

Tomasz Deptuła

Autoreferat

przedstawiający wyniki badań opisane w rozprawie doktorskiej

pod tytułem:

„WPŁYW PODSTAWNIKÓW POLIETEROWYCH
NA AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ KURKUMINY”

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

Zasadniczym celem mojej pracy było otrzymanie rozpuszczalnych w wodzie analogów kurkuminy z hydrofilowymi podstawnikami polieterowymi oraz zbadanie otrzymanych związków pod kątem aktywności cytotoksycznej względem komórek nowotworowych i prawidłowych, a także pod kątem występowania apoptozy i obecności białek pro- i antyapoptotycznych. Innym celem mojej pracy była synteza analogów kurkuminy o potencjalnych właściwościach mezogenicznych.

Kurkumina ton ależący do polifernoli roślinnych żółty barwnik wyizolowany z korzenia ostrzyżu długiego *Curcuma longa*.

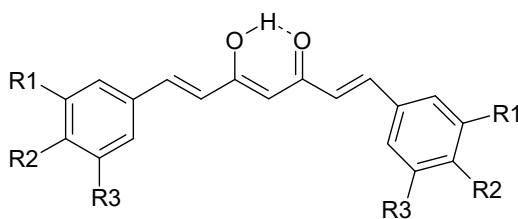
Kurkumina w komórce gromadzi się głównie w błonie komórkowej, choć w niektórych rodzajach komórek stwierdza się jej obecność także w obrębie jądra komórkowego [40].

Spośród znanych właściwości kurkuminy najważniejsze to aktywność przeciwnowotworowa (indukowanie apoptozy w komórkach nowotworowych, hamowanie przerzutoewania) i chemoprewencja: Dodatkowo kurkumina wykazuje działanie: działanie przeciwzapalne [6, 12-16], przeciwutleniające [4, 6, 16-18], immunosupresyjne [13, 16, 19], antymutagenne [20], neuroprotekcyjne, [5, 17, 21-23], solwatowanie toksycznych metali [5, 17, 22-24], oraz przeciwpięrowotniakowe .

Dodatkowym atutem kurkuminy jako związku o potencjalnym znaczeniu w medycynie jest jej nietoksyczność [13, 24, 25]

Wśród wad kurkuminy, które utrudniają jej wykorzystanie w terapii należy wymienić słabą rozpuszczalność w wodzie, a co za tym idzie niską biodostępność oraz szybki metabolizm w organizmie.

Celem mojej pracy było zaprojektowanie i synteza serii analogów kurkuminy możliwie dobrze rozpuszczalnych w wodzie oraz bardziej stabilnych w organizmie. Oba warunki wydawały się spełniać podstawniki polieterowe. Wzory otrzymanych hydrofilowych analogów kurkuminy zamieściłem na rysunku 1



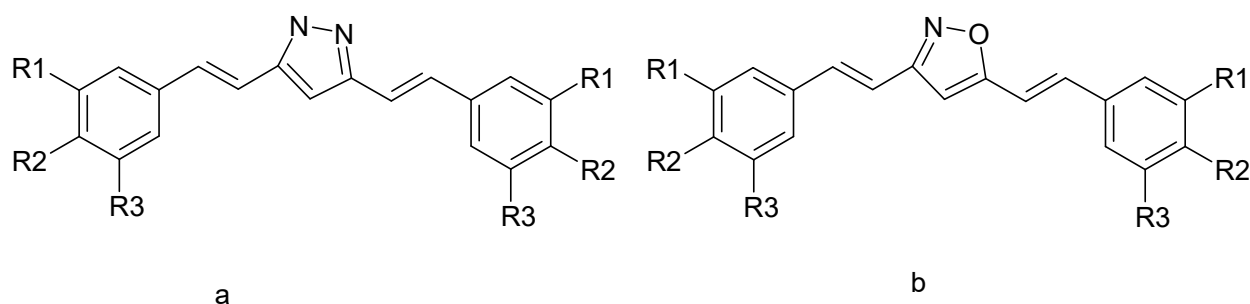
- Rysunek 1 Polieterowe analogi kurkuminy.

Związek	R1	R2	R3
kurkumina	CH ₃ O-	HO-	H-
Analog 1	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O-	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O-	H-
Analog 2	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O-	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O-	H-
Analog 3	CH ₃ O-	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O-	H-
Analog 4	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O-	CH ₃ O-	H-
Analog 5	H-	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O-	H-
Analog 6	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O-	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O-	CH ₃ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O-

Wszystkie otrzymane przez związki nie były dotychczas opisywane w literaturze. W niniejszej pracy została zastosowana metoda opracowana przez Pabona [124]. Pochodne aldehydów zostały zsyntetyzowane metodą Wiliamsona, i metodą Vilsmeiera-Haacka. Zostały też zbadane potencjalne właściwości ciekłokrystaliczne otrzymanych analogów kurkuminy.

W związku z tym, że żaden z otrzymanych polieterowych analogów kurkuminy z zachowaniem układu β-diketonowego nie wykazywał właściwości ciekłokrystalicznych, celem otrzymania mezogenicznych analogów kurkuminy otrzymywałem odpowiednie ich pochodne pirazolowe i izoksazolowe z podstawnikami alkoksyłowymi. Wzory otrzymanych analogów przedstawia rysunek 2.

Struktury otrzymanych związków udowodniono za pomocą widma NMR oraz analizy elementarnej.



R1= H; OH; OAlk

R2= H; OH; OAlk

R3= H; OH; OAlk

Rysunek 2. Analogi kurkuminy: pochodna pirazolu (a) oraz izoksazolu (b.).

Badania aktywności cytotoksycznej związków wykonałem przy użyciu testu EZ4U, na linii limfocytarnej prawidłowej (GMM14467) i nowotworowej (HL60). Moje badania potwierdziły, opisywaną w literaturze, istotną rolę grupy metoksylowej dla aktywności cytotoksycznej [12, 127, 137]. Największą

aktywność wykazywał związek, w którym grupa metoksylowa w tym samym miejscu co w kurkuminie została zachowana (analog 3). Kryterium wyboru spośród nowych analogów związków bardziej aktywnych od kurkuminy stanowiły: niższa w stosunku do związku referencyjnego wartość IC₅₀ oraz współczynnik oporności RF (IC₅₀ GM14467//IC₅₀ HL60) > 1

Po analizie wyników zamieszczonych w tabeli 1, można stwierdzić, że obu warunków nie spełnił żaden z badanych analogów. Na podstawie uzyskanych wyników w tej części pracy, można wskazać dwa związki wyróżniające się spełnieniem przynajmniej pojedynczych z dwóch wymienionych wyżej warunków, tj. analog 3, o istotnie większej w porównaniu do kurkuminy aktywności cytotoksyczności względem komórek białaczki i analog 6, którego RF wyniósł ok. 1,8 (IC₅₀.GM14467 > 50 μM). Do dalszych badań nad aktywnością biologiczną wybraliśmy analog 3, aby prześledzić porównawczo potencjalne mechanizmy zwiększonej w stosunku do kurkuminy aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych.

W oparciu o przeprowadzone badania można wskazać kierunki dalszych prac nad modyfikacjami cząsteczki kurkuminy, aby uzyskać związek bardziej od niej cytotoksyczny i zarazem selektywny względem komórek nowotworowych. Najbardziej odpowiednimi związkami bazowymi do dalszych modyfikacji struktury wydają się analog 3 (wykazujący największą aktywność cytotoksyczną) i analog 6 (największa selektywność w stosunku do komórek nowotworowych). tj. wprowadzenia formy pierścieniowej podstawników polieterowych, z ukierunkowaniem na podstawnik 3,6-dioksoheptylowy (selektywność działania) i pozostawienie grupy metoksylowej w pozycji meta-, (stosunkowo wysoka aktywność cytotoksyczna).

Nazwa/numer analogu	GM14667 IC ₅₀ ± SD [μM]	HL60 IC ₅₀ ± SD [μM]
Kurkumina	28 ± 4	24 ± 1
1	32 ± 9	> 50
2	12 ± 1	> 50
3	9 ± 1	15 ± 2
4	29 ± 8	26 ± 2
5	> 50	> 50
6	> 50	28 ± 0
7	40 ± 1	> 50

Tabela nr.1 Wyznaczone wartości IC₅₀ dla kurkuminy i jej analogów

Do badania morfologicznych oznak apoptozy wykorzystałem metodę mikroskopową z użyciem barwnika fluorescencyjnego DAPI. Na podstawie obserwacji mikroskopowych, morfologiczne cechy apoptozy zanotowałem jedynie w hodowlach komórek GM 14467 poddawanych działaniu kurkuminy lub analogu 3 w stężeniach równych właściwym wartościom IC₅₀.

W niniejszej pracy oceniałem stężenie trzech białek apoptotycznych, tj.: antyapoptotycznych BCL-2 i surwiwiny i proapoptotycznego białka BAX. Analiza Western blot wykazała obecność

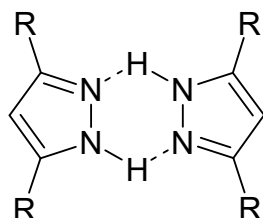
wszystkich trzech białek w komórkach GM14467, z największym stężeniem białka BCL-2. Komórki białaczkowe HL60 charakteryzowała w tym zakresie jedynie obecność i znaczne stężenie białka BCL-2 (Fot. 12).

Kurkumina w komórkach GM14467 w stężeniu równym IC_{50} , wyraźnie indukowała pojawienie się białek, BCL-2 i BAX, Odmienny profil stężeń wspomnianych białek ukształtował się pod wpływem analogu 3. Stężenie analogu 3 związku równe $\frac{1}{2} IC_{50}$ jako jedyne okazało się efektywne w indukcji BAX, BCL-2 i surwiwiny. Stężenie związku równe IC_{50} powodowało jedynie niewielki wzrost stężenia antyapoptotycznego białka BCL-2.

W przypadku komórek HL60 nie zaobserwowałem wyraźnych zmian ekspresji badanych białek ani pod wpływem kurkuminy, ani analogu 3.

Właściwości ciekłokrystaliczne oznaczałem za pomocą mikroskopu polaryzacyjnego, kalorymetru różnicowego oraz rentgenografu.. Sekwencje fazowe otrzymanych związków przedstawia poniższa tabela nr 2. Wzory strukturalne otrzymanych analogów znajdują się na Rysunku 2.

Niezależnie od obecności czy braku łącznika winylowego pochodne pirazolowe wykazują szerszy zakres faz smektycznych niż pochodne izoksazolowe. Może mieć to związek z możliwością tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych przez cząsteczki pirazolu, co prowadzi do dimeryzacji. Tworzenie takich wiązań sprzyja uporządkowaniu środków ciężkości molekuł. Nie ma natomiast wpływu na trwałość faz kolumnowych analogów posiadających po trzy łańcuchy oktyloksylowe w pierścieniach aromatycznych.



Rysunek 10 Dimery pirazolowe

Powyższe wyniki pozwalają zaproponować dalsze kierunki badań nad ciekłokrystalicznymi analogami kurkuminy. Jednym z nich byłoby sprawdzenie czy wydłużenie grup mostkowych o kolejne fragmenty winylowe spowoduje dalszą poprawę właściwości ciekłokrystalicznych analogów kurkuminy. Innym kierunkiem byłaby synteza i badanie tychże właściwości ich kompleksów z kationami metali.

Analog	Sekwencja fazowa
II-1	Cr126.0(9.1) SmC 222.5(0.5) SmA 230.9(4.4) I
II-4	Col _h 37.1(2.5) I
IV-1	Cr 123.1(38.1) SmC189.8(2.2) N 209.5(1.6) I
IV-4	Col _h 34.9(2.6) I

Tabela nr 2. Przejścia fazowe badanych związków, temperatura °C entalpia (w nawiasach) w kJ/mol, I oznacza faze izotropowa, SmA –smektyk A, SmC smektyk C, N- nematyk, Colh – fazę kolumnową heksagonalną, Cr – kryształ. Związki I-4 i III-4 są cieczeniami w temperaturze pokojowej.