych stężeniach wykazywał silny efekt cytotoksyczny ( $\text{IC}_{50} = 49,66 \mu\text{mol/l}$ , 95% CI: 45,19 – 54,55).

Na podstawie analizy 2D QSAR stwierdzono, że pochodne *trans*-stilbenu o mniejszej lipofilności oraz zawierające więcej donorów wiązań wodorowych i atomów polarnych powinny charakteryzować się silniejszym i bardziej selektywnym działaniem wobec COX-2 niż COX-1. Mniejsza masa, objętość i powierzchnia całkowita tych cząsteczek oraz obecność mniej rozgałęzionych podstawników może sprzyjać natomiast silniejszej aktywności względem COX-1. Na tej podstawie zaprojektowano trzy nowe pochodne *trans*-stilbenu, które następnie zsyntezowano i poddano wyżej wymienionym badaniom *in vitro*.

Przeprowadzono również inne badanie *in silico*, wykorzystujące naiwny model Bayesa. Wykazano w nim, że obecność podstawników hydrofilowych, takich jak np. grupa hydroksylowa lub nitrowa, może zwiększać aktywność potencjalnych inhibitorów COX-2. Podstawniki lipofilowe, do których zalicza się przede wszystkim grupę metoksylową i dimetyloaminową, mogą powodować natomiast skutek odwrotny. Wnioski te są zbieżne z wynikami obliczeń 2D QSAR.

W wyniku przeprowadzonej symulacji dokowania zaobserwowano, że 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy-*trans*-stilben (N1) przyjmuje niemal identyczną orientację przestrzenną w miejscu aktywnym COX-1 i COX-2, układając się wewnątrz głównego kanału hydrofobowego. Pomimo większej ilości wiązań wodorowych utworzonych z COX-1, obliczone wartości energii dokowania wskazują na lepsze dopasowanie i silniejszą interakcję tej cząsteczki z centrum aktywnym COX-2. Nie są to jednak różnice, które w sposób wystarczający mogą wyjaśniać selektywne właściwości tego związku wobec indukowanej izoformy COX. Przypuszcza się, że wybiórcze działanie związku N1 może wynikać z dodatkowego lub silniejszego blokowania miejsca aktywnego peroksydazy COX-2 niż COX-1 lub allosterycznego wiązania się z COX-2 w pobliżu „wejścia” do centrum aktywnego. Niezbędne jest wykonanie badań krystalograficznych, na podstawie których

zostanie zweryfikowany sposób wiązania się badanego związku z miejscem aktywnym obydwóch izoform.

Wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwoliły wytypować 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilben, który w przeprowadzonych badaniach wykazywał działanie cytotoksyczne oraz silnie i selektywnie hamował aktywność COX-2. Dokładne wyjaśnienie mechanizmu działania tej cząsteczki wymaga jednak dalszych badań. Uzyskane dane mogą również posłużyć do zaprojektowania nowych pochodnych *trans*-stilbenu o korzystniejszych właściwościach biologicznych.

02.11.2017r.

mjr farm. Mirosz Reguła