

Mateusz Psurski

Nowe formułacje naturalnych izotiocyjanianów o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej

Choroba nowotworowa obok chorób układu krążenia stanowi od wielu lat najpoważniejszą przyczynę zgonów na świecie. Pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się w onkologii klinicznej na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci skuteczną terapią przeciwnowotworową wciąż stanowi poważne wyzwanie dla lekarzy. Coraz poważniejszym problemem w przypadku terapii opartych o klasyczne chemoterapeutyki jest zjawisko lekooporności w znaczącym stopniu negatywnie wpływające na efekt końcowy zastosowanego schematu terapeutycznego.

Przez dziesięciolecia środowisko naturalne, a w szczególności rośliny, stanowiło źródło związków chemicznych wykazujących aktywność biologiczną i stanowiących wartościowe leki w terapii wielu schorzeń i chorób. Podobnie jest w onkologii klinicznej, w przypadku której badania nad związkami naturalnymi pozwoliły na odkrycie wielu skutecznych leków. Pomimo to, wciąż pozostaje wiele związków pochodzenia naturalnego mających ogromny potencjał jako leki przeciwnowotworowe.

Niewątpliwie do tego typu związków należą izotiocyjaniany, spożywane w codziennej diecie jako składniki roślin krzyżowych tj. kapusta, brokuły, brukselka i wiele innych. Jako związki o silnie elektrofilowym charakterze i wysokiej reaktywności, przechowywane są one w roślinach jako biologicznie nieaktywne glukozynolazy, których enzymatyczny rozpad prowadzi do powstania izotiocyjanianów. To właśnie ten proces biochemiczny odpowiedzialny jest za intensywny zapach i piekący smak roślin krzyżowych. Jak się okazało, izotiocyjaniany służące roślinom jako repelanty i związki grzybo- i bakteriobójcze wykazują również bardzo dobre właściwości antyproliferacyjne i przeciwnowotworowe, potwierdzone szeregiem badań zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Co istotne, związki te nie posiadają jednego *stricte* określonego celu molekularnego w komórkach. Ocenia się, że funkcje biologiczne co najmniej 30 białek są bezpośrednio modyfikowane w wyniku reakcji izotiocyjanianów z grupami tiolowymi cystein, a ich pierwszym celem molekularnym w komórkach jest najprawdopodobniej glutation zredukowany.

W chwili obecnej znanych jest około 120 glukozynolanów/izotiocyjanianów o zróżnicowanej strukturze chemicznej, jednakże jedynie kilka z tych związków poddanych zostało szeroko zakrojonym badaniom pod kątem mechanizmu działania oraz jego zależności od struktury chemicznej związku. Dlatego też, pierwszym etapem badań prowadzonych w ramach niniejszej

pracy była synteza dużego zestawu izotiocyanianów i poddanie ich ocenie pod kątem aktywności antyproliferacyjnej *in vitro* celem określenia zależności pomiędzy aktywnością biologiczną i strukturą chemiczną związku. Dla reprezentatywnych związków wykonano dalsze badania pod kątem mechanizmów aktywności antyproliferacyjnej (m.in. analizowano proces akumulacji izotiocyanianów w komórkach, poziom apoptozy, wpływ na cykl komórkowy i stres oksydacyjny, a także poziom glutationu zredukowanego) celem oceny, czy struktura chemiczna związku wpływa na jego mechanizm działania. Badania wykazały, że sama obecność grupy izotiocyanianowej w cząsteczce, nie gwarantuje wysokiej aktywności biologicznej. Okazało się, że obecność dodatkowej grupy funkcyjnej ma kluczowe znaczenia dla aktywności związków. Co zaskakujące, rodzaj tejże grupy ma znaczenia drugorzędne w kontekście obserwowanej aktywności antyproliferacyjnej. Wykazano jednakże, że grupa ta w istotny sposób wpływa na obserwowany mechanizm działania związków. Wyniki sugerują więc, że w przypadku izotiocyanianów możliwe jest modulowanie mechanizmu działania związku bez istotnego wpływu na poziom aktywności biologicznej.

W komórkach izotiocyaniany bardzo szybko reagują z obecnym w wysokich stężeniach glutationem, a następnie przekształcane są do tzw. kwasów merkapturowych (ditiokarbaminianów) w szlaku kwasów merkapturowych. Co interesujące, te pochodne izotiocyanianów również wykazują, aktywność biologiczną (jak pokazały badania w przypadku większości z nich porównywalną do wyjściowych izotiocyanianów) nie posiadając przy tym negatywnych cech izotiocyanianów jak np. intensywny zapach i możliwość podrażniania błon śluzowych. Co więcej, wykazano, że pochodne te wykazują niemal identyczne właściwości przeciwnowotworowe w badaniach *in vivo*. Dodatkowo, przeprowadzone badania pod kątem stabilności kwasów merkapturowych w obecności stresu oksydacyjnego (zjawisko często spotykanego w obrębie guzów nowotworowych) wykazały, że związki te mogą potencjalnie stanowić formę prolekową dla izotiocyanianów z wbudowanym prostym mechanizmem aktywacji w obrębie guza nowotworowego.

W ramach prowadzonych badań podjęto również próbę opracowania schematu terapeutycznego wykorzystującego izotiocyaniany jako czynnik uczulający komórki nowotworowe wykazujące oporność na antracykliny np. doksorubicynę. Badania *in vitro*, a także wstępne badania *in vivo* pokazały, że łączne zastosowanie izotiocyanianów i doksorubicyny pozwala na znaczące obniżenie dawki cytostatyku przy zachowaniu efektu terapeutycznego.

Mateusz Psurski

Novel formulations of naturally occurring isothiocyanates with potential anticancer activity

Cancer and cardiovascular diseases for many years are recognized as a major cause of deaths. Despite a tremendous progress in clinical oncology that took over last decades, effective anticancer therapy still remains elusive. In case of therapies based on classical chemotherapeutics phenomenon of multidrug-resistance arises as a major challenge decreasing efficiency of the applied therapy.

For decades natural environment (especially plants) was recognized as a rich source of chemical compounds with potential biological activity used as useful drugs against many diseases. Many of these compounds was also used with success in clinical oncology. Despite, still many compounds exhibiting biological activity awaits for being tested as anticancer drugs.

Undoubtedly, isothiocyanates – compounds found in cruciferous vegetables, an ingredient of our diet, can be included to these group. As a chemical entities exhibiting strong electrophilic character and high chemical reactivity, they are stored inside a plant cells as biologically inactive glucosinolates which, after enzymatically-driven decomposition, play a role of isothiocyanates source. These biochemical process is responsible for cruciferous vegetables intensive flavor and spicy taste. Intensive studies revealed that isothiocyanates, originally “designed” as repellants and fungicides, shows strong antiproliferative and anticancer properties, both in vitro and in vivo. Importantly, they have more than one molecular target. The biological functions of at least 30 proteins can be directly modified as a result of isothiocyanates reactions with cysteine residues. Isothiocyanate’s very first molecular target appears to be reduced glutathione.

For now, about 120 chemically diverse isothiocyanates/ glucosinolates was isolated from cruciferous vegetables. However, only several was a subject of biological studies and the analysis of structure-activity relationship. That is why the very first stage of the studies conducted during my PhD studies was the synthesis of a set of chemically diverse isothiocyanates and in vitro antiproliferative studies in order to analyze structure-activity relationship. For several, representative compounds further studies (e.g. isothiocyanates accumulation process, apoptosis level, phase cycle analysis, oxidative stress as well as glutathione reduced level) were undertaken in order to determine compounds mechanism of actions and if its correlated with compound chemical structure. The results showed that the presence of isothiocyanate moiety does not guarantee high biological activity. Presence of the additional functional group strongly influenced observed antiproliferative

activity, but surprisingly, the chemical character of these moiety for overall antiproliferative properties was less important. However, it influenced the observed mechanism of action, thus suggesting that isothiocyanates mechanism of action can be modified without affecting the overall biological effect.

Once inside cells, isothiocyanates readily reacts with glutathione (which is present in extremely high concentrations) and subsequently metabolized to mercapturic acids. Interestingly, these metabolites showed biological activity almost identical with their parental isothiocyanates. At the same time they don't possess some isothiocyanates adverse features like pungent smell and taste. Moreover, during the in vivo studies, these derivatives proved to be almost equally active against cancer tumors as parental isothiocyanates. Additionally, studies of mercapturic acids stability in oxidative environment (like the environment of fast growing solid cancer tumor) showed that they might be useful as a prodrug form for isothiocyanates with around tumor activation mechanism built-in.

During the studies attempts to design a therapeutic regime that would utilize isothiocyanates as a sensitization agent in order to reduce cancer cell resistance (eg. LovoDX cancer cell line) against doxorubicine and other anthracycline cytostatic agents. Results of in vitro studies (and some preliminary in vivo experiments) showed that combine treatment using isothiocyanates and doxorubicine allows to reduce cytostatic doses with no negative effect on the effectiveness of the therapy.