

STRESZCZENIE

Terminem „witamina D” określa się grupę cząsteczek steroidopodobnych, do których należą m.in. witamina D₂, witamina D₃ i 1 α ,25-dihydroksywitamina D₃ (1,25D; kalcytriol). Ten ostatni związek powstaje w organizmie na skutek przemian witaminy D₃, zachodzących głównie w wątrobie i nerkach. 1,25D jest formą aktywną biologicznie, hormonem, który działa za pomocą swoistego jądrowego receptora witaminy D (VDR), z którym łączy się wewnątrz jej docelowych komórek.

1,25D wywiera wpływ głównie na gospodarkę wapniowo-fosforanową i związane z nią tkanki – jelita, nerki i kości. 1,25D moduluje także funkcjonowanie układu odpornościowego i reguluje procesy proliferacji i różnicowania.

W związku z szerokim zakresem działania 1,25D oraz sukcesami w projektowaniu i wprowadzeniu na rynek leków ukierunkowanych na inne receptory jądrowe, pojawiła się chęć wykorzystania 1,25D w leczeniu chorób takich jak krzywica, osteoporoza, choroby autoimmunologiczne czy nowotwory. Niestety 1,25D ma ograniczone zastosowanie w terapii, ze względu na toksyczne działanie hiperkalcemiczne w dawkach terapeutycznych. Poszukiwano zatem analogów 1,25D, dających mniejsze skutki uboczne, ale z zachowanymi pozostałymi korzystnymi właściwościami. Zsyntetyzowano tysiące związków, ale tylko kilka z nich trafiło na rynek jako leki. Należą do nich kalcyptriol wykorzystywany w leczeniu łuszczycy czy też parykalcytol w terapii wtórnej nadczynności przytarczyc w związku z przewlekłą niewydolnością nerek.

Dotychczasowe syntezy analogów 1,25D odbywają się metodą prób i błędów, a otrzymane związki mają zróżnicowane działanie biologiczne. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy są niejasne podstawy obserwowanego odmiennego działania 1,25D na komórki i tkanki.

Dzięki współpracy z trzema ośrodkami badawczymi otrzymano pięć grup nowo zsyntetyzowanych związków, stanowiących przekrój ligandów receptora VDR o różnych strukturach. Należały do nich analogi z modyfikacją 19-*nor* i modyfikacjami w łańcuchach bocznych oraz pierścieniu A (analogi serii PRI, AF i PB), analogi o strukturze seco-B steroidowej (UNNAT i NAT) oraz pochodne kwasu litocholowego (związki SUNIL), wtórnego kwasu żółciowego, który wiąże się z receptorem VDR z bardzo słabym powinowactwem. Na podstawie dotychczasowych danych literaturowych, można było przypuszczać, że wszystkie te zsyntetyzowane związki będą miały lepsze działanie biologiczne.

W pierwszym etapie badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej scharakteryzowano otrzymane związki. Badania rozpoczęto od określenia powinowactwa ich wiązania do rekombinowanego receptora VDR w teście współzawodnictwa opartego o pomiar polaryzacji fluorescencji. Dla części związków serii AF i PB zakończono badania na tym etapie ze względu na relatywnie słabe powinowactwo. Następnie przystąpiono do badania aktywności biologicznej. W tym celu wykorzystano linie komórkowe stanowiące modele tkanek biorących udział w gospodarce wapniowo-fosforanowej (gruczołakoraka jelita grubego HT-29, HEK293-FRT z embrionalnych komórek nerki, kostniakomięsaka U-2-OS). Dodatkowo wybrano linię komórkową HL-60 ostrej białaczki szpikowej.

W badaniu potencjału do różnicowania komórek HL-60 w kierunku monocytów/makrofagów, określonymu dzięki cytometrii przepływowej, najsilniejsze działanie stwierdzono dla związków serii PRI oraz SUNIL, dlatego na tym etapie dokonano selekcji i zaprzestano badań nad analogami serii AF i PB oraz UNNAT i NAT.

Analogi serii PRI i związki SUNIL analizowano pod kątem ich aktywności biologicznej, badając zdolność do akumulacji receptora VDR we frakcji jądrowej i do aktywacji kinaz ERK1/ERK2 w technice Western blot oraz zdolność do indukcji ekspresji genów związanych z katabolizmem 1,25D

(*CYP24A1*), wchłanianiem wapnia (*TRPV6*) czy różnicowaniem (*CD14*) w komórkach będących modelami tkanek, wykorzystując łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR). Porównując ww. związki stwierdzono, że różna aktywność analogów *in vitro* osiągnięta jest już na poziomie komórki. W kolejnym etapie badań postanowiono zbadać, czy za różną aktywnością może stać ich odmienny transport do wnętrza komórki. W tym celu zbadano ekspresję genów w liniach komórkowych, kodujących białka mogące brać udział w transporcie witaminy D – PDIA3 (MARRS), kubilinę i LRP2 (megalinę). Największą ekspresję wykazywał gen *LRP2* kodujący błonowe białko LRP2 w komórkach linii HEK293-FRT. Przeprowadzono nokaut tego genu wykorzystując technikę CRISPR/Cas9. Wyselekcjonowane klonalne linie komórkowe traktowano analogami serii PRI oraz związkiem SUNIL-1, a następnie ponownie badano ekspresję *CYP24A1*. Uzyskane wyniki nie pozwalają na stwierdzenie, że za różną aktywnością analogów stoi ich odmienny transport przy udziale LRP2.