

**Dorota Katarzyna Pomorska**

**Badanie nowych syntetycznych heterocykli  
jako potencjalnych związków o działaniu  
przeciwnowotworowym**

---

Praca na stopień doktora nauk medycznych  
wykonana w Zakładzie Chemii Biomolekularnej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi



**Promotor: prof. dr hab. Anna Janecka**

**Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Gach-Jancza**

**Łódź 2017**

## STRESZCZENIE

Choroby nowotworowe uważane są za jedną z najpoważniejszych epidemii XXI wieku. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że w 2025 r liczba zachorowań na raka na świecie wyniesie około 19 mln, a w 2035 już 24 mln. Rak piersi uważany jest za jeden z najmniejbezpieczniejszych i najczęstszych nowotworów złośliwych u kobiet [1]. W 2013 roku stanowił 10% wśród wszystkich zachorowań na nowotwory w Polsce [2]. Zachorowania na białaczkę promielocytową stanowiły 2% wszystkich nowotworów.

Obecnie dostępnych jest kilkadziesiąt leków przeciwnowotworowych lecz wciąż poszukuje się środków skuteczniejszych i powodujących mniej efektów ubocznych.

W poszukiwaniu nowych struktur wykorzystywane są często substancje naturalne pochodzenia roślinnego, których aktywność można zwiększać poprzez wprowadzanie modyfikacji chemicznych. Właśnie takie syntetyczne analogi oparte na strukturach związków naturalnych stały się z przedmiotem badań niniejszej pracy.

Wykorzystane w pracy doktorskiej nowe, syntetyczne związki heterocykliczne zostały zsyntezowane w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej.

Pierwsze dwie serie związków stanowiły  $\alpha$ -metyleno- $\delta$ -laktony oraz  $\alpha$ -metyleno- $\gamma$ -laktamy, zawierające grupę *egzo*-metylenową sprzężoną z karbonylem. Taki motyw strukturalny odpowiada za aktywność wielu związków pochodzenia naturalnego, w tym arglabiny czy partenolidu. Trzecią serię stanowiły związki zawierające ugrupowanie 1,4-naftalenodionu, występujące także w stosowanych obecnie antybiotykach przeciwnowotworowych t.j. doksorubicynie czy daunorubicynie.

W pierwszym etapie pracy zbadalam wpływ nowych analogów na aktywność cytotoksyczną komórek białaczki HL-60 oraz raka piersi MCF-7. Następnie, dla najaktywniejszych związków, wykonałam test na przeżywalność komórek prawidłowych HUVEC i MCF-10A. Na podstawie otrzymanych wyników wybrałam po jednym przedstawicielu z każdej grupy do dalszych testów. Wybrane analogi to  $\alpha$ -metyleno- $\delta$ -lakton **DL-249**,  $\alpha$ -metyleno- $\gamma$ -laktam **39** oraz 1,4-naftalenodion **49**.

W ramach dysertacji badałam wpływ wybranych związków na indukcję procesu apoptozy, hamowanie proliferacji komórek, powodowanie uszkodzeń DNA,

wywoływanie stresu oksydacyjnego oraz na zmiany potencjału błonowego mitochondrium. W przypadku  $\alpha$ -metyleno- $\delta$ -laktonu **DL-249** badałam również jego wpływ na aktywność białka NF- $\kappa$ B za pomocą cytometrii przepływowej oraz testu immunoenzymatycznego ELISA. Wpływ wybranych analogów na poziom ekspresji niektórych genów, takich jak *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-xl*, *kaspaza-3 i -9*, *p-53* oraz *NF- $\kappa$ B* określałam metodą real-time PCR.

W ostatnim etapie badałam ewentualne synergistyczne działanie analogów z trzema lekami przeciwnowotworowymi o różnym mechanizmie działania: 5-fluorouracylem, taksolem i oksaliplatyną.

Otrzymane wyniki wskazywały, że główny mechanizm działania  $\alpha$ -metyleno- $\delta$ -laktonu **DL-249** polegał na aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i indukcji apoptozy drogą mitochondrialną. **DL-249** wykazywał też silny efekt synergistyczny w komórkach MCF-7 w połączeniu z taksolem i 5-fluorouracylem, natomiast  $\alpha$ -metyleno- $\gamma$ -laktam **39** wykazywał najsilniejsze działanie synergistyczne w tych komórkach z oksaliplatyną.

Analog **49**, zawierający motyw 1,4-naftalenodionu połączonego z pierścieniem furanu i grupą fosfonianową, powodował w komórkach HL-60 i MCF-7 powstawanie reaktywnych form tlenu, co prowadziło do stresu oksydacyjnego i śmierci komórek na drodze mitochondrialnej. Związek ten nie dawał efektu synergistycznego z żadnym z badanych leków.

Podsumowując można powiedzieć, że wszystkie trzy badane analogi posiadały silne właściwości przeciwnowotworowe. Niestety charakteryzowały się małą selektywnością działania w stosunku do komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Tym niemniej, analogi te mogą być uważane za struktury wiodące i dalej modyfikowane w poszukiwaniu bardziej selektywnych związków.

## SUMMARY

One of the most serious epidemics of the 21st century is cancer. The World Health Organization (WHO) estimates that there will be about 19 million cancer cases in the world in 2025 and that this number will increase up to 24 million in 2035. The most dangerous and the most common malignant tumor in women appears to be breast cancer [1]. In 2013 in Poland 10% of all cancer cases were breast cancer [2]. The promyelocytic leukemia achieved the level of 2% of all cancer patients.

Even though there are already dozens of available anticancer drugs, there is still a burning need for medical compounds that will be more effective and cause less side effects during treatment. In the search for new drug candidates chemists often use natural substances isolated from plants and try to increase their activity by various chemical modifications.

Following this path, new synthetic analogs, whose structure was based on natural compounds, were synthesized in the Institute of Organic Chemistry, Łódź University of Technology.

The aim of this thesis was to determine the anticancer potential of three series of new synthetic heterocyclic analogs. The first two series were  $\alpha$ -methylene- $\delta$ -lactones and  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactams, containing an *exo*-methylene group conjugated with a carbonyl function. Such structural motif is responsible for the activity of many natural compounds, including arglabin and parthenolide. The third group included analogs containing a naphthalene-1,4-dione scaffold that is also present in such currently used anticancer antibiotics as doxorubicin and daunorubicin.

As the first step of my work, I investigated the cytotoxic activity of new analogs against two human cancer cell lines: promyelocytic leukemia HL-60 and breast cancer MCF-7. Then, I evaluated the effect of the most cytotoxic compounds on normal cells, HUVEC and MCF-10A. Based on the obtained results, I selected one representative from each group for further studies. The selected analogs were  $\alpha$ -methylene- $\delta$ -lactone **DL-249**,  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactam **39** and 1,4-naphthalenedione **49**.

Then, I studied the influence of the selected compounds on induction of apoptosis, DNA damage, stimulation of oxidative stress, inhibition of cell

proliferation and changes in mitochondrial membrane potential in HL-60 and MCF-7 cells. In the case of  $\alpha$ -methylene- $\delta$ -lactone **DL-249** I also tested its influence on the activity of the transcription factor NF- $\kappa$ B, using flow cytometry and immunoenzymatic test ELISA. The effects of the selected analogs on the expression levels of some genes, such as *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-xl*, *caspase-3* and *-9*, *p53* and *NF- $\kappa$ B* I determined using real-time PCR method.

In the last part of this research, I investigated the potential synergistic effects of the analogs with three anticancer drugs that represent different mechanisms of action: 5-fluorouracil, taxol and oxaliplatin.

The obtained results showed that the main mechanism of action of  $\alpha$ -methylene- $\delta$ -lactone **DL-249** was the activation of NF- $\kappa$ B transcription factor and induction of apoptosis by the mitochondrial pathway. **DL-249** exerted a strong synergistic effect in MCF-7 cells during combination treatment with taxol and 5-fluorouracil, while for the  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactam **39** the strongest synergistic effect was observed with oxaliplatin.

Analog **49**, containing 1,4-naphthalenedione motif in combination with a furan ring and a phosphonate group, induced formation of reactive oxygen species in HL-60 and MCF-7 cells that led to oxidative stress and cell death by mitochondrial pathway. I have not observed any synergistic effects for this compound in combination with the selected anticancer drugs.

In conclusion, the results presented in this thesis revealed, that all three tested analogs possess strong anticancer activity. Unfortunately, they were not very selective and showed cytotoxicity also against normal cells. Nevertheless, these analogs can be considered lead structures for further modifications, in the search for more selective compounds.

