

I. STRESZCZENIE

Transbłonowe receptory GPCR stanowią zróżnicowaną i szeroką super-rodzinę białek, a badania nad ich funkcją mają istotne znaczenie w kontekście terapii wielu chorób. Wśród receptorów GPCR znajdują się receptory nukleotydowe P2Y należące do klastra receptorów purynowych z grupy δ , wchodzącej w skład rodziny receptorów rodopsynowych. Receptory te stanowią niewielką podrodzinę receptorów GPCR liczącą, według aktualnych danych literaturowych, osiem białek. Mogą one ulegać znaczącej ekspresji w większości komórek ludzkich, uczestnicząc tym samym w regulacji niemal wszystkich procesów fizjologicznych. Naturalnymi agonistami tych receptorów są di- i trifosforany adenozyne oraz urydyny (ADP, ATP, UDP i UTP), a w przypadku receptora P2Y₁₄ pochodne cukrowe nukleotydów, w tym UDP-glukoza. Zgodnie z danymi literaturowymi monofosforany nukleotydów nie stanowią ligandów receptorów P2Y.

Dotychczas zsyntetyzowano wiele związków o charakterze agonistów, a także antagonistów receptorów P2Y. Wśród nich znajdują się analogi naturalnych ligandów tych receptorów, w tym analogi tiofosforanowe, które stanowiły przedmiot badań realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Łącznie w przeprowadzonych przeze mnie badaniach zanalizowano aktywność 23 związków, z których 8 stanowiło niemodyfikowane nukleotydy kontrolne (TMP, UMP, UDP, UTP, CMP, AMP, ADP, ATP), natomiast pozostałe 15 to tiofosforanowe analogi nukleotydów. Wśród nich znalazły się: 5'-*O*-monotiofosforany nukleotydów (TMPS, UMPS, BrUMPS, CMPS, AMPS, dAMPS), 5'-*O*- β -tiodifosforany nukleotydów (UDP β S, CDP β S, ADP β S), 5'-*O*- α -tiotrifosforany nukleotydów (TTP α S, UTP α S, ATP α S), 5'-*O*- γ -tiotrifosforany nukleotydów (UTP γ S, ATP γ S) oraz 5'-*O*- α -tio- β , γ -metylenotrifosforan nukleozydu ($\beta\gamma$ MeTTP α S).

Otrzymane wyniki wskazują, że tiofosforanowe analogi nukleotydów pirymidynowych stymulują wzrost komórek zaangażowanych w proces gojenia, zarówno w warunkach standardowej hodowli, jak również w warunkach hiperglikemicznych, które odnoszą się do warunków panujących w ranie cukrzycowej. Badane związki wywierają największy wpływ na keratynocyty linii HaCaT. Najbardziej efektywne w intensyfikacji metabolicznej aktywności komórek HaCaT oraz w stymulacji ich proliferacji były trifosforan i α -tiotrifosforan urydyny. Na szczególną uwagę zasługuje też aktywność monotiofosforanów nukleotydów (TMPS, UMPS, BrUMPS, CMPS, AMPS, dAMPS), które stymulowały

zarówno przeżywalność, jak i proliferację keratynocytów linii HaCaT, szczególnie w warunkach hiperglikemicznych.

Niektóre z badanych analogów zwiększają w sposób znaczący wydzielanie proangiogenego czynnika wzrostu komórek śródbłonna VEGF-A przez fibroblasty HDFa oraz keratynocyty linii HaCaT. Największy przyrost tego kluczowego dla angiogenezy białka zaobserwowano dla keratynocytów w warunkach hiperglikemicznych. Badania z udziałem komórek linii HaCaT dowiodły, że spośród badanych związków najsilniejszą stymulację produkcji VEGF-A wywołał nie tylko analizowany już wcześniej pod tym kątem ATP γ S, ale także UTP, a zwłaszcza jego tiofosforanowe analogi, UTP α S i UTP γ S. W warunkach hiperglikemicznych stymulacja po inkubacji z tymi związkami była nawet silniejsza w porównaniu z warunkami standardowymi. Warto też podkreślić, że w warunkach hodowli komórek HaCaT w wysokim stężeniu glukozy, stymulację sekrecji VEGF-A wywoływały również monotiofosforany nukleozydów, głównie TMPS, UMPS, CMPS. Związki te były jednocześnie najbardziej aktywne jako stymulatory produkcji czynnika VEGF-A przez fibroblasty w warunkach standardowych. Obserwacje te potwierdzają zatem hipotezę, że 5'-*O*-monotiofosforany nukleozydów mogą stanowić ligandy receptorów nukleotydocowych P2Y.

Hipoteza, że 5'-*O*-monotiofosforany nukleozydów, w przeciwieństwie do niemodyfikowanych 5'-*O*-monofosforanów nukleotydocowych, mogą stanowić ligandy receptorów nukleotydocowych P2Y, została potwierdzona w wyniku badań z wyciszaniem genu odpowiedniego receptora, przeprowadzonych w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ oraz na podstawie badań wykonanych przez dwie firmy zewnętrzne dysponujące komórkami z ekspresją pojedynczych receptorów z rodziny P2Y.

Spośród badanych 5'-*O*-monotiofosforanów nukleozydów na szczególną uwagę zasługuje 5'-monotiofosforan tymidyny, gdyż może on hamować rozwój stanu zapalnego w środowisku rany. Z wykorzystaniem dwóch metod badawczych dowiedziono bowiem, że wykazuje on aktywność antagonisty receptora P2Y₁₄, uczestniczącego w rozwoju odpowiedzi zapalnej *in vivo*.