

**UNIwersYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU**

**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM  
MEDYCYNy LABORATORYJNEJ**



**Natalia Pawłowska**

**MECHANIZM PRZECIWNOWOTWOROWEGO DZIAŁANIA  
POCHODNYCH OKTAHYDROPIRAZYNO[2,1-a:5,4-  
a']DIIZOCHINOLINY W KOMÓRKACH RAKA SUTKA MCF-  
7 I MDA-MB-231**

**Rozprawa doktorska**

**Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Bielawski**

Pracę wykonano w Zakładzie Syntezy i Technologii Środków Leczniczych  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

**BIAŁYSTOK 2018**

## STRESZCZENIE

Pomimo znacznego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w chemioterapii, radioterapii i immunoterapii, opracowanie skutecznej terapii przeciwnowotworowej stanowi poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Stosowane obecnie leki cytostatyczne wywołują szereg efektów ubocznych, które ograniczają skuteczność ich działania oraz obniżają jakość życia pacjentów. Niezwykle istotne jest zatem poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych, a także opracowywanie leków o lepszym profilu farmakologicznym działających specyficznie na komórki nowotworowe i nie wywierających toksycznego efektu wobec komórek prawidłowych. Poznanie i zrozumienie działania czynników molekularnych zaangażowanych w sieć sygnalizacyjną apoptozy jest szczególnie istotne przy opracowywaniu nowych strategii walki z rakiem. Biorąc pod uwagę fakt, iż upośledzenie programowanej śmierci komórki jest jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych, stymulacja tego procesu stanowi obiecującą drogę do opracowania nowych i bardziej skutecznych leków przeciwnowotworowych. Interesującą grupę związków, wykazującą właściwości proapoptotyczne, stanowią syntetyczne pochodne alkaloidów izochinolinowych./Syntetyczne pochodne alkaloidów izochinolinowych stanowią interesującą grupę związków o silnych właściwościach proapoptotycznych.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przebadano pod kątem aktywności cytotoksycznej 55 nowo zsyntetyzowanych pochodnych oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny. Przeprowadzone badania przesiewowe pozwoliły zidentyfikować prawidłowości dotyczące zależności struktura-aktywność (SAR, ang. *structure-activity relationship*) testowanych związków oraz wyselekcjonować spośród nich cząsteczki o najwyższej potencjalnej aktywności: OM-48, OM-71, OM-86II, OM-90, OM-140, OM-141 oraz RC-27. Kolejnym założeniem pracy było poznanie mechanizmu działania nowych pochodnych oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny w estrogenozależnych MCF-7 oraz estrogenoniezależnych MDA-MB-231 komórkach raka sutka. W tym celu zbadano wpływ testowanych związków na wybrane markery biochemiczne apoptozy, takie jak: utrata asymetrii rozmieszczenia fosfolipidów błony komórkowej, zmiana mitochondrialnego potencjału błonowego ( $\Delta\Psi_m$ ), aktywność kaspaz inicjatorowych (kaspazy 9, 8 i 10) oraz aktyw egzekutorowej kaspazy 3. W badaniach oceniających aktywność biologiczną testowanych pochodnych diizochinoliny jako związki referencyjne zastosowano kamptotecynę i etopozyd.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że nowe pochodne oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny wykazują wysoką aktywność cytotoksyczną w komórkach raka sutka MCF-7 i MDA-MB-231. Najsilniejszy efekt cytotoksyczny wykazał związek OM-90, dla którego wartość  $IC_{50}$  w komórkach MCF-7 wynosiła  $24 \pm 2 \mu M$ , zaś w komórkach MDA-MB-231  $14 \pm 2 \mu M$ . Ponadto, w fibroblastach skóry ludzkiej wszystkie testowane związki charakteryzowały się niższą cytotoksycznością w porównaniu do badanych linii nowotworowych. Wraz ze wzrostem stężenia związków OM-48, OM-71, OM-86II, OM-90, OM-140, OM-141 i RC-27 zaobserwowano upośledzenie biosyntezy DNA w komórkach raka sutka MCF-7 i MDA-MB-231, co wskazuje na właściwości antyproliferacyjne badanych cząsteczek. Nowe pochodne oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny, oznaczone symbolami OM-86II, OM-90 i OM-141 silniej hamowały wbudowywanie [ $^3H$ ]-tymidyny do DNA badanych komórek nowotworowych niż związki referencyjne – kamptotecyna i etopozyd. Mechanizm przeciwnowotworowego działania testowanych związków związany jest z indukcją apoptozy w komórkach raka sutka MCF-7 i MDA-MB-231. Programowana śmierć komórki, indukowana w komórkach nowotworowych pod wpływem związków OM-48, OM-71, OM-86II, OM-90, OM-140, OM-141 i RC-27, przebiega zarówno drogą wewnątrzpochodną, która obejmuje spadek mitochondrialnego potencjału błonowego i aktywację kaspazy 9 oraz drogą zewnątrzpochodną z wyraźnym wzrostem ekspresji kaspazy 8 i kaspazy 10.

## SUMMARY

Despite the significant progress that has been made in recent years in chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy, the development of effective anti-cancer therapy is still a challenge for contemporary medicine. Cytostatic drugs which are currently used cause a number of side effects that limit their effectiveness and reduce the quality of patients' life. Therefore, it is important to search for new therapeutic strategies, as well as to develop drugs with a better pharmacological profile targeted on tumor cells and deprived of toxic effect on normal cells. The elucidation of molecular factors involved in the apoptotic signaling network is particularly relevant while devising new strategies for cancer therapy. Bearing in mind that the impairment of programmed cell death is one of the characteristic features of tumor cells, the stimulation of the process is a promising way to develop novel and more effective anticancer drugs. Synthetic derivatives of isoquinoline alkaloids are an interesting group of compounds with proapoptotic properties.

55 novel octahydropyrazino[2,1-a:5,4-a']diisoquinoline derivatives were tested for their cytotoxic activity. The preliminary study enabled identification of the structure-activity relationship of the tested compounds and selection of the molecules with the highest potential activity: OM-48, OM-71, OM-86II, OM-90, OM-140, OM-141 RC-27. The following assumption of the thesis was to examine the mechanism of the novel octahydropyrazino[2,1-a:5,4-a']diisoquinoline derivatives in MCF-7 estrogen receptor-positive and MDA-MB-231 estrogen receptor-negative breast cancer cells. For this purpose there was investigated the effect of the tested compounds on the selected biochemical markers of apoptosis such as the loss of asymmetry of the phospholipids on the cell membrane, the changes of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), the activity of initiator caspases (9, 8, 10) and the executive caspase 3. Camptothecin and etoposide were used as references in this study.

It was found that the new octahydropyrazino[2,1-a:5,4-a']diisoquinoline derivatives exhibit the high cytotoxic activity in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. The strongest cytotoxic effect was demonstrated by the compound OM-90. The  $IC_{50}$  value for the agent was  $24 \pm 2 \mu M$  in MCF-7 cells and  $14 \pm 2 \mu M$  in MDA-MB-231 cells. Moreover, all the tested compounds were characterized by lower cytotoxicity in human dermal fibroblasts in comparison to the tumor lines. Compounds OM-48, OM-71, OM-86II, OM-90, OM-140, OM-141 and RC-27 inhibit the biosynthesis of DNA in dose-dependent manner in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, which suggests that the tested molecules display antiproliferative properties. It was observed that three agents OM-86II, OM-90 and OM-141

had higher ability to inhibit [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation into DNA of the tested cells than references – camptothecin and etoposide. The mechanism of antitumor action of the studied compounds is related to the induction of apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. Programmed cell death, induced in cancer cells under the influence of OM-48, OM-71, OM-86II, OM-90, OM-140, OM-141 and RC-27, follows the intrinsic pathway with the decrease in mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. Apoptosis may as well go through the extrinsic pathway with the significant increase in the expression of caspase 8 and caspase 10.

