

Streszczenie

Leki przeciwpsychotyczne stosowane są w leczeniu chorób psychicznych, a ich zażywanie wiąże się z występowaniem wielu działań niepożądanych, takich jak: wzrost masy ciała, zwiększone ryzyko rozwoju cukrzycy oraz chorób sercowo-naczyniowych. Skutki uboczne powiązane są ze zdolnością tych leków do zaburzenia metabolizmu kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Z drugiej strony wiele badań epidemiologicznych wykazało korelację między długotrwałym stosowaniem leków przeciwpsychotycznych, a zmniejszoną zapadalnością na nowotwory. Jedną z cech komórek nowotworowych jest ich odporność na apoptozę oraz większa zdolność do proliferacji i tworzenia przerzutów. Błona komórkowa pełni kluczową rolę w zachowaniu komórek przy życiu, a zmiany w szlakach sygnalizacyjnych związane z traktami lipidowymi są silnie zależne od ilości i rozmieszczenia cholesterolu w komórkach. Z tego powodu ważne jest prowadzenie badań mających na celu identyfikację leków zdolnych do zaburzenia homeostazy lipidowej i modulowania właściwości błon komórek nowotworowych. Jednym z nowotworów, w którym zaobserwowano zwiększony poziom cholesterolu we krwi jest rak jelita grubego (RJG). Nowotwór ten, zajmuje trzecie miejsce wśród całkowitej liczby zachorowań na nowotwory na świecie. Występowanie raka jelita grubego silnie zależy od czynników środowiskowych, w tym niewłaściwej diety oraz otyłości. Leki, zdolne do zmniejszania poziomów kwasów tłuszczowych i cholesterolu mogą więc być obiecującymi kandydatami na substancje uzupełniające leczenie raka jelita grubego.

Celem pracy doktorskiej było zidentyfikowanie leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych zdolnych do selektywnego hamowania wzrostu komórek nowotworowych RJG w porównaniu z komórkami nienowotworowymi oraz określenie ich wpływu na zwiększenie ekspresji genów lipogennych. Dodatkowo sprawdzono antyproliferacyjne działanie badanych leków używanych samodzielnie, a także w kombinacjach z substancjami o udokumentowanym wpływie na metabolizm cholesterolu: simwastatyną oraz betuliną w poszukiwaniu synergii pomiędzy tymi związkami. Większość spośród badanych leków ma dobrze udokumentowane zdolności do oddziaływania z błonami lipidowymi, co potencjalnie może wpływać zarówno na ich właściwości cytotoksyczne, jak i na ich wpływ na poziom cholesterolu w komórce. Dodatkowym celem pracy było określenie wpływu badanych leków na mikrodomeny błonowe wzbogacone w cholesterol i sfingomielinę (tzw. tratwy lipidowe) w układach modelowych.

Badania cytotoksyczności przeprowadzone na liniach komórkowych RJG wykazały, że większość badanych leków przeciwpsychotycznych posiadała znaczną aktywność przeciwnowotworową wobec komórek linii HT29 oraz COLO205. Większą toksycznością charakteryzowały się leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji, niż leki drugiej generacji. Ponadto, wyższą aktywność antyproliferacyjną zaobserwowano wobec komórek linii COLO205. Związki znane ze zdolności do modulowania biosyntezy cholesterolu – simwastatyna (SIM) oraz betulina (BET) również posiadały istotną aktywność cytotoksyczną. Badania przeprowadzone na liniach nienowotworowych, wykazały, że badane leki charakteryzowały się selektywną cytotoksycznością wobec komórek rakowych. Dodatkowo przebadano dwie nowe pochodne BET i wykazano, że pochodna podstawiona jedną grupą acetylową (B1) posiadała znacznie wyższą aktywność przeciwnowotworową od pochodnej zawierającej dwie grupy acetylowe (B2). Trzy leki: trifluoperazyna (TFP), imipramina (IMP) oraz flupentyksol (FLP) działały synergistycznie w kombinacji z SIM, ale jedynie TFP wykazała synergizm również z BET. Dodatkowo połączenie SIM z FLP zwiększyło efekt proapoptyczny tego leku oraz zwiększyło zdolność TFP i IMP do generowania reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych. Wymienione wyżej leki, wykazujące synergizm w połączeniu z SIM mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu przeciwnowotworowym. Stwierdzono, że wszystkie badane leki, oprócz rysperydonu wykazywały zdolność do zwiększania ekspresji genów lipogennych, w tym genów kodujących reduktazę HMG-CoA oraz receptor LDL w komórkach linii nowotworowej RJG. Kolejny etap badań, mający na celu zbadanie wpływu badanych leków na poziom wolnego cholesterolu w komórkach RJG, wykazał, że zarówno SIM, jak i leki przeciwpsychotyczne takie jak FLU, TFP oraz FLP obniżały jego poziom w komórkach linii HT29. Zdolności tej nie zaobserwowano dla BET, natomiast wykazały ją jej acetylowane pochodne. Dodatkowo, TFP, FLP oraz B1 powodowały nierównomierny rozkład cholesterolu, co może oznaczać, że wpływają również na jego rozmieszczenie w błonie komórkowej. Także badania wykonane na ogromnych jednowarstwowych liposomach (GUV) o składzie lipidowym, powodującym pojawienie się w nich mikrodomen dowiodły, że badane związki wpływają na mikrodomeny lipidowe, modyfikując ich pole powierzchni, liczbę oraz kształt. Wydaje się więc, że leki wykazujące synergiczne działanie przeciwnowotworowe w połączeniu z SIM, jednocześnie istotnie wpływają na poziom i rozmieszczenie cholesterolu w komórkach nowotworowych.

Obliczenia fizykochemiczne i modelowanie molekularne, wykazały, że badane związki posiadają wysoką lipofilowość i zdolność do przenikania błon biologicznych, co ma wpływ na

ich aktywność biologiczną. Dodatkowo przeprowadzone badania oddziaływania nowych pochodnych betuliny, B1 oraz B2 z modelowymi błonami lipidowymi za pomocą metod spektrofluorymetrycznych i mikrokalorymetrycznych wykazały, że terpeny te wpływały na termotropowe właściwości dwuwarstw lipidowych. Wyniki otrzymane dla pochodnej B1 wskazują, że posiada ona silniejsze zdolności do interakcji, a także odmienną lokalizację w modelowych błonach lipidowych niż pochodna B2. Różnica ta może stanowić wyjaśnienie jej znacząco wyższej aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek RJG.

Badania wykonane w pracy doktorskiej przyczyniają się do szczegółowego wyjaśnienia mechanizmu działania leków przeciwpsychotycznych na komórki nowotworowe i dostarczają danych istotnych dla ewentualnych prób wprowadzenia niektórych z tych leków do terapii przeciwnowotworowej.

Summary

Antipsychotics are used to treat mental illness, However, their prolonged use is associated with several side effects, such as weight gain, increased risk of developing type II diabetes and cardiovascular diseases. Side effects of antipsychotic drugs are linked to their ability to disturb the fatty acid and cholesterol metabolism. On the other hand, many epidemiological studies have shown a correlation between long-term use of antipsychotics and a reduced incidence of cancer. One of the characteristics of cancer cells is their resistance to apoptosis and their greater ability to proliferate and metastasis. The cell membrane plays a key role in keeping cells alive, and changes in signaling pathways associated with lipid rafts are strongly dependent on the amount and distribution of cholesterol in cells. For this reason, it is important to conduct research to identify drugs capable of disrupting lipid homeostasis and modulating the membrane properties of cancer cells. Colon cancer (CRC) is one of the cancer types in which the increased cholesterol level in serum was observed. This cancer ranks third among the total number of cancers worldwide. The incidence of CRC is strongly influenced by environmental factors, including improper diet and obesity. Drugs capable of reducing levels of fatty acids and cholesterol may therefore be promising candidates as adjuncts to the treatment of CRC.

The aim of the present work was to identify antipsychotic and antidepressant drugs capable of selectively inhibiting the growth of CRC cancer cells compared to non-cancer cells, and to determine their effect on increasing lipogenic gene expression. In addition, the antiproliferative effect of the investigated drugs used alone, as well as in combinations with compounds with documented effects on cholesterol metabolism: simvastatin and betulin, was checked in search

of synergies between these compounds. Most of the drugs tested have well-documented abilities to interact with lipid membranes, potentially influencing both their cytotoxic properties and their effects on cholesterol levels in the cell. An additional aim of this study was to determine the effects of the tested drugs on membrane microdomains enriched in cholesterol and sphingomyelin (lipid rafts) in model systems.

Cytotoxicity studies conducted on CRC cell lines, revealed that the majority of the studied antipsychotics drugs had significant antitumor activity against cells of the HT29 and COLO205 lines. Generally, first-generation antipsychotics had greater cytotoxicity than second-generation drugs. Additionally, COLO205 cells were more vulnerable than HT29 cells. Compounds known for their ability to modulate cholesterol biosynthesis - simvastatin (SIM) and betulin (BET) also had significant cytotoxic activity. Tests conducted on non-cancerous lines, showed that the tested drugs exhibited selective cytotoxicity against cancer cells. In addition, two new BET derivatives were tested and showed that the derivative substituted with one acetyl group (B1) had significantly higher anticancer activity than the derivative containing two acetyl groups (B2). Three antipsychotic drugs: trifluoperazine (TFP), imipramine (IMP) and flupentixol (FLP) acted synergistically in combination with SIM, but only TFP showed synergy also with BET. Moreover, the combination with SIM increased the proapoptotic effect of FLP, and enhanced the ability of TFP and IMP to generate reactive oxygen species in tumour cells. The above-mentioned drugs showing synergy in combination with SIM may find application in anticancer treatment. It was found that all drugs tested, except for risperidone, showed the ability to increase the expression of lipogenic genes, including genes encoding HMG-CoA reductase and the LDL receptor in cells of the CRC cancer line. A further phase of the study to investigate the effects of the drugs tested on free cholesterol levels in CRC cells showed that both SIM and antipsychotic drugs such as FLU, TFP and FLP reduced its levels in HT29 cells. This ability was not observed for BET but was demonstrated by its acetylated derivatives. In addition, TFP, FLP and B1 caused an uneven distribution of cholesterol, which may mean that they also affect its distribution in the cell membrane. Also, studies performed on giant unilamellar liposomes containing raft-mimicking microdomains showed that the tested compounds affect lipid microdomains, modifying their surface area, number, and shape. Thus it was hypothesized that the drugs that behave synergistically in combination with SIM also significantly modify cholesterol level and distribution in cancer cells.

Physicochemical calculations and molecular modeling showed that some of the compounds are highly lipophilic and easily penetrate lipid membranes, which has an impact on their biological

activity. In addition, studies of the interaction of new betulin derivatives, B1 and B2 with model lipid membranes using spectrofluorimetric and microcalorimetric methods showed that these terpenes affected the thermotropic properties of the lipid bilayers. The results obtained for derivative B1 showed that it possessed stronger interaction abilities as well as a different localization in model lipid membranes than derivative B2. This difference may explain its significantly higher antiproliferative activity against CRC cells.

The research carried out in this thesis contributes to the detailed elucidation of the mechanism of action of antipsychotic drugs on cancer cells and provides data relevant to possible attempts to introduce some of these drugs into anticancer therapy.