

Mgr Arkadiusz Marek Czerwonka  
Zakład Wirusologii i Immunologii,  
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii,  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Lublin, 10.04.2015

## **Ocena aktywności przeciwnowotworowej wybranych pochodnych 1,3-tiazyn w komórkowym modelu raka jelita grubego**

**(Evaluation of anticancer activity of selected 1,3-thiazine  
derivatives in colon carcinoma cell culture model)**

### **STRESZCZENIE**

Pomimo intensywnego rozwoju medycyny i nauk pokrewnych choroby nowotworowe stanowią jeden z największych problemów krajów rozwiniętych. Według szacunków w skali globalnej rak jelita grubego zajmuje obecnie trzecie miejsce pod względem występowania i czwarte pod względem śmiertelności. Również w Polsce nowotwór ten stanowi poważny problem ekonomiczno-społeczny zajmując drugie miejsce pod względem częstości występowania jak i śmiertelności. Obecnie stosowane metody terapii pozostają nie w pełni satysfakcjonujące, co odzwierciedla wskaźnik 5-letniego przeżycia na poziomie 35%, będąc tym samym jednym z najniższych w krajach Unii Europejskiej. Rozwój raka jelita grubego od pojawienia się guza do wystąpienia objawów klinicznych może trwać od kilku do kilkudziesięciu lat. U podstaw progresji tego nowotworu leżą zarówno zmiany na poziomie genetycznym, epigenetycznym jak i obecność pewnych czynników pozagenetycznych wpływających na zachwianie homeostazy w jelicie grubym. Doprowadza to do zaburzeń wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalnych i utraty kontroli komórek nad takimi procesami jak proliferacja czy apoptoza. Należy pamiętać, że w przypadku raka jelita grubego stosowanie chemoprewencji, wczesna diagnoza, interwencja chirurgiczna jak i chemioterapia może doprowadzić do całkowitego wyleczenia lub spowolnić rozwój choroby. Zależy to jednak w dużej mierze od stopnia zaawansowania zmiany nowotworowej jak i indywidualnych cech pacjenta. W przypadku wykrycia raka jelita grubego

najczęstszą formą terapii obok interwencji chirurgicznej pozostaje chemioterapia. Powszechnie stosowanymi lekami pozostają oksaliplatyna, 5-fluorouracyl, leukoworyna czy irinotekan. Jednak w dalszym ciągu prowadzone są badania nad poszukiwaniem nowych chemoterapeutyków, mogących stanowić kolejne narzędzie do walki z rakiem jelita grubego.

Interesującą grupą związków o potencjale cytostatycznym stanowią pochodne 1,3-tiazyny. Różnorodne pochodne w badaniach *in vitro* wykazują dużą skuteczność przeciwbakteryjną (zarówno wobec G+, G-, jak i *Mycobacterium*), przeciwgrzybiczną, owadobójczą i przeciwwirusową. Charakteryzują się również zdolnością do oddziaływania z kilkoma celami molekularnymi.

W związku z szerokim spektrum aktywności biologicznej 1,3-tiazyn, celem pracy była ocena właściwości przeciwnowotworowych nowo zsyntetyzowanych pochodnych oraz określenie molekularnego mechanizmu działania w komórkach raka jelita grubego, substancji o największym potencjale przeciwnowotworowym. Badane związki z grupy 1,3-tiazyn charakteryzują się unikalną strukturą. Posiadają one cykliczne ugrupowania ketonowe lub podstawniki chlorowcowe mogące oddziaływać z potencjalnym celem molekularnym oraz są zaopatrzone w odpowiednio modyfikowany podstawnik rezorcynolowy, który stanowi korzystny dla właściwości farmakologicznych element budowy cząsteczki.

W pierwszym etapie badań dokonano wyboru substancji o największym potencjale przeciwnowotworowym poprzez ocenę aktywności cytotoksycznej w komórkach prawidłowych, reprezentowanych przez model ludzkiego prawidłowego nabłonka jelita grubego (linia CCD 841 CoTr) testem wychwytu czerwieni obojętnej (NR) i aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Przeprowadzono również ocenę zdolności do hamowania proliferacji modelowych komórek nowotworowych ludzkiego raka jelita grubego (linii LS180 i HT-29), testem wykorzystującym aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (MTT) oraz inkorporacji analogu tymindyny do nowo syntezowanego DNA (BrdU). Analizie poddano sześć pochodnych 1,3-tiazyny, (oznaczonych numerami: 611, 677, 976, 1005, 1135, 1156). W kolejnym etapie badań przeprowadzono ocenę wpływu wybranej pochodnej (1135) na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych poprzez określenie poziomu mono- i oligonukleosomów komercyjnie dostępnym testem Cell Death Detection ELISA oraz barwienie różnicujące z wykorzystaniem mieszaniny jodku propidynowego i Hoechst 33342.

Zmiany morfologii komórek pod wpływem substancji 1135 określono przy pomocy barwienia May-Grünwalda – Giemzy. Natomiast zdolność badanej pochodnej do modulacji przebiegu cyklu komórkowego, przebadano z użyciem cytometrii przepływowej. Bezpośredni wpływ pochodnej 1135 na ekspresję białek w komórkach nowotworowych związanych z regulacją cyklu komórkowego, apoptozą i wewnątrzkomórkowymi szlakami sygnałnymi określono przy pomocy techniki Western Blotting.

Wstępne badania wykazały, że wszystkie badane pochodne charakteryzowały się aktywnością przeciwaproliferacyjną. Znaczącą aktywność do hamowania podziałów komórek linii nowotworowej HT-29 wykazywały pochodne 976, 1156 i 1135, a wobec linii LS180, 1135 i 1156. Ocena cytotoksyczności wobec prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego (CCD 841 CoTr) dla badanych stężeń pochodnych 1,3-tiazyn wykazała brak efektu uszkodzenia błon komórkowych w przypadku pochodnych 976 i 1135. Niska toksyczność wobec komórek była charakterystyczna dla pochodnych 677 i 1156, natomiast wysoką cytotoksycznością charakteryzowały się substancje 1005 i 611.

Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano substancję oznaczoną symbolem 1135 (2-(2,4-dihydroksyfenyl)-4H-benzofuro[3,2-d][1,3]tiazyn-4-on), która charakteryzowała się najwyższym potencjałem antyproliferacyjnym wobec komórek nowotworowych oraz brakiem toksyczności wobec komórek prawidłowych. Dalsze badania wykazały, że pochodna 1135 w badanych stężeniach nie wpływała na morfologię komórek oraz nie indukowała apoptozy i nekrozy w komórkach raka jelita grubego. Potwierdziły to zarówno zdjęcia uzyskane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego jak i test ELISA. Wyniki uzyskane w badaniu z użyciem cytometru przepływowego wykazały, że w sposób dawko zależny substancja 1135 doprowadzała do akumulacji komórek LS180 w fazie G<sub>1</sub> cyklu (do 13,28% w porównaniu z kontrolą). W komórkach linii HT-29, 1135 przy stężeniu 25 μM powodowała akumulację komórek w fazie G<sub>1</sub>, natomiast zastosowanie wyższych stężeń (75 μM) doprowadzało do akumulacji komórek w fazie G<sub>2</sub>-M. Analiza ekspresji białek w komórkach linii LS180 poddanych działaniu substancji 1135 wykazała dawko zależny wzrost ekspresji białka p27 oraz spadek ekspresji kinazy CDK4, cyklin B, A oraz fosforylacji białka Rb. Odzwierciedla to molekularne podstawy zatrzymania komórek w fazie G<sub>1</sub>

cyklu. W komórkach HT-29 dochodziło do spadku fosforylacji kinazy Akt i wzrostu ekspresji cykliny A2 po ekspozycji na substancję 1135.

Uzyskane wyniki dowodzą przeciwnowotworowego potencjału badanych pochodnych 1,3-tiazyn ze szczególnym uwzględnieniem substancji 1135 wobec komórek raka jelita grubego. W celu potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa stosowania niezbędne są jednak dalsze badania z uwzględnieniem zwierząt laboratoryjnych.

Mgr Arkadiusz Marek Czerwonka