

Autoreferat rozprawy doktorskiej

“Kompleksy platyny(II) z ligandami receptorów tachykininowych”

Promotor: Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

Cisplatyna, nieorganiczny kompleks platyny należy od wielu lat do najskuteczniejszych leków przeciwnowotworowych. Choć niezwykle skuteczny niestety nie posiada wymaganej selektywności i działa cytotoksycznie zarówno na komórki nowotworowe, jak i na komórki zdrowe powodując szereg efektów ubocznych, takich jak: nefrotoksyczność (uszkodzenie funkcji nerek), ototoksyczność (zaburzenia słuchu), zaburzenia gospodarki elektrolitowej, neurotoksyczność (uszkodzenie komórek nerwowych), nudności i wymioty oraz uszkodzenie komórek szpiku kostnego. Dlatego też cały czas trwają badania nad opracowaniem związków, które charakteryzowałyby się większą selektywnością w stosunku do komórek nowotworowych. Jedną z możliwości jest dołączenie do fragmentu mającego działanie przeciwnowotworowe drugiego fragmentu, który w większym stopniu kierowałby całą cząsteczkę do komórek nowotworowych (np. liganda receptorów, które są obecne na powierzchni tych komórek w większym stężeniu). Tak zaprojektowany związek posiadałby właściwości antyproliferacyjne i miałby kierunkowe działanie na komórki nowotworowe.

Przedstawiona praca doktorska prezentuje badania mające na celu zaproponowanie budowy oraz syntezy związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym przy jednoczesnym ukierunkowanym działaniu na komórki nowotworowe. Aby zaplanowane związki spełniały powyższe założenia musiały zawierać w swojej strukturze dwa fragmenty: fragment peptydowy będący ligandem receptorów tachykininowych występujących na błonach komórek nowotworowych w większym stężeniu w porównaniu do komórek zdrowych (farmakofor tachykininowy, wektor) i fragment kompleksujący jony platyny(II) (toksykofor). Dzięki takiej budowie możliwe jest uzyskanie działania przeciwnowotworowego przy jednoczesnym ukierunkowanym działaniu na komórki nowotworowe.

Z przeprowadzonych do tej pory badań dotyczących wymagań strukturalnych ligandów receptorów tachykininowych wynika, że aby peptyd mógł wykazywać taką aktywność powinien posiadać na C-końcu ugrupowanie amidowe oraz przynajmniej dwa

aminokwasy o aromatycznych grupach bocznych takich jak fenyloalanina, tryptofan czy histydyna. Aby cała cząsteczka peptydu zachowała powinowactwo do receptorów tachykininowych (ważny C-koniec peptydu) to fragment kompleksujący (toksykofor) jony platyny(II) musiał znajdować się na jego N-końcu. Jako fragment kompleksujący platynę wykorzystano aminokwasy posiadające atomy będące donorami elektronów do utworzenia wiązań koordynacyjnych z jonem platyny(II). Takie właściwości posiada histydyna, metionina, tyrozyna, seryna i kwas glutaminowy. Sekwencje aminokwasowe projektowanych ligandów peptydowych dobierano na podstawie opisanych w literaturze sekwencji antagonistów receptorów tachykininowych.

Część eksperymentalna projektu obejmująca syntezę kompleksów platyny(II) z ligandami receptorów tachykininowych została przeprowadzona w ramach dwóch głównych etapów syntetycznych. Pierwszy z nich obejmował syntezę peptydowych analogów receptorów tachykininowych na nośniku polimerowym z wykorzystaniem techniki SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis). Następnie otrzymane peptydy poddawano reakcji kompleksowania z solą platyny(II) na dwa sposoby - po uprzednim odłączeniu peptydu od żywicy polimerowej bądź kompleksowanie peptydu na nośniku polimerowym. Z uwagi na fakt niskiej rozpuszczalności kompleksów platyny(II) z peptydami w wodzie zaplanowano wprowadzenie takiej modyfikacji struktur kompleksów aby polepszyć ich hydrofilowy charakter. W tym celu wykorzystano cząsteczki cukru - glukozy, które w wyniku reakcji Maillarda wprowadzono do struktury peptydu poprzez grupę ϵ -aminową lizyny. Otrzymywane związki kompleksowe analizowano metodami spektroskopowymi. Eksperymenty te obejmowały rejestrację widm magnetycznego rezonansu jądrowego oraz analizę z wykorzystaniem spektrometru mas. Analiza widm ^{195}Pt NMR zmierzonych dla trzech peptydowych kompleksów platyny(II) potwierdziła monojądrowy charakter kompleksów platyny(II). Dodatkowo interpretacja zarejestrowanego dla jednego z kompleksów widma 2D ^1H NMR pozwoliła na określenie miejsca wiązania atomu platyny do peptydu. Również analiza otrzymanych z eksperymentów spektrometrii mas widm fragmentacyjnych dostarczyła informacji o prawdopodobnych miejscach wiązania atomu platyny do peptydów. Innym etapem pracy eksperymentalnej była synteza radioliganda receptorów tachykininowych o sekwencji H-Lys-Phe(^3H)-Phe(^3H)-Gly-Leu-Met-NH₂, który mógłby być wykorzystany do przeprowadzenia badań wiązania do receptorów otrzymywanych związków kompleksowych platyny zawierających wektor tachykininowy. Reakcję trytowania peptydowego prekursora zawierającego labilne atomy jodu ulegające substytucji na atomy trytu przeprowadzono w laboratorium peptydowym w Biological Research Center Węgierskiej Akademii Nauk w Szeged w grupie badawczej profesora Gezy Toth. Otrzymany znakowany ligand peptydowy został następnie dokładnie przebadany pod kątem powinowactwa do receptorów tachykininowych. Wyniki jakie otrzymano potwierdziły

zakładaną aktywność i powinowactwo do receptorów tachykininowych, jednakże charakter wiązania okazał się na tyle mało specyficzny, że wykorzystanie tego związku do badań powinowactwa otrzymywanych peptydowych kompleksów platyny(II) do receptorów tachykininowych było niemożliwe.

Spośród uzyskanych kompleksów platyny(II) z peptydami wybrano kilka związków o czystości pozwalającej na przeprowadzenie badań mających na celu weryfikację aktywności antyproliferacyjnej. Badania te przeprowadzono w Zakładzie Neuropeptydów IMDiK PAN, w grupie badawczej profesora Andrzeja Lipkowskiego. Pierwsze próby przeprowadzono z użyciem kompleksów platyny(II) słabo rozpuszczalnych w wodzie a jako medium użyto mieszaniny woda/DMF co uniemożliwiło uzyskanie odpowiednio wysokich stężeń badanych związków. Wyniki badań komórkowych z użyciem rozcieńczonych roztworów wskazały, że badane związki nie wykazują aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek linii SEGA (komórki nowotworowe gwiazdziaka podwyściółkowego olbrzymiokomórkowego). Dalsze badania komórkowe przeprowadzono po otrzymaniu kompleksów platyny(II) o zdecydowanie lepszej rozpuszczalności w wodzie z tym, że do badań wykorzystano linię komórkową komórek glejaka T986. Niestety i w tym przypadku zaobserwowano tylko nieznaczne zmniejszenie liczby komórek nowotworowych w obecności badanych związków czego przyczyną może być zbyt silne wiązanie platyny(II) do struktury peptydu uniemożliwiający hydrolizę cytotoksycznego fragmentu a tym samym jego destrukcyjne działanie na komórkowe DNA.

Pomimo tego, iż dla otrzymanych związków nie udało się wykazać działania przeciwnowotworowego, co było głównie spowodowane bardzo słabą rozpuszczalnością otrzymanych peptydowych kompleksów platyny(II) to mam nadzieję, że przedstawione w ramach zrealizowanej pracy doktorskiej wyniki badań powiększyły zasób wiedzy o możliwości wykorzystania neuropeptydów do tworzenia kompleksów platyny(II) pod kątem badań nad zwalczaniem chorób nowotworowych.