

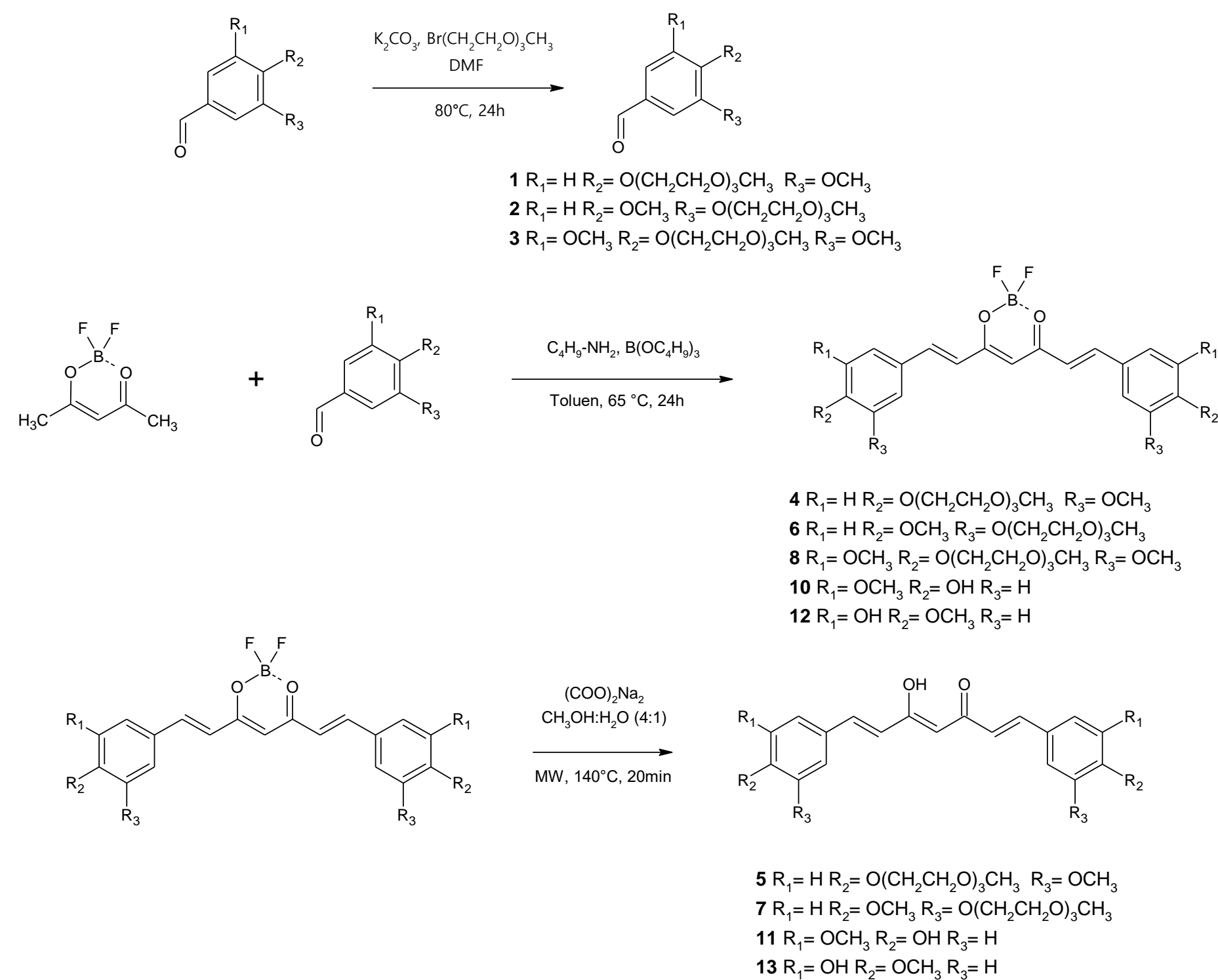


Potencjalnie nowy mechanizm działania syntetycznych pegylowanych kurkumin w warunkach hipoksji.

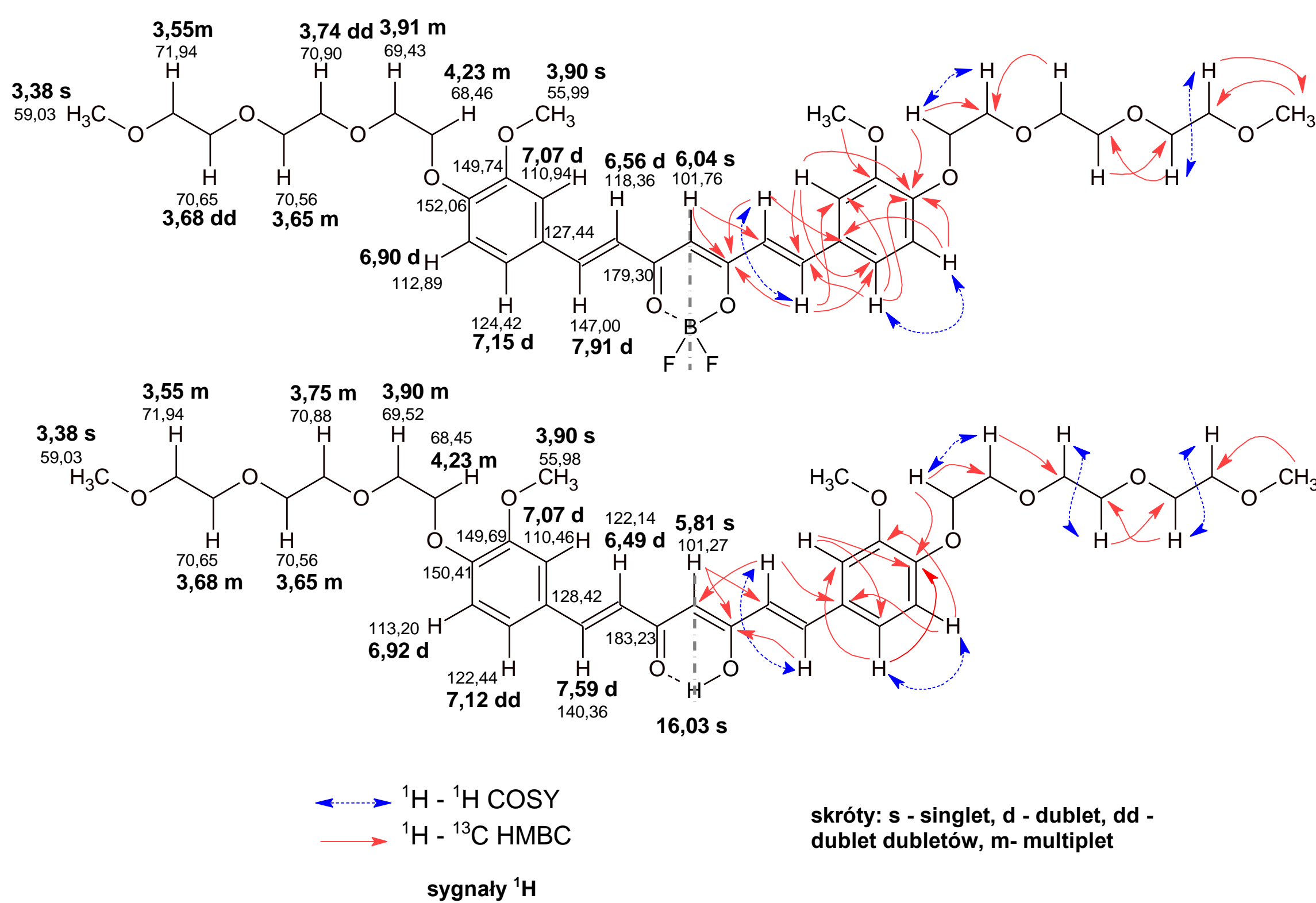
Dawid Łażewski¹, Małgorzata Kucińska², Eduard Potapskyi¹, Joanna Kuźminska³, Łukasz Popenda⁴, Artur Teżyk⁵, Tomasz Gościński¹, Marek Murias^{2,6}, Marcin Wierchowski¹.

¹Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Polska. ²Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Dojazd 30, 60-631 Poznań, Polska. ³Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Polska. ⁴Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Wszechnicy Piastowskiej 3, 61-614 Poznań, Polska. ⁵Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Rokietnicka 10, 60-806 Poznań, Polska. ⁶Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań, Polska

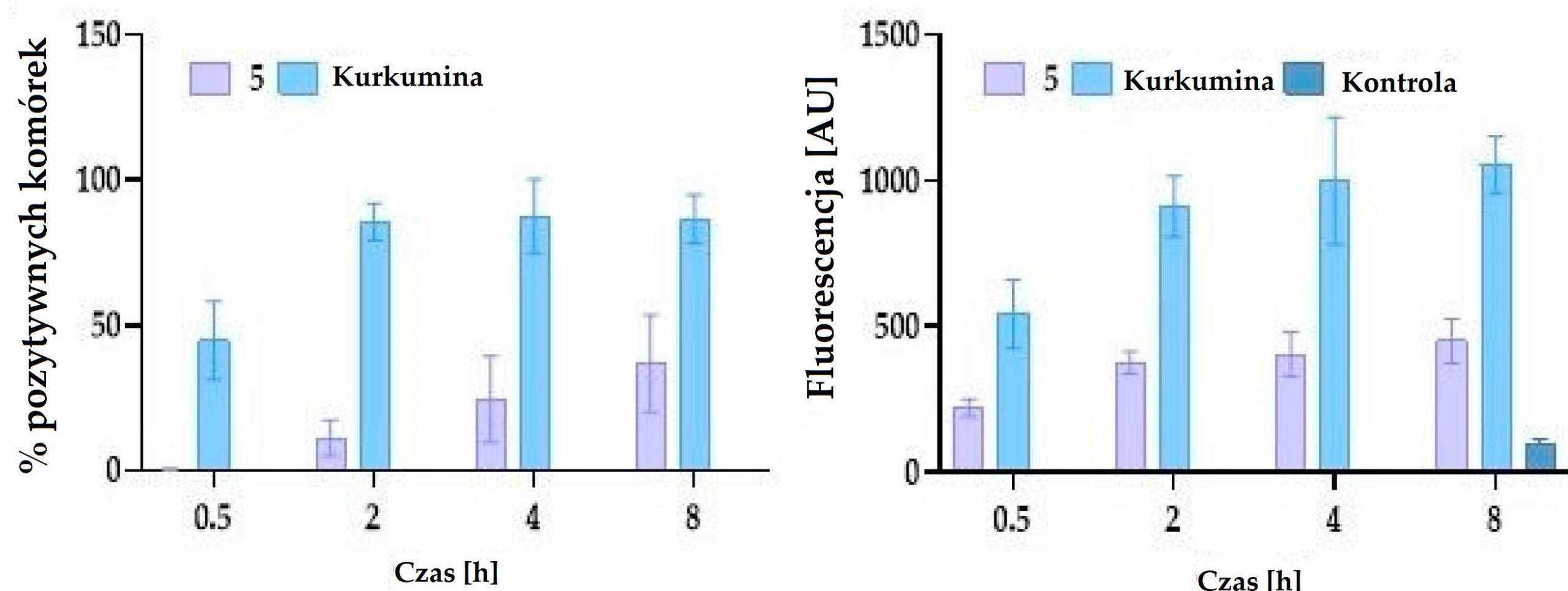
dlazewski@ump.edu.pl



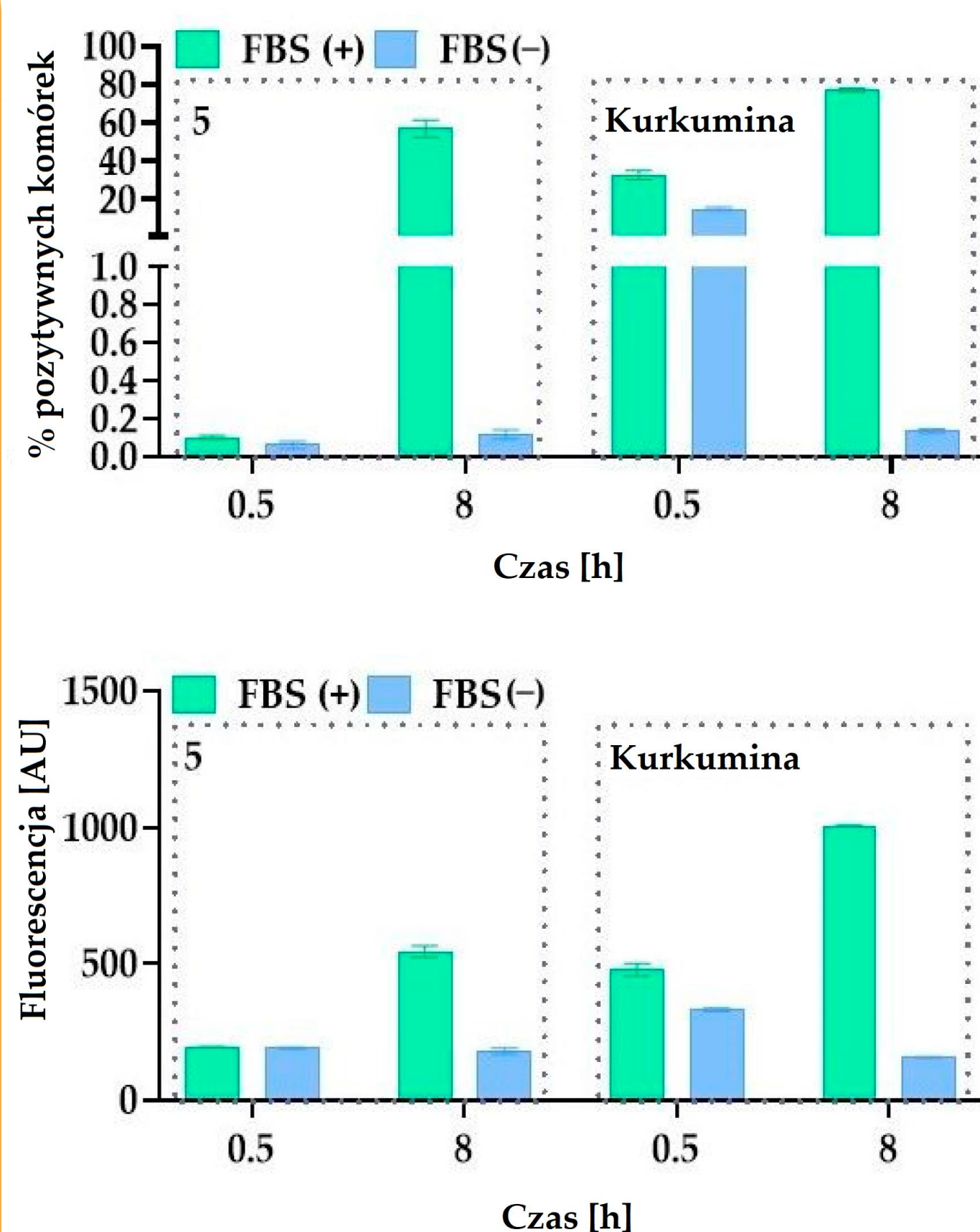
W ramach pracy przeprowadzono syntezę pegylowanych aldehydów (1-3), które zostały następnie wykorzystane do otrzymania kompleksów kurkuminoidowych z BF₂ (4, 6, 8) oraz wolnych kurkumin (5, 7). Pegylacja aldehydów przeprowadzona została metodą syntezy eterów Williamsona tj. reakcji bromku alkilowego i fenolu w obecności zasady używając DMF jako rozpuszczalnika w temperaturze 80°C. Otrzymane pegylowane aldehydy zostały wykorzystane w reakcji kondensacji z kompleksem BF₂ acetyloacetonu w środowisku toluenu w temperaturze 65°C. Katalizatorami reakcji były boran tributylu oraz n-butyloamina. Dekompleksacja do wolnych kurkumin przebiegała w reaktorze mikrofalowym w środowisku metanolu i wody (4:1) oraz szczawianu sodu w temperaturze 140°C w ciągu 20 minut. Wydajności reakcji alkilowania mieściły się w zakresie 79-83%, kompleksów kurkuminowych w zakresie 71-81%, natomiast wolnych kurkumin w zakresie 25-28%.



Dane NMR wykazały, że wszystkie badane cząsteczki kurkuminy istniały w przeważającej ilości w formach enolowych. Strukturę chemiczną związku 5 potwierdziła obecność dwóch sygnałów z integracją jednego protonu dla każdego z nich: pierwszy singlet pojawił się przy 5,81 ppm reprezentując pozycję centralną z grupą CH, a drugi (szeroki) przy 16,03 ppm odpowiadał grupie OH (wynik tautomerizacji). Sygnał protonowy reprezentujący grupę CH w pozycji centralnej kompleksu 4 pojawił się przy 6,04 ppm. Enolowa grupa hydroksylowa jest w tym przypadku nieobecna.



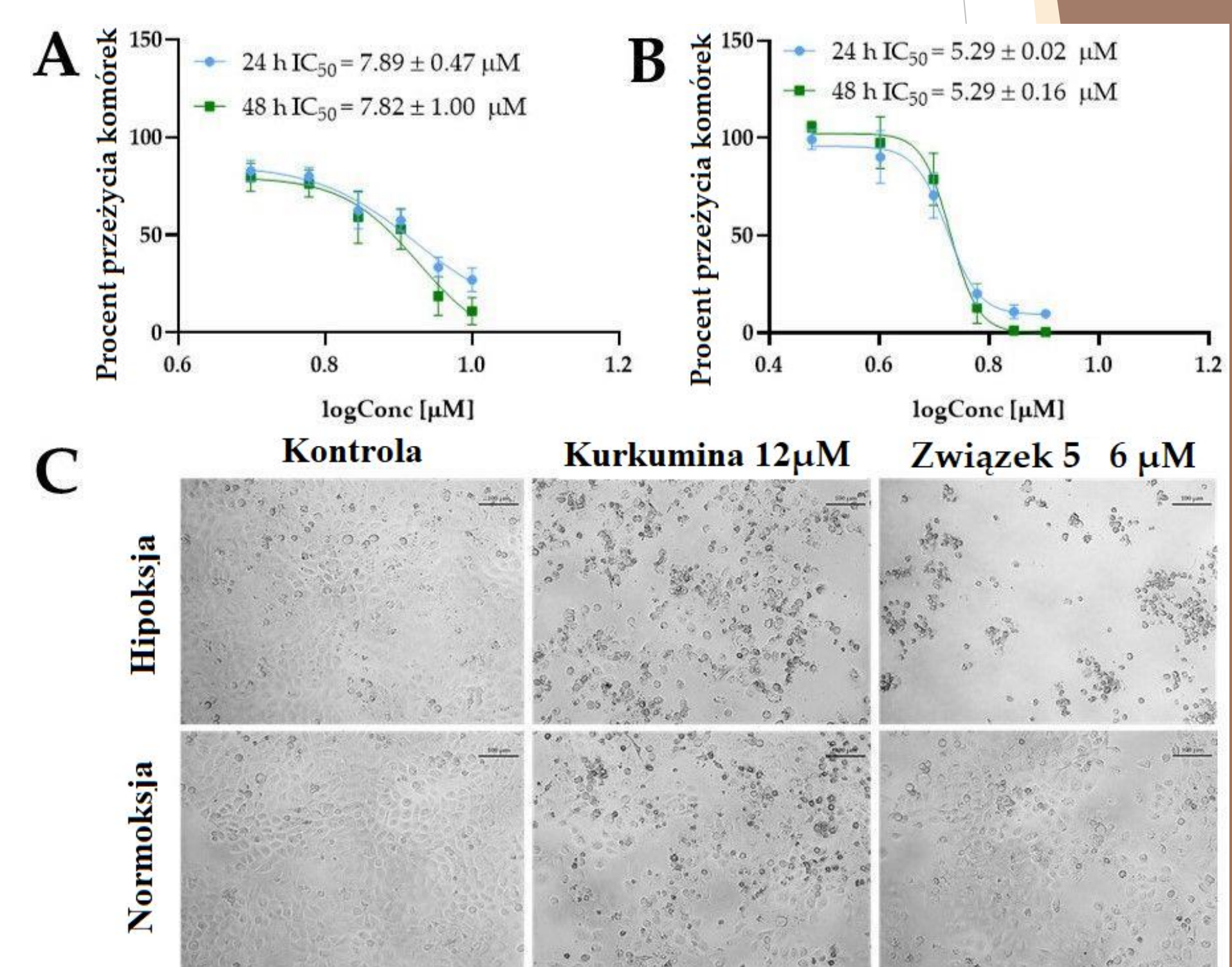
Aby zbadać, czy pegylacja kurkuminy może poprawić przenikanie związku do komórek, komórki 5637 inkubowano z kurkumina i związkiem 5 w stężeniu 10 μM przez 0,5 h, 2 h, 4 h i 8 h i analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. W przypadku kurkuminy zaobserwowano, że po 0,5 godziny około 30% komórek było pozytywnych i wzrosło podczas inkubacji, aby osiągnąć plateau dla dłuższego czasu inkubacji, z 80-90% pozytywnych komórek po ok. 2 godzinach. W przeciwieństwie do tego, dla związku 5 liczba pozytywnych komórek jest znacznie niższa niż w przypadku kurkuminy. Zaobserwowano również zależny od czasu wzrost sygnału fluorescencyjnego. Po inkubacji z kurkumina trwającej 8 godzin, stwierdzono ponad 85% pozytywnych komórek. W przypadku związku 5 liczba pozytywnych komórek w tym czasie wynosiła 36%.



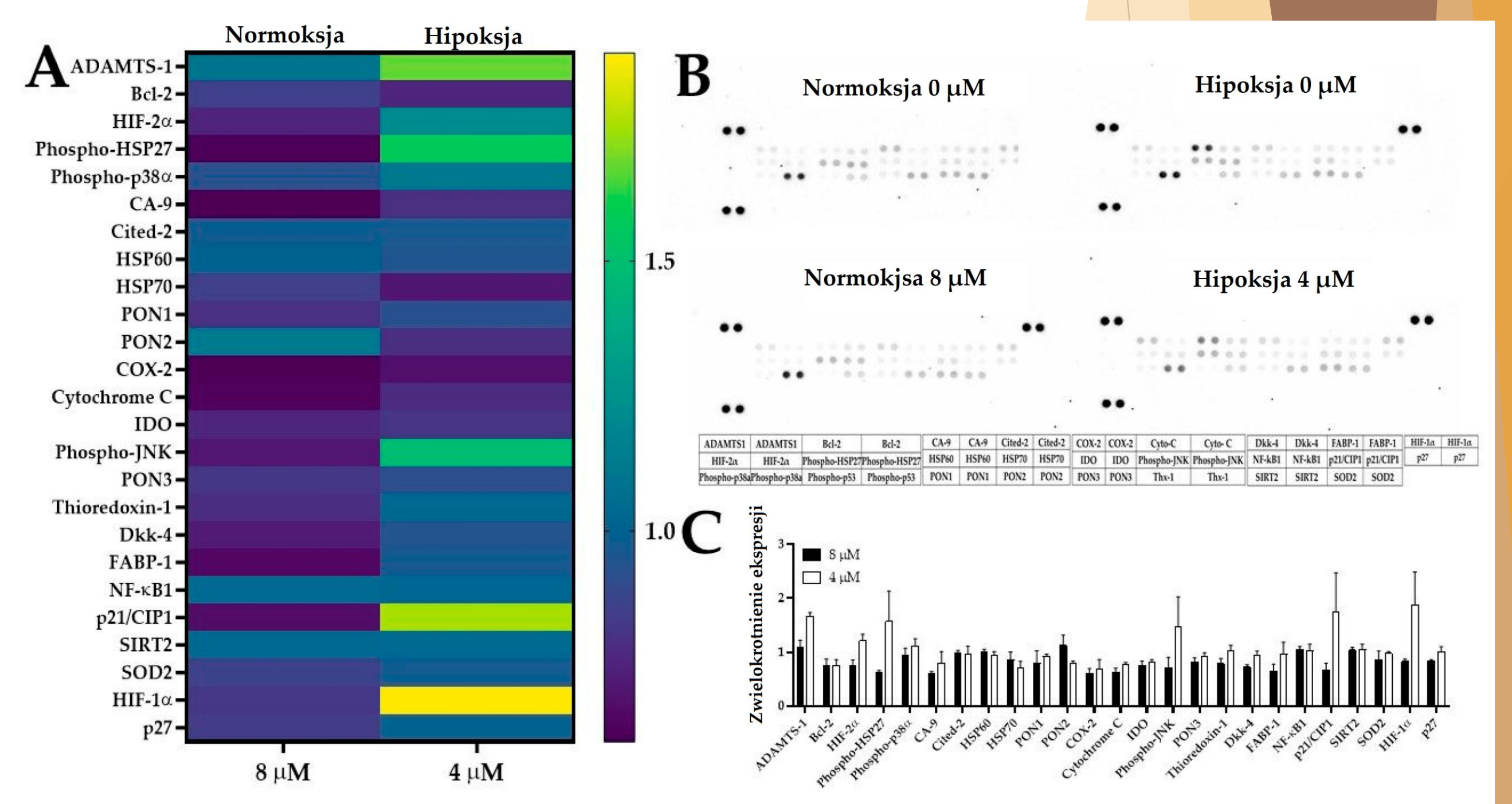
Zaobserwowano również, że obecność płodowej surowicy bydłowej (FBS) jest ważna dla skutecznego wychwytu komórkowego. Wykazano również, że FBS może chronić kurkumina przed degradacją w środowisku wodnym. To samo zachowanie zaobserwowano również dla związku 5. Po 8 godzinach fluorescencja zmniejszyła się w pożywce bez FBS. Wyniki te mogą wskazywać, że FBS może również stabilizować związek 5. Chociaż wchłanianie pegylowanej kurkuminy było mniejsze niż kurkuminy, to efekt cytotoksyczny był większy. Pegylacja zwiększa masę cząsteczkową, zmienia liczbę akceptorów wiązań H (12 dla związku 5 i 6 dla kurkuminy), a lipofilowość może wpływać na współczynnik przepuszczalności, zmniejszając w ten sposób wchłanianie; jednak ta modyfikacja może zapewnić ochronę przed szybką degradacją, a tym samym ostatecznie osiągnąć lepszą aktywność cytotoksyczną. Biorąc pod uwagę, że PEG może wchodzić w interakcje z różnymi białkami obecnymi w surowicy, związek 5 może nie przechodzić przez błonę pasywnie, a bardziej wyspecjalizowany transport błonowy może być zaangażowany w ten proces.

Związek	Czas inkubacji[h]	IC ₅₀ [μM]			
		Normoksja		Hipoksja	
4	24	5637	5637	>10	5637
	48	3,31 ± 0,34	4,18 ± 1,30	>10	2,58 ± 0,11
5	24	8,40 ± 0,21	8,53 ± 0,16	>10	6,43 ± 0,26
	48	7,91 ± 0,46	7,97 ± 0,40	>10	5,02 ± 1,06
6	24	2,60 ± 0,99	4,11 ± 1,40	>10	2,37 ± 0,19
	48	2,63 ± 0,77	4,35 ± 1,97	9,34 ± 0,76	2,66 ± 0,07
10	24	2,25 ± 0,08	2,59 ± 0,16	>10	1,96 ± 0,47
	48	2,17 ± 0,24	2,71 ± 0,34	7,84 ± 0,15	2,12 ± 0,33
Kurkumina (11)	24	12,65 ± 3,03	13,14 ± 0,68	70,35 ± 12,45	12,14 ± 0,16
	48	12,86 ± 2,35	12,57 ± 0,62	45,33 ± 3,18	13,29 ± 0,54
12	24	2,48 ± 0,55	2,28 ± 0,13	9,63 ± 2,61	2,32 ± 0,29
	48	2,40 ± 0,45	2,21 ± 0,17	5,80 ± 0,77	2,64 ± 0,54
13	24	10,85 ± 3,46	14,66 ± 0,88	>20	13,09 ± 2,89
	48	6,71 ± 1,70	14,26 ± 0,41	>20	10,12 ± 3,12

W naszych badaniach związki testowane były w zakresie stężeń 0,3-10 μM w celu określenia ich wartości IC₅₀. Dla izokurkuminy zastosowano stężenia 0,6-20 μM, a zakres stężeń dla kurkuminy, w oparciu o dane literaturowe, był również wyższy (3-100 μM). Nasze wyniki wykazały, że związkiem najbardziej aktywnym wobec obu linii komórek nowotworowych był związek 12. Jednak ta pochodna izokurkuminy z ugrupowaniem BF₂ była również jednym z najbardziej cytotoksycznych związków przeciwko normalnej linii komórkowej MRC-5, z wartościami IC₅₀ wynoszącymi 9,63 μM i 5,80 μM dla inkubacji trwającej odpowiednio 24 h i 48 h. Badanie zależności struktura-aktywność wykazało, że zamiana położenia grup metoksylowych i hydroksylowych w pochodnych BF₂ (pochodne 10 i 12) nie zmieniała znacząco aktywności cytotoksycznej wobec nowotworowych linii komórkowych. Jednakże, obecność ugrupowania -BF₂ może zmniejszać selektywność wobec komórek nienowotworowych. Z drugiej strony, związki posiadające łańcuchy PEG zamiast grupy hydroksylowej wykazywały niższą aktywność cytotoksyczną wobec MRC-5, nawet w przypadku kompleksów BF₂, jednocześnie nadal wywierając silniejsze działanie przeciwnowotworowe w porównaniu do kurkuminy.



Interesujące właściwości zaobserwowano dla pochodnej kurkuminy 5. Związek ten wykazuje podobny wpływ na linie nowotworowe, jednocześnie nie zmniejszając przeżywalności komórek MRC-5. Co więcej, w warunkach hipoksji wartości IC₅₀ związku 5 były niższe niż w normoksji. Aby uzyskać bardziej precyzyjne dane na temat aktywności cytotoksycznej związku 5, zmierzono IC₅₀ w warunkach normoksji i hipoksji dla wąskiego zakresu stężeń. Komórki linii 5637 inkubowano ze związkiem 5 w stężeniach 5 μM, 6 μM, 7 μM, 8 μM, 9 μM i 10 μM (warunki normoksji - A) oraz 3 μM, 4 μM, 5 μM, 6 μM, 7 μM i 8 μM (warunki hipoksji - B) przez 24 h i 48 h. Żywołność komórek określono za pomocą testu MTT. Panel C przedstawia reprezentatywne obrazy morfologii komórek po traktowaniu związkiem 5 w stężeniu 6 μM przez 24 godziny zarówno w warunkach hipoksji, jak i normoksji.



Ponieważ zaobserwowano spadek przeżywalności komórek na różnym poziomie dla normoksji i hipoksji, przeprowadzono dalsze eksperymenty w celu wyjaśnienia, czy związek 5 może wpływać na rozkład cyklu komórkowego. Wyniki wykazały, że związek 5 spowodował znaczny wzrost liczby komórek w fazie G2/M w sposób zależny od dawki, w porównaniu z komórkami kontrolnymi zarówno w warunkach niedotlenienia, jak i normoksji. Interesujący wzór zaobserwowano porównując eksperymenty hipoksji i normoksji. Na przykład, obecność 6 μM związku zwiększyła populację komórek G2/M do 38% w komórkach linii 5637 podczas gdy w normoksji w tym stężeniu, 24% komórek, nie zaobserwowaliśmy statystycznie istotnego wzrostu w tej fazie. Obserwacje te potwierdziły, że związek 5 indukował zależne od dawki zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M w komórkach linii 5637, które jest modulowane przez stężenie tlenu. Następnie wykorzystano została macierz przeciwciał Proteome Profiler, aby uzyskać dalszy wgląd w aktywność przeciwnowotworową związku 5 w warunkach normoksji i hipoksji. W eksperymentach normoksji użyto związku 5 w stężeniu 8 μM, podczas gdy w eksperymentach hipoksji użyto niższego stężenia 4 μM. Po trwającej 18 godzin inkubacji przeanalizowano panel 26 białek i stwierdzono, że związek 5 w warunkach hipoksji zwiększył ekspresję HIF-1α, HIF-2α, ADAMTS-1, fosfo-JNK, p21 i fosfo-HSP27 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Są to białka pełniące głównie funkcje regulatorowe aktywności kinaz i czynników transkrypcyjnych, funkcje chaperonowe, metaloproteiny i kinaz seryna/treonina.

Nasze badania wykazały, że w zależności od stężenia, pegylowana kurkumina hamowała cykl komórkowy w fazie G2/M i indukowała ekspresję białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, proliferację komórek i odpowiedź na warunki niedotlenienia. Związek 5 wyłącznie w warunkach hipoksji zwiększał ekspresję białek związanych ze stresem, związanych z sygnalizacją kinazy c-Jun N-końcowej, angiogenezą, modelowaniem ECM i szlakiem sygnałowym p21. Wyniki te sprawiają, że związek 5 jest interesującym związkiem wiodącym do dalszych badań, które, jeśli będą kontynuowane w przyszłości, mogą pozwolić nam lepiej zrozumieć ten mechanizm działania przeciwnowotworowego.

Powyższe badania zostały sfinansowane przez grant OPUS 2019/35/B/NZ7/01165 Narodowego Centrum Nauki.