

ROZPRAWA DOKTORSKA – STRESZCZENIE

Lek. wet. Tomasz Gębarowski

„Mechanizmy działania przeciwnowotworowego nowych pochodnych oliwacyny”

Wstęp: Oliwacyna należy do alkaloidów zawierających układ pirydokarbazolu. Alkaloid ten został wyizolowany z kory i pędów drzewa *Aspidosperma olivaceum* Müll. Arg. Ze względu na obiecujący efekt przeciwnowotworowy dalsze prace chemiczne doprowadziły do syntezy pochodnych, półsyntetycznych i w pełni syntetycznych pirydokarbazoli – analogów oliwacyny.

Cel pracy: Celem pracy była ocena aktywności przeciwnowotworowej nowych pochodnych oliwacyny, porównanie ich działania cytotoksycznego dla komórek linii nowotworowych i komórek prawidłowych oraz próby poznania mechanizmów działania pirydokarbazoli na hodowle komórek ludzkich linii nowotworowych.

Materiał i metody: ocenę aktywności przeciwnowotworowej pochodnych oliwacyny prowadziłem w hodowlach 10 linii nowotworów ludzkich, oraz 2 linii mysich: prawidłowych fibroblastów i włókniakomięsa.

W badaniach wstępnych oceniłem aktywność przeciwnowotworową 14 analogów oliwacyny syntetyzowanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu i do dalszych badań wybrałem 4 analogi o najsilniejszym działaniu na komórki ludzkich linii nowotworowych.

W pracy zastosowałem następujące metody badawcze: a) ocena mikroskopowa liczebności komórek martwych (barwienie błękitem trypanu), b) analiza częstości apoptozy (mikroskopia fluorescencyjna, barwienie komórek: aneksynaV-FITC–jodek propidyny) c) wpływ na proliferację (mikroskopowe wyznaczanie indeksu mitotycznego) i analiza cyklu komórkowego (cytofotometria przepływowa z zastosowaniem przeciwciał anti-BrdUrd), d) ocena liczebności pęknięć nici DNA (test kometkowy), e) analiza bezpośrednich oddziaływań badanych związków z DNA (metoda polarografii), f) ocena ekspresji białek p53 i p21 (metodą Elisa), g) wpływu na funkcję transportową glikoproteiny P (miskrospektrofluorymetryczny pomiar gromadzenia w komórkach rodaminy -123), h) ocena spektrofotometryczna witalności komórek (test MTT) i proliferacji (test SRB). Jako kontrolę pozytywną zastosowałem standardowy cytotatyk – doksorubicynę, a kontrolę odniesienia stanowiły hodowle zawierające dostępny naturalny izomer oliwacyny – eliptycynę.

Wyniki: Pomiary polarograficzne pokazały, że badane pirydokarbazole bezpośrednio oddziałują z DNA czego dowodem były zmiany w przebiegu krzywych redukcji DNA na kroplowej elektrodzie rtęciowej.

Badania porównawcze cytotoksyczności dla komórek prawidłowych (fibroblasty mysie 3T3 BALB) i linii nowotworowych o tym samym pochodzeniu tkankowym (mysi włókniakomięsak, fibrosarcoma WEHI 164) ujawniły relatywnie małą toksyczność badanych pirydokarbazoli dla komórek prawidłowych i silny efekt cytotoksyczny na komórki nowotworowe. Największe różnice efektu cytotoksycznego okazywał zw. nr 7, który wielokrotnie silniej działał na linię nowotworową WEHI 164 niż na linię prawidłowych fibroblastów mysich 3T3 BALB.

W hodowlach w obecności zw. nr 6, 10 i 13 w teście kometkowym (pH 13,0; 4°C) stwierdziłem wzrost liczby pęknięć jednoniciowych DNA, natomiast w hodowlach ze zw. nr 7 (w stężeniach do 10 μ M). nie obserwowałem istotnego wzrostu liczby pęknięć jednoniciowych DNA komórek w porównaniu do kontroli (eliptycyna).

W teście kometkowym porównałem także ilości uszkodzeń nici DNA wywoływanych przez standardowy inhibitor topoizomerazy II – etopozyd, który był dodawany do hodowli komórek nowotworowych przed lub po dodaniu wybranych pirydokarbazoli: zw. nr 7 i 13. W obu sekwencjach dodawania etopozydu i badanych pirydokarbazoli do hodowli ilość powstających uszkodzeń DNA była niższa od sumy arytmetycznej uszkodzeń stwierdzonych po dodaniu tych związków do osobnych hodowli. Wskazuje to, że zarówno badane pirydokarbazole, jak i etopozyd w podobny sposób działają (wiążą się) z kompleksem DNA – topo II i konkurują ze sobą o miejsca wiązania z rozczalnym kompleksem DNA-topo II.

W cytometrii przepływowej z zastosowaniem przeciwciał anti-BrdUrd stwierdziłem, że badane związki silnie hamowały cykl komórkowy w fazie G2+M i, w mniejszym stopniu, także w fazie G0+G1; wyjątkiem były hodowle komórek MCF7, w których zw. nr 7 silniej hamował cykl generacyjny w fazie G0+G1.

Badania wpływu pirydokarbazoli na ekspresję białka p53 w komórkach linii CCRF/CEM (zawiera zmutowany gen *TP53*) i linii A549 (posiada niezmutowany, tzw. wild type *TP53*) ujawniły znaczny wzrost ilości p53 w każdej z dwóch badanych linii; największy wzrost ekspresji p53 stwierdziłem po inkubacji ze zw. nr 7.

Porównałem aktywność trzech badanych pochodnych oliwacyny w zakresie wpływu na wybrane efekty przeciwnowotworowe regulowane przez białko p53:

ekspresję białka p21^{WAF1/CIP1}, indukcję apoptozy i zahamowanie funkcji transportowej białka P_{gp} w dwóch liniach nowotworowych CCRF/CEM (zawiera mutp53) i A549 (zawiera wtp53). Wyniki analizy wielokryterialnej pokazały, że porównywane pirydokarbazole rekonstruowały funkcje przeciwnowotworowe białka p53 w hodowlach zawierających mutp53, a zw. nr 10 znacząco nasilał zarówno funkcje przeciwnowotworowe w komórkach zawierających mutp53 (CCRF/CEM) jak i w komórkach posiadających niezmutowany wtp53 (A549).

Cechą wyznaczającą kliniczną przydatność preparatów przeciwnowotworowych jest ich efekt cytotoksyczny i hamujący proliferację komórek nowotworowych, niezależnie od mechanizmów prowadzących do tego efektu. W pracy porównałem wpływ badanych pochodnych oliwacyny na żywotność i proliferację komórek różnych linii nowotworowych, w tym wykazujących wielolekową oporność na cytostatyki. W testach redukcji MTT i w teście SRB największy efekt przeciwnowotworowy wykazywały zw. nr. 7 i 10.

W podsumowaniu: badane pirydokarbazole okazywały niską cytotoxiczność w hodowlach komórek prawidłowych (referencyjna linia fibroblastów mysich: 3T3 BALB), natomiast znacząco zwiększały odsetek komórek martwych i okazujących cechy apoptozy w hodowlach linii nowotworowych. Zidentyfikowane w pracy mechanizmy działania na hodowle ludzkich linii nowotworowych są to: interkalacja do DNA, stabilizacja kompleksu DNA/topo II, rekonstytucja funkcji przeciwnowotworowych mutp53 i nasilenie funkcji wtp53, oraz hamowanie aktywności transportowej Pgp. Efekty działania przeciwnowotworowego były najsilniej wyrażone w przypadku zw. nr 7 i 10. Te dwie pochodne oliwacyny zostały wybrane do dalszych badań jako potencjalni kandydaci na przyszłe leki przeciwnowotworowe.

DISSERTATION – ABSTRACT

Vet. Tomasz Gębarowski

"Mechanisms of anticancer activity of new olivacine derivatives"

Introduction: Olivacine belongs to alkaloids containing the pyridocarbazole system and has been isolated from the bark and shoots of the tree *Aspidosperma olivaceum* Müll. Arg. Due to the promising anticancer effect, numerous chemical works have led to the synthesis of new derivatives, both semi-synthetic and fully synthetic pyridocarbazoles - olivacine analogs.

Aim: The aim of this work was to evaluate the antitumor activity of new olivacine derivatives, to compare their cytotoxic effects on tumor cell lines and normal cells and to learn the mechanism of antineoplastic action of the studied pyridocarbazoles on human tumor cell lines.

Material and methods: Evaluation of antitumor activity was carried out on cultures of ten human tumor lines and on two murine cell lines: normal fibroblasts and fibrosarcoma cell line.

The initial screening tests compared the antitumor activity of fourteen olivine analogues synthesized in the Department of Organic Chemistry at Wrocław Medical University and four analogues which exhibited the strongest anti-tumor activity were selected for further research.

The following research methods were used in this work: a) analysis of the frequency of apoptosis (fluorescence microscopy, annexin V-FITC / propidium iodide staining), b) microscopic assessment of dead cell numbers (trypan blue technique) c) microscopic determination of mitotic index and analysis of cell cycle (flow cytometry with anti-BrdUrd antibodies), d) evaluation of the number of DNA strand breaks in the comet assay, e) analysis of direct interactions of tested compounds with DNA (polarography method), f) evaluation of expression of p53 and p21 proteins (Elisa test), g) effect on transport function of glycoprotein P (microspektrofluorimetric measurement of the accumulation rhodamine-123 in cancer cells), h) spectrophotometric evaluation of cancer cells vitality (MTT test) and proliferation (SRB test). As a positive control the standard cytostatic - doxorubicin was used, and the reference controls were cultures containing available natural olivacine isomer – ellipticine.

Results:

Polarographic measurements showed that tested pyridocarbazoles directly interacted with the DNA, as evidenced by changes in the DNA reduction curves on the mercury droplet electrode.

Comparative study of the cytotoxicity of the tested pyridocarbazole for normal cells (murine 3T3 BALB mouse fibroblasts) and tumor lines of the same tissue origin (murine fibrosarcoma, WEHI 164) revealed relatively low toxicity of tested compounds for normal cells and strong cytotoxic effect on tumor cells. The greatest differences in the toxic effect showed compound no 7, which repeatedly was more active on the WEHI 164 tumor line than the normal 3T3 BALB mouse fibroblast line.

The presence of comp. no. 6, 10, and 13 in cultured tumor cells lead to marked increase in the number of single-strand DNA breaks in a the comet assay (pH 13,0, 4⁰C), whereas comp. no. 7 (at concentrations up to 10 μ M). did not cause a significant elevation in the amount of cellular DNA strand breaks (as compared to the cultures without the presence of the tested compounds).

In the comet assay the amount of DNA damage caused by the standard topoisomerase II inhibitor – etoposide was evaluated. The etoposide was added to the tumor cell culture before or after the addition of selected pyridocarbazoles: comp. no. 7 and 13. In both sequences of addition of etoposide and pyridocarbazole to cell cultures, the resulting amount of DNA damage was lower than the sum of the arithmetic number of lesions found after the addition of these compounds to the individual selective culture. This indicates, that both, the pyridocarbazole and etoposide act by the same mechanism (binding to the complex of DNA II - topo II) and compete with each other for binding sites with the cleavable complex of DNA-topo II.

By means of flow cytometric method I found that the tested compounds strongly inhibited cancer cell proliferation in the G₂ + M phase and, to a lesser extent, also in the G₀ + G₁ phase, except for the MCF7 cells culture, in which compound 7 was more potent inhibitor of the G₀ + G₁ generation cycle.

Studies of the effect of pyridocarbazole on expression of p53 protein in CCRF/CEM cells (contain the mutant *TP53* gene) and A549 cells (possess not mutated, the so-called wild type *TP53*) revealed a significant increase in p53 protein content in each of the two lines tested. The increase of p53 protein expression was relatively greater after incubation of cells with comp. no.7.

Activity of three investigated olivacine derivatives on selected anti-cancer effects regulated by the p53 protein: expression of p21 protein, induction of apoptosis and suppression of transport function of the Pgp protein. was compared in two tumor lines: CCRF / CEM (contains mutp53) and A549 (possess wtp53) by means of the multicriterial analysis. The results of the analysis showed that the tested pyridocarbazoles reconstituted the antitumor activity of the p53 protein in mutp53. Additionally, comp. no. 10 significantly enhanced antitumor activity in both mutp53 (CCRF / CEM) and wtp53 (A549) cells.

A feature that determines the clinical utility of anticancer drugs is their cytotoxic effect and inhibition the proliferation of tumor cells, independently of the mechanisms leading to this effect. In this work the impact of olivacine derivatives on the viability and proliferation of various tumor cell lines, including multi-drug resistance to cytostatics was estimated with the MTT and SRB tests. The greatest antiproliferative and cytotoxic effects on cancer cells were exerted by comp. no. 7 and 10.

In summary: The studied pyridocarbazoles showed relatively low toxicity to normal normal cells (3T3 BALB mouse fibroblasts), however, significantly increased dead cells and apoptosis frequency in tumor cell line cultures. The mechanism of action of the tested pyridocarbazoles in human tumor lineage identified in this study include: intercalation to DNA, stabilization of the topo II / DNA complex, reconstitution of the mutp53 antitumor function, and enhancement of the wtp53 function as well as inhibition of P_{gp} transport activity. The effects of antineoplastic (antitumor) action were most visible in the case of the compounds 7 and 10. These two olivacine derivatives have been selected for further studies as prospective candidates for future anticancer drugs.