

Mgr Małgorzata Juszcak

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ocena właściwości biologicznych nowych pochodnych 2-amino-1,3,4-tiadiazolu w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*”

Promotor rozprawy doktorskiej: Prof. dr hab. n. biol. Wojciech Rzeski

STRESZCZENIE

2-amino-1,3,4-tiadiazole są grupą związków o szerokim spektrum aktywności biologicznych, należy tu wymienić właściwości przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i immunomodulujące, antykoagulacyjne, przeciwcukrzycowe przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrybiczne oraz zdolność hamowania rozwoju prątków gruźlicy, zarodźców malarii i leishmanioz. Ponadto, udowodniono aktywność tych związków w centralnym układzie nerwowym, jako czynników przeciwdrgawkowych, przeciwdepresyjnych, przeciwłękowych, przeciwbólowych, a także neuroprotektoryjnych. Szczegółowa charakterystyka aktywności biologicznej 2-amino-1,3,4-tiadiazole została zaprezentowana we Wstępie rozprawy.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była analiza aktywności przeciwnowotworowych i neuroprotektoryjnych dwóch pochodnych 2-amino-1,3,4-tiadiazoli 2-(3-chlorofeniloamino)-5-(2,4-dihydroksyfenyl)-1,3,4-tiadiazolu (ClABT) and 2-(4-bromofeniloamino)-5-(2,4-dihydroksyfenyl)-1,3,4-tiadiazolu (4BrABT). Oceniano zdolność związków do hamowania proliferacji komórek nowotworowych, syntezy DNA oraz indukowania zmian w morfologii komórek nowotworowych. Jednocześnie, zbadano ich wpływ na komórki prawidłowe oraz właściwości protekcyjne 4BrABT, które ujawniła wobec komórek układu nerwowego. Kolejnym etapem badań było określenie molekularnych mechanizmów zaangażowanych w przeciwnowotworowe działanie pochodnych 2-amino-1,3,4-tiadiazolu. Ponadto, badano aktywność związków *in vivo*, w tym wpływ na rozwój indukowanych guzów nowotworowych u szczurów oraz potencjalną toksyczność wobec organizmu.

Przeprowadzone badania wykazały, że ClABT i 4BrABT w sposób zależny od stężenia hamowały proliferację komórek nowotworowych wywodzących się z nowotworów obwodowych (rak płuca A549, piersi T47D, jelita grubego HT-29, białaczki T-limfocytarnej Jurkat E6.1) jak i guzów pochodzących z układu nerwowego (glioma C6, rhabdomyosarcoma/medulloblastoma TE671) oraz syntezę DNA w komórkach nowotworowych. Ponadto, zaobserwowano istotne zmiany morfologiczne w komórkach raka płuca i glioma.

Ponieważ we wstępnych badaniach związek ClABT wykazał silniejszą aktywność przeciwnowotworową, został wybrany do badań na poziomie molekularnym oraz *in vivo*. Badania molekularne przeprowadzono w modelu niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549. Wykazano, że ClABT hamował aktywność szlaku sygnałowego ERK1/2 i czynnika transkrypcyjnego CREB, jak również modyfikował aktywność kinazy Akt. Jednakże zmiany te obserwowano na poziomie białek, bez wpływu na ekspresję

odpowiednich genów. Ponadto, obserwowano zahamowanie cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym przejścia z fazy G1 do fazy S, które było spowodowane podwyższeniem ekspresji białka p27/Kip. Stwierdzono również, że pochodna CIABT nie indukowała apoptozy w komórkach raka płuca.

Kolejnym etapem badań było oznaczenie farmakodynamiki i dystrybucji CIABT w organizmie szczura. Następnie, analizowano wpływ pochodnej na formowanie i rozwój guzów indukowanych podskórnie podaniem zawiesiny komórek glioma C6. W związku z szybką eliminacją i krótkim okresem trwania związku w organizmie szczurów, zdecydowano o podawaniu związku w sposób ciągły, z zastosowaniem pomp osmotycznych. Po 14-dniowym okresie doświadczenia nie wykazano istotnych statystycznie zmian w wielkości guzów nowotworowych w porównaniu z kontrolą, na zbliżonym poziomie pozostawał również potencjał proliferacyjny komórek guzów grupy badanej i kontrolnej. Jednocześnie nie zaobserwowano negatywnego wpływu CIABT na organizm szczurów.

Badanie wpływu CIABT i 4 BrABT na komórki prawidłowe, w tym fibroblasty skóry, hepatocyty, astrocyty, oligodendrocyty i neurony, wykazało brak toksyczności związków w stężeniach aktywnych antyproliferacyjnie wobec komórek nowotworowych. Co więcej, związek 4BrABT ujawnił działanie ochronne wobec komórek pochodzących z układu nerwowego eksponowanych na warunki neurotoksyczne.

Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto wnioski, że pochodne 2-amino-1,3,4-tiadiazolu ujawniły zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych. U podłoża tej aktywności leży hamujący wpływ CIABT na szlak przekazywania sygnału ERK1/2 oraz zdolność zaburzania progresji cyklu komórkowego. Wykazano, że CIABT w dawce 10 mg/kg masy ciała nie hamował rozwoju guzów nowotworowych glioma C6 indukowanych u szczurów. CIABT i 4BrABT nie były toksyczne dla komórek prawidłowych *in vitro*. Co więcej, wykazano ich działanie neuroprotektoryjne. Również w modelu *in vivo* CIABT nie ujawnił toksycznego działania na organizm zwierzęcia.

W dyskusji porównano aktywność ujawnioną przez CIABT i 4BrABT z działaniem związków o zbliżonej strukturze zaprezentowanych w dostępnym piśmiennictwie. Analizowano również aktywność na poziomie molekularnym – wskazano cele molekularne mogące być potencjalnym celem terapii niedrobnokomórkowego raka płuca z wykorzystaniem pochodnej 2-amino-1,3,4-tiadiazolu. Ponadto, dyskutowano możliwość poprawy skuteczności działania związków w modelu *in vivo*. Co więcej, omówiono problemy i możliwości terapii neurotoksyczności oraz neurodegeneracji oraz możliwość wykorzystania w tym aspekcie badanych związków.

Podsumowując, w świetle przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań oraz w oparciu o dostępne piśmiennictwo, nasuwa się wniosek, że pochodne 2-amino-1,3,4-tiadiazolu są atrakcyjnymi związkami pod względem na ich potencjał terapeutyczny. Połączenie właściwości przeciwnowotworowych i neuroprotektoryjnych czyni z nich potencjalne bezpieczne środki lecznicze, ukierunkowane na cel molekularny. W tym kierunku konieczne są jednak dalsze, bardziej szczegółowe badania przedkliniczne.

ABSTRACT

1,3,4-thiadiazole are the group of compounds with a wide spectrum of biological activity, including anticancer, anti-inflammatory and immunomodulatory, anticoagulant, antidiabetic, antimicrobial, antifungal, antiviral as well as the ability to inhibit of *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium malariae* and *Leishmania* growth. Moreover activity of the compounds in central nervous system as an anticonvulsant, antidepressant, anxiolytics and analgesic agent was documented. Their ability to inhibit cancer development has been documented in numerous *in vitro* and *in vivo* studies. Mechanism of action differs, depending on the type of modification of the 1,3,4-thiadiazole ring. To date, many derivatives with different types of modifications, and consequently different mechanisms of action, have been described. Detailed characteristic of biological activity of the 1,3,4-thiadiazole was presented in the "Introduction".

The aim of the doctoral thesis was to investigate the anticancer and neuroprotective activity of two 2-amino-1,3,4-thiadiazole derivatives 2-(3-chlorophenylamino)-5-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole (ClABT) and 2-(4-bromophenylamino)-5-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole (4BrABT). The ability of tested compounds to inhibit cancer cells proliferation, DNA synthesis and morphological changes induction in cancer cells was tested. Simultaneously, their influence on normal cells as well as protective action on nervous system cells revealed by the 4BrABT were analysed. Next, molecular mechanisms involved in 2-amino-1,3,4-thiadiazole derivative action including signaling pathways, cell cycle progression and apoptosis induction were analyzed. Moreover, *in vivo* anticancer activity and potential toxicity of tested compound was also examined.

Performed experiments showed that ClABT and 4BrABT markedly inhibited proliferation of cells derived from peripheral cancers (lung A549, breast T47D, colon HT-29 and T-cell leukemia Jurkat E6.1) and nervous system origin (rhabdomyosarcoma/medulloblastoma TE671 and glioma C6). Moreover, concentration-dependent decreased in DNA synthesis level after compounds treatment in A549, T47D, HT-29 and C6 cancer cells was detected. In lung A549 and glioma C6 cells after 2-amino-1,3,4-thiadiazole treatment, significant morphological changes were observed. Since ClABT derivative in the preliminary studies showed stronger antiproliferative activity than 4BrABT, it was selected to further studies at the molecular and *in vivo* level. The investigation was performed in the model of non-small lung carcinoma A549 cell line. ClABT inhibited activity of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathway as well as CREB transcription factor as well as induced changes in Akt kinase activity. Obtained results suggests that ClABT acts by inhibiting protein phosphorylation and does not affect gene expression. Furthermore, it was shown that ClABT induced cell cycle arrest in the G0/G1 phase and enhanced p27/Kip1 expression. ClABT do not revealed ability to induce apoptosis in lung cancer cells.

Next, pharmacokinetics and distribution of CIABT in rat body were evaluated. The influence of CIABT on the *in vivo* tumor growth was tested by subcutaneous transplantation of C6 glioma cells into young rats and 14 day treatment of the CIABT with use osmotic pumps application. The experiments showed no influence on tumor growth *in vivo*. On the other hand, no side-effects and toxicity in normal tissues were observed.

Additionally, the influence of 2-amino-1,3,4-thiadiazole derivatives on normal cells viability was tested. CIABT and 4BrABT in anticancer concentrations were not toxic to skin fibroblasts (HSF), rat hepatocytes Fao, rat primary astrocytes, neurones and oligodendrocytes (OLN-93). Moreover, 4BrABT exerted protective effect in neurons exposed to neurotoxic conditions (presence of glutamate and trophic stress) and in cisplatin-treated astrocytes and oligodendrocytes.

On the above results it was concluded that tested 2-amino-1,3,4-thiadiazoles revealed ability to inhibit cancer cell proliferation. This effect may be due to inhibition of the ERK1/2 kinase pathway and cell cycle arrest in G0/G1 phase. Our results suggest that FABT acts by inhibiting protein phosphorylation and does not affect gene expression. It has been shown that CIABT in dose of 10 mg/kg body weight did not inhibit the development of glioma C6 tumors induced in rats. CIABT and 4BrABT and were not toxic to normal cells *in vitro*, but even more their neuroprotective activity was shown. Also in *in vivo* study no side effects of CIABT were observed.

In the Discussion activity of CIABT and 4BrABT and compounds with similar structure presented in the available literature was compared. Moreover, activity on the molecular level was analysed as well as molecular targets that could be a potential target for therapy of lung cancer with the use of a 2-amino-1,3,4-thiadiazole were proposed. Next, possibility of improving the effectiveness of the compounds in an *in vivo* model was discussed. Furthermore, problems and treatment options of neurotoxicity and neurodegeneration as well as possibility of use in this aspect of the tested compounds were discussed.

Summing up, in the light of performed study and available literature tested derivative of 2-amino-1,3,4-thiadiazole are attractive compounds in terms of their therapeutic potential. The combination of anticancer and neuroprotective properties makes them a potential safe therapeutic agents in targeted. However, more preclinical studies in this respect are needed.