

mgr inż. Joanna Matalińska

Naturalne peptydy oraz ich analogi modulujące aktywność komórek nowotworowych czerniaka

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie: biologii medycznej

Promotor: prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kisik

Promotor 2009-2014: prof. dr hab. Andrzej W. Lipkowski



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa rok 2018

Streszczenie

Czerniak jest nowotworem złośliwym skóry, który ze względu na wysoką skłonność do dawania wczesnych przerzutów oraz dużą oporność na leczenie charakteryzuje się wysokim wskaźnikiem śmiertelności. Liczba zachorowań na czerniaka dynamicznie wzrasta, wobec czego choroba ta stanowi bieżące coraz istotniejsze wyzwanie dla systemów opieki zdrowotnej. Czerniakowi, tak jak i innym chorobom nowotworowym, towarzyszą dolegliwieści bólowe nasilające się wraz z progresją choroby. Dostępne możliwości terapeutyczne bólu nowotworowego nie są satysfakcjonujące z wielu powodów. Używanie stosowanych obecnie w leczeniu analgetyków opioidowych wiąże się z rozwojem tolerancji lekowej oraz pojawieniem się skutków ubocznych i niebezpiecznych działań niepożądanych (depresja oddechowa, zaparcia, wymioty). Co więcej, w przypadku niektórych silnych opioidów wykazano ich działanie przyspieszające progresję nowotworu. Wobec powyższego, poszukiwanie nowych leków przeciwbólowych, przeznaczonych szczególnie do leczenia bólu nowotworowego jest w tym wyzwaniami dla współczesnej chemii leków.

Jedną z szerzej stosowanych strategii w tym zakresie jest poszukiwanie wielocelowych leków przeciwbólowych. Substancje tego typu mają za zadanie wywoływać działanie przeciwbólowe przez łącznie się z więcej niż jednym celem molekularnym (receptorem) odpowiedzialnym za różne elementy szlaków uczestniczących w odpowiedzi bólowej. W Zakładzie Neuropeptydów IMDiK PAN opracowano i zsyntezowano związki hybrydowe, będące jednocześnie ligandami receptorów opioidowych (MOR lub DOR) oraz tachykininowych NK1. Oba wymienione typy receptorów biorą udział w modulowaniu i przewodzeniu bodźców bólowych. Udowodniono, że związki chemiczne o charakterze agonisty opioidowego i antagonisty tachykininowego charakteryzują się wzmocnionym działaniem przeciwbólowym. Co więcej - z racji nadekspresji receptorów NK1 na komórkach wielu nowotworów oraz cytotoksycznego działania antagonistów NK1 – związki tego typu mogą wykazywać dodatkowe korzystne działanie przeciwnowotworowe, co szczególnie predysponuje je do stosowania w leczeniu bólów nowotworowych.

Celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie było opisanie niektórych, istotnych z punktu widzenia leczenia czerniaka właściwości biologicznych związków będących analogami naturalnych peptydów opioidowych i tachykininowych. Zestaw analizowanych związków zawierał substancje o zróżnicowanym charakterze: hybrydy typu agonista opioidowy/antagonista NK1 (związki o nazwach kodowych: 3020, 3052, 3266), agonista opioidowy/agonista NK1 (3051), antagonistą NK1 (2080), oraz wzorcowy agonista NK1 (naturalny peptyd substancja P) i

wzorcowy antagonistą NK1 (aprepitant). Badane substancje były testowane względem cytotoksyczności na 3 liniach komórkowych czerniaka: MeW151, MeW155 i MeW164. Przebadano również wpływ na komórki normalne: dojrzałe fibroblasty FIW180 i Fib9 oraz komórki płodowe FIWp95. Badania komórkowe obejmowały testy określające zmiany liczby komórek pod wpływem 4- (komórki nowotworowe) lub 7-dniowej (komórki prawidłowe) inkubacji z testowanymi związkami, testy MTT (wpływ na żywotność) i ocenę zdolności komórek do tworzenia kolonii (w przypadku komórek nowotworowych). Dla związków, które najbardziej hamowały wzrost komórek (3020, 3052, 3266) wykonano także oznaczenie indeksu proliferacyjnego komórek z wykorzystaniem białka Ki67. Dwa najlepsze (jeśli chodzi o powinowactwo do receptorów opioidowych) związki zostały również przebadane *in vivo* pod kątem działania przeciwbólowego (test cofania ogona). Substancje, dla których brak było danych literaturowych o powinowactwie receptorowym, przebadano pod kątem siły wiązania do receptorów opioidowych MOR i DOR oraz receptorów tachykininowych NK1 (metodą kompetencyjnego wypierania radioligandów). Sprawdzone również obecność receptorów opioidowych MOR i DOR na powierzchni badanych komórek.

Zwizdek 3266 (agonista opioidowy MOR/antagonista NK1) wykazuje bardzo dobre właściwości cytotoksyczne wobec wszystkich badanych linii nowotworowych, selektywne względem komórek prawidłowych (testy wielodniowe i badanie MTT). Co więcej, substancja ta w niektórych dawkach ogranicza także powstawanie kolonii i wpływa na proliferację komórek (oznaczenie indeksu proliferacyjnego białka Ki67). Jeśli chodzi o właściwości przeciwbólowe, 3266 wykazuje lepszą (szybszą, bardziej natychmiastową i przy mniejszej dawce) odpowiedź analgetyczną niż morfina, co dobrze odzwierciedla wysze powinowactwo 3266 do receptorów MOR, a także dodatkowy mechanizm przeciwbólowy przez antagonizm receptora NK1.

Zwizdek 3020 (wg założenia: agonista DOR/antagonista NK1) wykazuje dość silne działanie cytotoksyczne na badanych liniach nowotworowych, a także ogranicza tworzenie kolonii i proliferację komórek. Działanie to jest jednak mniej selektywne wobec komórek prawidłowych niż w przypadku opisywanego powyżej związku 3266. Jeśli chodzi o analgezyjność, hybryda 3020 daje wyraźnie gorszy (jeśli chodzi o szybkość odpowiedzi, jej natychmiastowność i zależność od dawki) efekt przeciwbólowy niż morfina. Wynika to z niskiego powinowactwa do receptorów opioidowych MOR – 3020 wiąże się do silnie z receptorem DOR, natomiast ma bardzo słabe powinowactwo do MOR. Niestety – wbrew założeniom projektowym – okazało się, że związek ten również wiąże się słabo z receptorem NK1.

Podobnie rozbieżności w wiązalności receptorowej między założeniami a stanem faktycznym zaobserwowano w przypadku **związku 3052** (wg założenia: agonista opioidowy/antagonista NK1). Substancja ta wiąże się słabo zarówno do receptorów opioidowych jak i NK1. Mimo tego, hybryda 3052 wykazuje działanie cytotoksyczne (zarówno do komórek nowotworowych jak i prawidłowych) a także obniża proliferację komórek nowotworowych.

W przypadku **związku 3051** (agonista opioidowy/agonista NK1) obserwuje się słabe działanie cytotoksyczne (nieselektywne) lub jego brak (zależnie od dawek i badanych linii komórkowych). Substancja ta nie wpływa również na zdolność do tworzenia kolonii.

Peptydowy antagonist receptor NK1 – **związek 2080** – wykazuje działanie cytotoksyczne na badane komórki czerniaka a także na komórki prawidłowe, choć w mniejszym stopniu niż na komórki nowotworowe. Omawiana substancja nie wpływa na zdolność do tworzenia kolonii.

Znacznie silniejszy cytotoksycznie w omawianych badaniach jest małoszczepkowy antagonist NK1 – **aprepitant** – który, zgodnie ze wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, wpływał na żywotność komórek nowotworowych i prawidłowych. Jednak jego działanie na badane w tej pracy linie komórkowe (nowotworowe jak i prawidłowe) było słabsze niż opisane w literaturze.

W omawianych badaniach, naturalny ligand receptora NK1 – **substancja P** – wykazywał mieszane działanie (niewielkie bądź brak wpływu) na komórki nowotworowe i prawidłowe, zależnie od dawek i badanych linii komórkowych.

Omówione wyniki pozwalają stwierdzić, że – ze względu na swoje właściwości cytotoksyczne i przeciwbólowe - związki hybrydowe 3020 i 3266 mogą być rozważane jako potencjalne substancje wyjściowe do poszukiwania leków przeciwbólowych w leczeniu nowotworów. Hybryda 3052 wykazuje właściwości cytotoksyczne, ale jej dalsze badania powinny skupić się na wyjaśnieniu mechanizmu tego działania. Aprepitant, zgodnie z danymi literaturowymi działa przeciwnowotworowo, ale – co wydaje się, nie zostało szerzej opisane - wpływa także hamująco na liczbę i żywotność komórek prawidłowych. W tym z punktu widzenia metodologii projektowania związków hybrydowych jest spostrzeżenie, że łączenie elementów strukturalnych, które jako pojedyncze czynniki wykazują silne powinowactwo do tego czy innego receptora, nie gwarantuje uzyskania związków o silnym powinowactwie do obu zamierzonych celów molekularnych.