

Załącznik:

Streszczenie pracy doktorskiej z akceptacją promotora

Poszukiwanie skuteczniejszych związków chemioterapeutycznych stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Biorąc pod uwagę różne właściwości biologiczne fenytoiny (5,5-difenylohydantoiny), jej struktura chemiczna stanowi interesujący punkt wyjścia w poszukiwaniu nowych potencjalnych związków terapeutycznych.

W czasie syntezy amino-alkilowych pochodnych fenytoiny otrzymano produkty pośrednie, 2-(2,4-dioxo-5,5-difenyloimidazolidyno-3-ylo) propionian metylu (PH1), 2-(1-(3-bromopropyl)-2,4-dioxo-5,5-difenyloimidazolidyno-3-ylo)propionian metylu (PH2), 1-(3-bromopropyl)-3-metylo-5,5-difenyloimidazolidyno-2,4-dion (PH3) oraz 1-(4-bromobutyl)-3-metylo-5,5-difenyloimidazolidyno-2,4-dion (PH4). Wyniki oceny toksyczności analogów 5,5-difenylohydantoiny, przy zastosowaniu serwisu bioinformatycznego OSIRIS, sugerowały ich potencjalne właściwości cytotoksyczne, które mogą mieć istotne znaczenie w terapii przeciwnowotworowej.

Komórki nowotworowe hodowane w warunkach *in vitro* są użytecznym modelem do określania cytotoksyczności związków chemicznych. Istotne znaczenie w ocenie potencjału przeciwnowotworowego testowanych związków chemicznych ma ich zdolność do indukowania śmierci patologicznych komórek oraz zmian w cyklu komórkowym.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie i porównanie efektów działania nowych pochodnych fenytoiny PH1, PH2, PH3 i PH4 na ludzkie komórki leukemiczne. Badania wykonano w warunkach *in vitro*, na komórkach białaczki promielocytarnej HL-60 i komórkach chłoniaka histiocytowego U937. Doświadczenia przeprowadzono przy zastosowaniu metody Coultera, spektrofotometrycznego testu MTT, cytometrycznych testów z aneksyną V-FITC/PI, TMRE, PI/RNaza, testu APO-BrdU i testów określających aktywność kaspaz-8,-9 i -3/7, a także metod mikroskopii świetlnej i elektronowej.

Analogi fenytoiny wywarły znaczący wpływ na komórki leukemiczne. PH1, PH2, PH3 i PH4 spowodowały obniżenie żywotności i liczebności komórek leukemicznych. Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych badań wybrano trzy pochodne fenytoiny, PH2, PH3 i PH4, charakteryzujące się większą aktywnością cytotoksyczną, niż PH1. Zastosowanie PH2, PH3 i PH4 spowodowało zmiany w wielkości i liczbie ziarnistości komórek, zaburzenia w asymetrii lipidów błonowych i integralności błony komórkowej, obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego, zwiększenie aktywności kaspaz-8,-9 i -3/7, zmiany w cyklu komórkowym, fragmentację nici DNA, a także zmiany w morfologii i ultrastrukturze komórek. Ogólnie można stwierdzić, że PH2, PH3 i PH4 indukowały apoptozę, nekrozę, autofagię i powodowały zmiany w fazach cyklu komórkowego.

Efekty cytotoksycznego działania PH1, PH2, PH3 i PH4 na komórki leukemiczne były uzależnione od zastosowanej pochodnej 5,5-difenylohydantoiny i jej stężenia, punktu czasowego, w którym wykonywano analizy oraz od linii komórek leukemicznych. Komórki HL-60 były bardziej wrażliwe na działanie testowanych pochodnych fenytoiny niż komórki U937.

Strukturalne modyfikacje 5,5-difenylohydantoiny znalazły odzwierciedlenie w zróżnicowanej odpowiedzi komórek leukemicznych na działanie jej czterech pochodnych, PH1, PH2, PH3 i PH4. Różnice w aktywności cytotoksycznej tych związków chemicznych były związane z rodzajem podstawnika wprowadzonego do cząsteczki fenytoiny, w pozycji 1 i 3 pierścienia hydantoiny. Większy potencjał przeciwlukemiczny testowanych związków chemicznych stwierdzono w przypadku obecności podstawnika bromoalkilowego w pozycji 1 i podstawnika estrowego lub metylowego w pozycji 3, aniżeli w przypadku wprowadzenia do cząsteczki 5,5-difenylohydantoiny jedynie podstawnika estrowego w pozycji 3. Biologiczna aktywność trzech bromoalkilowych pochodnych fenytoiny była więc większa od aktywności

PH1, nieposiadającego podstawnika bromoalkilowego. Wprowadzenie bromoalkilowego podstawnika do cząsteczki fenytoiny ma zatem znaczenie dla aktywności cytotoksycznej jej pochodnych. Uzyskane wyniki badań są pierwszymi danymi ukazującymi i porównującymi aktywność przeciwlukemiczną PH1, PH2, PH3 i PH4.

Niniejsze badania dostarczają nowych informacji na temat działania bromoalkilowych analogów fenytoiny jako nowych potencjalnych związków terapeutycznych. Jednakże, poznanie dokładnych mechanizmów działania pochodnych fenytoiny, PH2, PH3 i PH4, na patologiczne komórki hematopoetyczne wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Modyfikacje struktury chemicznej 5,5-difenylohydantoiny są obiecującym kierunkiem w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych.

*Lidia Moraw*