

Lidia Mielczarek (d. Śliwka)  
Katedra Farmacji Fizycznej  
oraz Bioanalizy WF WUM  
Zakład Biotechnologii Leków  
oraz Bioinformatyki NIL  
Promotor: dr hab. Piotr Suchocki  
Promotor pomocniczy: dr hab. Katarzyna Wiktorska

## STRESZCZENIE

### **Biologiczne interakcje Selolu 5% z izotiocyjanianami**

Choroby nowotworowe wciąż stanowią poważny problem epidemiologiczny i ekonomiczny. Dotychczasowe schematy leczenia oparte na metodach takich jak radioterapia czy chemioterapia cechują się wciąż niezadowalającą skutecznością przy jednoczesnej dużej toksyczności stosowanej terapii. Z tego względu w ostatnich latach obserwuje się zwrot zainteresowania badaczy w kierunku terapii skojarzonej, celem maksymalizacji skuteczności i jednoczesnego zniwelowania działań niepożądanych stosowanego leczenia. W literaturze naukowej w 2005 roku pojawił się nowy nurt badawczy, według którego łączne podanie związków pochodzenia naturalnego o aktywności przeciwnowotworowej np. izotiocyjanianów (ITC) z genisteiną, kurkumą, resweratrole, lub z cytostatykami powszechnie stosowanymi w chemioterapii nowotworów np. doksorubicyną (DOX) czy 5-fluorouracylem (5-FU) może wzmacniać działanie przeciwnowotworowe pojedynczych związków. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania wpisują się w ten trend.

W badaniach stanowiących przedmiot niniejszej pracy wykorzystano związki pochodzenia naturalnego, wśród nich oryginalny polski preparat chroniony patentem - Selol. Jest to mieszanina seleninotriglicerydów, która zawiera selen na + 4 stopniu utlenienia. Związek ten wykazuje właściwości zarówno chemoprewencyjne w stosunku do komórek prawidłowych, jak i cytotoksyczne w stosunku do licznych linii komórek zmienionych nowotworowo.

Kolejną badaną w ramach tej pracy grupą związków są izotiocyjaniany (ITC) - fitozwiązki występujące naturalnie w roślinach z rodziny *Brassicaceae* (*Kapustowate*) i ich syntetyczne pochodne. Najlepiej poznanym związkiem z tej grupy jest sulforafan (SFN). Dane literaturowe wskazują, iż związki z grupy ITC nasilają działanie cytostatyków i innych związków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej. Bada się także możliwość wykorzystania tych związków w przeciwnowotworowej terapii kombinowanej. Do badań włączono także analogi ITC, fluorowane izoselenocyjaniany, w których atom siarki wymieniono na selen.

**Celem pracy było określenie skuteczności przeciwnowotworowej kombinacji Selolu i ITC oraz porównanie jej z terapią skojarzoną z wykorzystaniem doksorubicyny (DOX) lub 5-fluorouracylu (5-FU).** Aktywność cytotoksyczną w/w związków badano na modelu *in vitro*, odpowiednio w stosunku do komórek nowotworowych lub prawidłowych. Aby określić znaczenie atomu selenu dla aktywności ITC za cel postawiłam sobie także określenie wpływu włączenia atomu selenu do struktury ITC na aktywność przeciwnowotworową cząsteczki.

W badaniach wykorzystano komórki agresywnego ludzkiego raka sutka (MDA-MB-231), ludzkiego raka sutka (MCF-7), ludzkiego raka jelita grubego (HT-29) oraz ludzkiego czerniaka

(MALME3M). Jako model komórek prawidłowych wykorzystano komórki jelita grubego linii CRL-1790. Zastosowany model badawczy równoległej oceny działania związków na komórki nowotworowe i prawidłowe jest niezbędny do określenia bezpieczeństwa terapii, jednak nadal rzadko spotykany w literaturze naukowej.

Pierwszy etap niniejszej pracy dotyczył wyboru odpowiedniej metody do badań cytotoksyczności oraz różnych kombinacji związków. Porównywano wyniki uzyskane za pomocą dwóch testów: najczęściej stosowanym w ocenie cytotoksyczności związków chemicznych testem MTT oraz testem z wykorzystaniem fioletu krystalicznego (CVS). Następnie określono biochemiczne podstawy rozbieżności w uzyskanych za ich pomocą wynikach. Wykazano, iż najczęściej stosowany i zalecany jako referencyjny przez międzynarodowe organizacje normotwórcze, test MTT nie jest odpowiedni dla związków, które wykazują właściwości oksydoredukcyjne takich jak. Selol, ITC, związki te wymagają zastosowania bezpośrednich testów toksyczności (np. testu CVS).. Wyniki badań pozwoliły po raz pierwszy wykazać wpływ metody do oceny cytotoksyczności na wiarygodność uzyskanych wyników badań typu interakcji lek-lek.

Następnie przeprowadzono badania efektów łącznego stosowania Selolu i ITC, w których wykazano, iż kombinacje tych związków wykazują działanie synergistyczne - potęgując swoje wzajemne działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych. Najbardziej korzystne, najsilniejsze synergistyczne działanie cytotoksyczne uzyskano wobec komórek raka sutka MCF-7, po łącznym podaniu **Selolu z izotiocyjanianem 2-oksoheptylu oraz Selolu z sulforafanem (SFN)**

Jednocześnie przeprowadzono badania interakcji pomiędzy ITC lub Selolem a standardowymi lekami onkologicznymi - doksorubicyną (DOX) i 5-fluorouracylem (5-FU). Uzyskane wyniki wskazują, że Selol oraz ITC działają synergistycznie ze standardową chemioterapią wobec raka wykazując *in vitro* silne działanie przeciwnowotworowe. Najbardziej efektywne działanie przeciwnowotworowe wykazywała kombinacja **Selolu z DOX wobec komórek raka sutka**.

Wyniki badań na komórkach CLR-1790 wskazują, że wszystkie badane w ramach niniejszej pracy związki oraz ich kombinacje nie wykazywały działania cytotoksycznego wobec komórek prawidłowych, co znajduje bezpośrednie przełożenie na bezpieczeństwo ich stosowania, na razie na etapie badań *in vitro*.

Badania wpływu włączenia selenu do struktury ITC, w miejsce siarki, na właściwości tak powstałych związków wykazały, iż nowe pochodne fluorowane izoselenocyjaniany cechuje silniejsze działanie przeciwnowotworowe oraz wyższa selektywność działania cytotoksycznego niż ITC. Uzyskane wyniki sugerują, iż wprowadzenie do struktury ITC atomu **selenu** w miejsce atomu siarki ma kluczowe znaczenie dla zwiększenia potencjału przeciwnowotworowego pochodnych ITC.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż kombinacje, w szczególności połączenia ITC i Selolu oraz Selolu ITC z dodatkiem cytostatyków wykazują silniejsze działanie przeciwnowotworowe niż każdy z nich z osobna. Kombinacje te cechuje wysoka selektywność działania cytotoksycznego w stosunku do komórek nowotworowych i prawidłowych, co stwarza interesującą perspektywę ich potencjalnego zastosowania w terapii skojarzonej raka sutka oraz jelita grubego. Najbardziej obiecujące wyniki badań stały się podstawą zgłoszeń patentowych.