

Podstawy proponowanych badań. W ramach poszukiwań potencjalnych leków przeciwnowotworowych otrzymaliśmy w naszym laboratorium nową grupę związków o strukturze niesymetrycznych bisakrydyn (UAs). Wykazały one wysoką aktywność cytotoksyczną i przeciwnowotworową, szczególnie wobec eksperymentalnych nowotworów litych, jak nowotwory piersi i jelita grubego oraz rak trzustki. Aktualnie przedmiotem badań naszej grupy jest poznanie molekularnego mechanizmu działania tych związków. Wstępne wyniki wskazały, że UAs są słabo podatne na przemiany metaboliczne wobec enzymów metabolizujących leki, DMEs, z rodziny cytochromu P450 i UDP-glukuronylotransferazy, UGT. Wykazaliśmy również, że w odróżnieniu od wcześniej badanych pochodnych akrydyny, związki o strukturze dimeru nie interkalują do podwójnej nici DNA, chociaż w jakiś sposób z nią oddziałują.

Powyższe wyniki bardzo nas zaintrygowały, ponieważ nie spodziewaliśmy się, że przejście od struktury monomeru do dimeru nie tylko zachowa wysoką aktywność przeciwnowotworową, ale również da nowe, nieopisane dla monomerów właściwości fizykochemiczne i biologiczne. W planowaniu niniejszych badań wzięliśmy pod uwagę powyższe fakty, ale również dane literaturowe mówiące, że ekspresja enzymów metabolizujących z rodziny P450 i UGT, kontrolowana jest w komórce przez czynniki transkrypcyjne receptorów jądrowych takich jak receptor-X-pregnanu, PXR, konstytutywny receptor androstanu, CAR, i prawdopodobnie kilku innych. Co więcej, są doniesienia wskazujące, że aktywność receptorów jądrowych PXR i CAR może indukować śmierć komórek na drodze apoptozy. Zainteresowało nas również, co dzieje się z naszymi związkami po podaniu ich zwierzętom.

Hipoteza badawcza. Na powyższych podstawach postawiliśmy hipotezę, że wysoka aktywność przeciwnowotworowa UAs może wynikać z ich oddziaływań, z innymi niż podwójna helisa, formami DNA. Związki te mogą też mieć wpływ na procesy transkrypcji ważnych funkcjonalnie białek. Uwzględniamy też fakt iż receptory jądrowe prawdopodobnie mają zdolność modulacji ekspresji wybranych białek biorących udział w szeroko pojętej odpowiedzi komórkowej, np. apoptozie.

Proponowany zakres badań

Dla zweryfikowania powyższej hipotezy proponujemy realizację następujących zadań badawczych:

1. Określenie struktur 3D dla związków UAs w roztworach wodnych oraz opis molekularnych oddziaływań tych związków z G-kwadrupeksami z zastosowaniem zaawansowanych technik spektroskopii CD i dwuwymiarowego (2D) NMR.
2. Wpływ UAs na efekty transkrypcji. Określenie ważnych funkcjonalnie genów i szlaków (enzymów *P450*, *UGT* i receptorów jądrowych) poprzez badanie ekspresji miRNA-mRNA i metylacji DNA.
3. Określenie czy badane związki są substratami i/lub modulatorami pomp błonowych z rodziny transporterów ABC.
4. Metabolizm związków UAs w komórkach nowotworowych HepG2, LS180. Ich wpływ na modulację aktywności enzymatycznej w komórkach nowotworowych oraz na poziom ekspresji wybranych izoenzymów P450 i UGT. Wobec pozytywnych wyników w tym zakresie z punktu 2 dalsze badania ekspresji i poziomu białek wybranych receptorów jądrowych.
5. Zależność pomiędzy ekspresją receptorów jądrowych i białek zaangażowanych w progresję cyklu komórkowego i apoptozę w komórkach HepG2, LS180, H460 i DU-145, po ich inkubacji z badanymi związkami.
6. Kinetyka metabolitów dwóch wybranych związków UAs określona na podstawie ich analizy we krwi i moczu u myszy.

Metodyka badań. Dla realizacji powyższych zadań zastosujemy w pierwszym etapie, do badania oddziaływań leków z DNA i na poziomie transportu przez błony, bezkomórkowe układy eksperymentalne i wysoko zaawansowane metody instrumentalne. Przedmiotem dalszych badań będą wymienione powyżej linie komórek nowotworowych o wysokiej i normalnej ekspresji enzymów metabolizujących, których hodowlę od wielu lat prowadzimy w naszym laboratorium. Otrzymane po inkubacji ekstrakty komórkowe i pożywka z hodowli będą badane pod kątem zawartości metabolitów metodami HPLC. Wpływ leków na ekspresję enzymów P450 i UGT oraz na aktywność i ekspresję receptorów jądrowych, m.in. PXR i CAR analizowane będzie stosując procedury Western-blot oraz RT-PCR.

Znaczenie projektu. Proponowane badania poszerzą naszą wiedzę o mechanizmach molekularnych, które mogą być odpowiedzialne za wyjątkowe, wspomniane powyżej właściwości biologiczne nowych, silnie aktywnych pochodnych bisakrydyny, które zostały opatentowane (patenty EU and USA, US10,202349 B2, Feb.12, 2019). Badania również ujawnią właściwości farmakologiczne tych związków poszerzając wiedzę o ich metabolizmie i potencjalnym mechanizmie działania na poziomie komórkowym. Realizacja projektu wpłynie więc zarówno na rozwój farmakologii jak i biologii nowotworów, poprawiając w ten sposób warunki życia społeczeństwa i poziom cywilizacji.