

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Tytuł:

MAŁOCZĄSTECZKOWE INHIBITORY TYROZYNAZY - PROJEKTOWANIE ORAZ BADANIE ODDZIAŁYWAŃ Z ENZYMEM

Autor: mgr inż. Ewa Wolińska

Promotor: dr hab. Rafał Latajka, prof. PWr

Tyrozynaza (EC 1.14.18.1) jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w środowisku naturalnym, pełniącym u wszystkich organizmów wiele ważnych biologicznie funkcji. Jest kluczowym enzymem biosyntezy melanin, które odpowiedzialne są za kolor ludzkiej skóry, oczu i włosów. Melaniny stanowią barierę ochronną przed szkodliwym wpływem promieniowania UV i stresem oksydacyjnym, których efektem mogą być mutacje w komórkowym DNA oraz zapoczątkowanie procesu kancerogenezy. Uważa się, że promieniowanie UV jest głównym czynnikiem mającym wpływ na zapoczątkowanie rozwoju nowotworów skóry, takich jak m.in. czerniak. Zwiększona aktywność tyrozynazy przyczynia się do powstawania wielu schorzeń takich jak hiperpigmentacja czy melazma. Inhibitory tyrozynazy hamujące znajdują zastosowanie jako środki terapeutyczne w leczeniu schorzeń związanych z pigmentacją.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie nowych i wysoce aktywnych klas małowcząsteczkowych inhibitorów tyrozynazy z *Agaricus bisporus*, które mogłyby znaleźć zastosowanie w zapobieganiu i/lub leczeniu schorzeń spowodowanych nieprawidłową aktywnością tego enzymu, która objawia się zaburzeniami w pigmentacji skóry u ludzi.

Realizacja pracy doktorskiej składała się na kilka etapów: otrzymaniu preparatu enzymatycznego, zaprojektowaniu nowych klas silnych inhibitorów tyrozynazy, określeniu typu oraz mechanizmu hamowania aktywności enzymu przy użyciu metod spektrofotometrycznych, wyznaczeniu parametrów reakcji inhibicji badanych związków oraz porównaniu ich mocy w stosunku do znanego inhibitora tyrozynazy-kwasu kojowego, który został użyty jako kontrola pozytywna. Ostatnim etapem była próba wyjaśnienia korelacji zachodzącej między strukturą badanych związków, a ich aktywnością inhibicyjną w stosunku do tyrozynazy.

W ramach pracy przebadano łącznie 51, należących do 4 różnych grup związków. Związki 1-30 będące pochodnymi kromonu, kumaryny, pirydyny oraz 2-azanorbornanu wykazywały różny typ hamowania względem tyrozynazy

(konkurencyjny, konkurencyjny, mieszany). Nie udało się jednoznacznie określić zależności między strukturami cząsteczek a rodzajem inhibicji, jaki one wykazywały. Wszystkie związki charakteryzowały się odwracalnym mechanizmem inhibicji enzymu. Stałe inhibicji (K_I oraz K_{IS}) były na poziomie milimolowym.

Najliczniejszą grupę przebadanych związków (21-51) w tej pracy stanowiły arylowe pochodne tiosemikarbazonu. Zsyntezowano 30 pochodnych tiosemikarbazonowych, w strukturach których modyfikowano podstawniki R_1 i R_2 , a ugrupowanie tiosemikarbazydowe pozostało nietknięte. Zanalizowano związki pod względem ich zdolności inhibicyjnych w stosunku do tyrozynazy, przeprowadzono analizę SAR (z ang. *Structure Activity-Relationship*), oraz badania nad zahamowaniem procesu melanogenezy i proliferacji komórek B16. Badania doprowadziły do poznania nowego i bardzo silnego inhibitora aktywności tyrozynazy- związku 32, dla którego stała inhibicji K_I wyniosła $0,17\mu\text{M}$. Hamuje on całkowicie proces syntezy melanin, jednak charakteryzuje się również wysoką aktywnością cytotoksyczną w stosunku do żywych komórek i zapobiega ich proliferacji.

Pozostałe związki również okazały się być silnymi inhibitorami enzymu, ze stałymi inhibicji na poziomie mikromolowym. Arylowe pochodne tiosemikarbazonu wykazywały różny typ inhibicji względem tyrozynazy: konkurencyjny, konkurencyjny, mieszany i akonkurencyjny. Nie stwierdzono jednak bezpośredniej zależności między strukturą związku a typem hamowania jaki wywierał na aktywność enzymu. Wszystkie związki tiosemikarbazonowe charakteryzowały się odwracalnym mechanizmem inhibicji. Ogólnie można zauważyć, że tiosemikarbazony podstawione atomem halogenu w pierścieniu aromatycznym w pozycji *para*- i *meta*- silniej hamowały aktywność tyrozynazy w porównaniu do związków, w których atom halogenu znajdował się w pozycji *orto*-.

Umiarkowaną cytotoksycznością i wysokim stopniem zahamowania procesu melanogenezy charakteryzują się związki 22-26 oraz 36-45. Związki te mogą być brane pod uwagę w dalszych etapach prac z uwzględnieniem ich wykorzystania jako czynników biologicznie aktywnych w preparatach kosmetycznych i farmaceutycznych zapobiegających występowaniu i leczących zmiany spowodowane nieprawidłową melanizacją. Związki tiosemikarbazonowe charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną i właściwościami farmakologicznymi. Ze względu na nieskomplikowaną i nie generującą wysokich kosztów syntezę, tiosemikarbazony mogą stać się głównym celem w projektowaniu nowych, skutecznych inhibitorów tyrozynazy.