

## Streszczenie w języku polski

Szacuje się, że 25-30% ludzkiej populacji jest zarażona wewnątrzkomórkowym, kosmopolitycznym pierwotniakiem *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), będącym czynnikiem etiologicznym toksoplazmozy, choroby niebezpiecznej dla osób z obniżoną odpornością oraz rozwijających się płodów. Inwazje *T. gondii* stanowią także problem u zwierząt hodowlanych, szczególnie owiec i świń, ponieważ są przyczyną dużych strat finansowych i reprodukcyjnych. Brak szczepionek dla ludzi oraz odnotowana wzrastająca oporność *T. gondii* na obecnie stosowane leki, wywołujące szereg skutków ubocznych, stały się wyzwaniem dla licznych ośrodków badawczych, poszukujących preparatów szczepionkowych oraz związków o aktywności przeciw *Toxoplasma*. Wysoka selektywność związków wobec pierwotniaka, przy jednocześnie niskiej cytotoksyczności wobec komórek zasiedlanego gospodarza jest podstawą do dalszych badań zmierzających do określenia celu molekularnego dla wyselekcjonowanych związków. Wstępna preselekcja 143 nowych związków będących pochodnymi: tiosemikarbazydu, tiazolu, tiadiazolu, benzotiofenu, tiazolidynonu oraz enancjomeru R talidomidu, pod kątem ich aktywności przeciw *T. gondii* oraz oceny selektywności umożliwiła wytypowanie do dalszych badań pochodne 4-arylotiosemikarbazydu. Jako potencjalne cele molekularne dla pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu wskazano enzymy odpowiedzialne za przemianę aminokwasów aromatycznych: Tyr, Phe i Trp wobec których pasożyt jest auktotrofem. Jednym z istotnych aminokwasów zaangażowanych do tworzenia wakuoli pasożytniczych umożliwiających proces powstawania potomnych tachyzoitów jest tyrozyna przekształcana przez dwie unikalne hydroksylazy aminokwasów aromatycznych (AAH1 i AAH2) do lewodopy. Przeprowadzone badania enzymatyczne oraz zastosowanie testu powinowactwa związku do białka potwierdziło zahamowanie aktywności otrzymanych w systemie ekspresyjnym *Escherichia coli* rekombinowanych białek AAH1 i AAH2 przez dwie pochodne 4-arylotiosemikarbazydu z podstawnikiem 4-nitrofenylowym (**2a**) lub 3-jodofenylowym (**6a**). Natomiast prowadzone badania *in vivo* z użyciem samic myszy domowej szczepu BALB/c potwierdziły brak toksyczności, przy maksymalnej dawce tolerowalnej 1000 mg/kg m.c. Zastosowana terapia nie spowodowała istotnego wzrostu poziomu enzymów wątrobowych czy kreatyniny, a analiza farmakokinetyczna wyselekcjonowanych pochodnych potwierdziła, że związki przedostają się do układu krążenia i przechodzą barierę krew-mózg. Pochodne **2a** oraz **6a** wykazały istotną aktywność przeciw pasożytniczą poprzez eliminację tachyzoitów szczepu RH *T. gondii* podczas ostrej toksoplazmozy u zarażonych myszy oraz redukcję cyst tkankowych szczepu DX *T. gondii* w mózgu, sercu oraz mięśniach. Ponadto, potwierdzono szeroką aktywność biologiczną pochodnych tiosemikarbazydu wykazując, że pochodne 4-arylotiosemikarbazydu mogą blokować szlak NF- $\kappa$ B, który aktywuje odpowiedź zapalną w komórkach. Otrzymane wyniki pozwoliły na opisanie po raz pierwszy mechanizmu działania pochodnych dwóch wyselekcjonowanych 4-arylotiosemikarbazydu na *Toxoplasma gondii* oraz wskazanie tych pochodnych jako związków nadających się do dalszych etapów badań przedklinicznych.

Adrian Bekier

## Streszczenie w języku angielskim

Approximately from 25 to 30% of the human population is infected with the intracellular, cosmopolitan protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), which is an etiological agent of toxoplasmosis, a disease dangerous for immunocompromised individuals and developing fetuses. *T. gondii* infections are also a problem in livestock, especially for sheep and pigs, and cause large financial and reproductive losses. The lack of vaccine for humans and also reported increasing resistance of *T. gondii* to drugs have become a challenge for numerous research centers that look for vaccines and compounds with properties against *Toxoplasma*. The high selectivity of the compounds towards the protozoa with the simultaneous low cytotoxicity towards the host cells, were the basis for further research aimed at determining the molecular target for the active compounds. The initial screening of 143 new compounds that are derivatives of: thiosemicarbazide, thiazole, thiadiazole, benzothiophene, thiazolidinone and the R enantiomer of thalidomide, in terms of their activity against *T. gondii* and selectivity, enabled the selection of 4-arylthiosemicarbazide derivatives for further studies. Since the parasite is an auxotroph towards Tyr, Phe and Trp, enzymes responsible for the conversion of these aromatic amino acids, were indicated as potential molecular targets for selected 4-arylthiosemicarbazide derivatives. One of the amino acids essential for the formation of parasitophorous vacuole and tachyzoites division is Tyr, which is converted by two unique aromatic amino acid hydroxylases (AAH1 and AAH2) to levodopa. Enzymatic studies and the drug affinity responsive target stability assay confirmed the inhibition of recombinant AAH1 and AAH2, obtained in the *Escherichia coli* expression system, by two selected 4-arylthiosemicarbazide derivatives with a 4-nitrophenyl (**2a**) or 3-iodophenyl (**6a**) substituent. On the other hand, *in vivo* studies with female mice of the BALB/c strain confirmed the lack of toxicity of tested compounds and their maximum tolerated dose was higher than 1000 mg/kg. The used therapy did not cause a significant increase in the level of liver enzymes or creatinine, and pharmacokinetic analysis of selected derivatives confirmed that the compounds pass into the bloodstream and cross the blood–brain barrier. Derivatives **2a** and **6a** showed significant antiparasitic activity characterized by prolonged survival of RH infected mice and reduction of tissue cysts burden in brain, heart and muscles of DX infected mice. Moreover, the wide biological activity of thiosemicarbazide derivatives was confirmed again since 4-arylthiosemicarbazide derivatives also possess anti-inflammatory activity defined by their ability to block NF-κB pathway in human monocytes. The obtained results showed for the first time the mechanism of action of two selected 4-arylthiosemicarbazide derivatives on *Toxoplasma gondii* and indicate these derivatives as compounds suitable for further stages of preclinical research.

Adrian Bekier