Mgr inż. Katarzyna Zembrzuska

Wpływ różnych warunków tlenowych i natleniania hiperbarycznego na potencjał proliferacyjny oraz wrażliwość komórek nowotworowych linii złośliwego glejaka T98G traktowanych wybraną pochodną izotiomocznika

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie biologia medyczna

Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Ewa Matyja

IMDiK
POLSKA AKADEMIA NAUK

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 30.05.2018

http://rcin.org.pl

Dziękuję **Pani Prof. dr hab. n. med. Ewie Matyja**
za umożliwienie mi wykonywania pracy
w Zakładzie Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej,
opiekę merytoryczną i życzliwość.

Dziękuję **Panu Dr hab. n. med. Robertowi Ostrowskiemu**
za cenne wskazówki oraz pomoc w realizacji badań.

Dziękuję **Pracownikom**
Zakładu Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej
oraz Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN
za życzliwość i okazaną pomoc.

W szczególności dziękuję mojej **Rodzinie**, a zwłaszcza **Mężowi i Rodzicom**
za wsparcie, wyrozumiałość i motywację do działania.

http://rcin.org.pl

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane z funduszy projektu Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) – Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk.

Część wyników niniejszej pracy była prezentowana na konferencjach międzynarodowych (*Stępień* - nazwisko panieńske autorki):

- **Stępień K.**, Ostrowski R.P., Pucko E.B., Kazimierczuk Z., Matyja E.; *Effect of oxygen deprivation on sensitivity of glioma cell lines to selected cytostatic compounds*; 9th FENS Forum of Neuroscience, 5-9.07.2014, Milan, Italy
- **Stępień K.**, Ostrowski R.P., Pucko E.B., Kazimierczuk Z., Matyja E.; *Sensitivity of glioma cell lines to modified isothiourea derivative (ZKK-3) under anoxia conditions*; 12th International Symposium "Molecular Basis of Pathology and Therapy in Neurological Disorders", 20-21.11.2014, Warsaw, Poland. Abstrakt: ***Folia Neuropathologica, 2014, 52 (3), 360.***
- **Katarzyna Stępień**, Robert P. Ostrowski, Emanuela B. Pucko, Zygmunt Kazimierczuk, Ewa Matyja; *Effect of hypoxic and hyperbaric oxygen conditions on cytotoxic action of modified isothiourea derivative (ZKK-3) against T98G glioblastoma cell line*; 12th International Congress of the Polish Neuroscience Society, 6-8.09.2015, Gdańsk, Poland. Abstrakt: ***Acta Neurobiologiae Experimentalis, 2015, 75 (supplement), S67-68.***
- **Stępień K.**, Ostrowski R.P., Pucko E.B., Kazimierczuk Z., Matyja E.; *Impact of oxygen level changes on proliferation and viability of glioma cell lines treated with selected pentabromobenzylisothiourea*; The 18th ECCO – 40th ESMO European Cancer Congress 2015 (ECC2015), 25-29.09.2015, Vienna, Austria. Abstrakt: ***European Journal of Cancer, September 2015, 51, supplement S3, S62.***
- **Katarzyna Stępień**, Robert P. Ostrowski, Emanuela B. Pucko, Elżbieta Grzywaczewska, Zygmunt Kazimierczuk, Ewa Matyja; *Hyperbaric oxygen as the way to overcome the problem of hypoxia-induced protection of glioblastoma cells against modified isothiourea derivative (ZKK-3)*; GAP 2016 – Challenging Cancer, 24-28.04.2016, Barretos and São Paulo, Brazil.
- **Stępień K.**, Ostrowski R.P., Pucko E.B., Zielińska M., Matyja E.; *Assessment of the therapeutic potential of hyperbaric oxygen combined with selected isothiourea derivative (ZKK-3) in malignant glioma treatment in vitro*; Joint conference of The 13th International Symposium "Molecular basis of pathology and therapy in neurological disorders" and The 4th International Conference "Stem cells: therapeutic outlook for nervous system disorders", 17-18.11.2016, Warsaw, Poland.

http://rcin.org.pl

- **Katarzyna Stępień**, Robert P. Ostrowski, Emanuela B. Pucko, Elżbieta Grzywaczewska, Ewa Matyja; *Impact of selected pentabromobenzylisothiourea (ZKK-3) combined with hyperbaric oxygen therapy on therapeutic response and oxygenation status of T98G glioblastoma cell line*; The 5th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies 2017 (WFNOS 2017), 4-7.05.2017, Zurich, Switzerland.
- **K. Stępień**, R. P. Ostrowski, E. B. Pucko, E. Grzywaczewska, E. Matyja; *Impact of hyperbaric oxygenation on the expression of PKD1 protein forms in T98G glioblastoma cell line treated with selected pentabromobenzylisothiourea (ZKK-3)*; 42nd ESMO Congress (ESMO 2017), 8-12.09.2017, Madrid, Spain. Abstrakt: ***Annals of Oncology, September 2017, 28, supplement 5, 341P***.

Innowacyjność rozprawy

- Ocena wpływu różnych warunków tlenowych na aktywność proliferacyjną złośliwego glejaka *in vitro*.
- Ocena wpływu różnych warunków tlenowych na efekt cytotoksyczny modyfikowanej pochodnej izotiomocznika – N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)-izotiomocznika (ZKK-3).
- Nowatorskie połączenie działania natleniania hiperbarycznego (HBO) i pochodnej izotiomocznika ZKK-3 jako obiecująca strategia terapeutyczna wobec nowotworów glejopochodnych o wysokim stopniu złośliwości histologicznej.

http://rcin.org.pl

Spis treści

Wykaz skrótów …….. 8
Streszczenie ……... 14
Abstract ……. 21
1. Wstęp …….. 28
1.1. Glejaki – pierwotne nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) …….. 29
1.1.1. *Glioblastoma* (GBM) ……. 29
1.2. Hipoksja tkanki nowotworowej ……...…… 33
1.2.1. Czynnik indukowany hipoksją 1 (HIF-1) …….…… 37
1.2.2. Przystosowywanie komórek do warunków hipoksji …….…… 40
1.3. Hiperbaria tlenowa ……...…… 42
1.3.1. Zastosowanie natleniania hiperbarycznego w leczeniu nowotworów …….…….. 44
1.3.1.1. Zastosowanie natleniania hiperbarycznego w skojarzeniu z radioterapią …….……..….…… 44
1.3.1.2. Zastosowanie natleniania hiperbarycznego w połączeniu z chemioterapią …….……... 45
1.3.1.3. Zastosowanie natleniania hiperbarycznego w leczeniu nowotworów glejopochodnych mózgu ……...…. 46
1.4. Pochodne izotiomocznika ……...…. 49
1.4.1. Kinazy białkowe hamowane przez ZKKs ……. 52
1.4.1.1. Kinaza białkowa D1 (PKD1) …….….. 52
1.4.1.2. Inne kinazy białkowe hamowane przez ZKKs ..……..… 56
2. Cel i założenia pracy …….. 61
3. Materiały i metody …….…… 62
3.1. Model badawczy …….…….… 62
3.1.1. Przygotowanie lizatów komórkowych …….…….…… 62
3.2. Badana pochodna izotiomocznika ……...… 63
3.3. Stosowane warunki tlenowe …… 64
3.3.1. Normoksja …….… 64
3.3.2. Anoksja ……..……64
3.3.3. Hipoksja …….……...… 65

http://rcin.org.pl

3.3.4. Hiperbaria tlenowa …… 66
3.3.5. Hipoksja/hipoksja (podwójna hipoksja) …… 67
3.3.6. Hipoksja/hiperbaria tlenowa ……..……...… 68
3.4. Metodyka badawcza …… 69
3.5. Stosowane procedury …….…..… 69
3.5.1. Ocena proliferacji komórek linii T98G ……..… 69
3.5.2. Ocena żywotności komórek linii T98G …..…….…. 70
3.5.3. Oznaczanie całkowitego poziomu białka w lizatach komórkowych …….... 71
3.5.4. Oznaczanie ekspresji białka HIF-1α przy użyciu testu ELISA ……. 71
3.5.5. Oznaczanie ekspresji kinazy białkowej PKD1 i poziomu jej form ufosforylowanych przy użyciu techniki Western Blot ……..… 72
3.5.5.1. Oznaczanie ekspresji kinazy białkowej PKD1 …… 72
3.5.5.2. Oznaczanie poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 916) ….. 74
3.5.5.3. Oznaczanie poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 744/748) ……...… 74
3.6. Analiza statystyczna …….…... 74
4. Wyniki ……. 76
4.1. Ocena proliferacji komórek linii T98G po podaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych …….. 76
4.1.1. Normoksja vs. anoksja ……...…. 76
4.1.2. Normoksja vs. hipoksja …….…. 78
4.1.3. Normoksja vs. hiperbaria tlenowa …….……. 80
4.1.4. Hipoksja vs. hiperbaria tlenowa …….…… 82
4.2. Badanie żywotności komórek linii T98G po podaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych ……..…… 85
4.2.1. Normoksja vs. anoksja ……..….. 85
4.2.2. Normoksja vs. hipoksja …….……...….. 87
4.2.3. Normoksja vs. hiperbaria tlenowa …….. 89
4.2.4. Hipoksja vs. hiperbaria tlenowa ……. 91
4.3. Oznaczanie ekspresji białka HIF-1α po podaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych ……..… 93

http://rcin.org.pl

4.4. Oznaczanie ekspresji kinazy białkowej PKD1 i poziomu jej form ufosforylowanych po podaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych ……...…….…… 94
4.4.1. Oznaczanie ekspresji kinazy białkowej PKD1 …….……...… 94
4.4.2. Oznaczanie poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 916) ……...… 96
4.4.3. Oznaczanie poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 744/748) ….… 98
5. Dyskusja ……...……. 101
5.1. Wpływ warunków niedotlenienia na proliferację oraz żywotność komórek linii T98G poddanych działaniu ZKK-3 ……..…….. 103
5.2. Wpływ natleniania hiperbarycznego na proliferację oraz żywotność komórek linii T98G poddanych działaniu ZKK-3 …… 105
5.3. Wpływ różnych warunków tlenowych na ekspresję białka HIF-1α …….. 109
5.4. Wpływ pochodnej izotiomocznika ZKK-3 oraz różnych warunków tlenowych na ekspresję kinazy białkowej PKD1 i poziom jej form ufosforylowanych ……..…… 112
5.5. Podsumowanie ……...… 115
6. Wnioski …….……...…. 116
Bibliografia ……...….. 117

http://rcin.org.pl

Wykaz skrótów

5-FU – 5-fluorouracyl (ang. 5-*fluorouracil*)

acetylo-CoA – acetylokoenzym A (ang. *acetyl coenzyme A*)

ACNU – nimustyna (ang. *nimustine*)

AKT – kinaza białkowa B (ang. *protein kinase B, PKB*)

AMPK – kinaza aktywowana 5'AMP (ang. *5'AMP-activated protein kinase*)

Arnt1 – białko translokacyjne wiążące jądrowy receptor dla węglowodorów aromatycznych typu 1 (ang. *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 1*)

ATA – atmosfera absolutna (ang. *atmosphere absolute*)

Bad/ Bak/ Bax/ BNIP3 – białka proapoptotyczne z rodziny Bcl-2

BCA – kwas bicinchoninowy (ang. *bicinchoninic acid*)

Bcl-2 – białko antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*)

Bcl-W – białko antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2

Bcl-Xl – dłuższa forma białka genu *Bcl-x* (ang. *B-cell lymphoma-extra large*)

Bcl-Xs – krótsza forma białka genu *Bcl-x* (ang. *B-cell lymphoma-extra short*)

bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*)

bHLH – domena białkowa o budowie helisa-zwrot-helisa (ang. *basic helix-loop-helix*)

BSA – albumina surowicy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*)

C6 – linia komórkowa szczurzego złośliwego glejaka *glioblastoma*

c-Abl – komórkowa niereceptorowa kinaza tyrozynowa (ang. *cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*)

CAD – C-końcowa domena aktywacyjna białka HIF-1 (ang. *C-terminal activation domain*)

CA-IX – anhydraza węglanowa IX (ang. *carbonic anhydrase IX*)

CD133 – antygen różnicowania komórkowego 133 (ang. *cluster of differentiation 133*)

CD44 – antygen różnicowania komórkowego 44 (ang. *cluster of differentiation 44*)

CDK4 – kinaza zależna od cyklin 4 (ang. *cyclin-dependent kinase 4*)

CDKN2A/ 2B – gen kodujący inhibitor kinaz zależnych od cyklin 2A/2B (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B gene*)

c-Jun – komórkowy protoonkogenny czynnik transkrypcyjny

CK2 – kinaza kazeinowa 2 (ang. *casein kinase 2*)

http://rcin.org.pl

COX-2 – gen kodujący cyklooksygenazę 2 indukowaną (ang. *cyclooxygenase 2*)

c-Src – komórkowa kinaza tyrozynowa (ang. *cellular proto-oncogene tyrosine-protein kinase*)

DMAT – 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-benzimidazol

EGFP – wzmocnione białko zielonej fluorescencji (ang. *enhanced green fluorescent protein*)

EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ERK/ ERK8 – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym/ 8 (ang. *extracellular signal regulated kinase/ 8*)

Etk – proapoptotyczna białkowa kinaza tyrozynowa (ang. *Escherichia coli tyrosine kinase*)

Ets1 – protoonkogenny czynnik transkrypcyjny (ang.*E26transformation-specific 1*)

FAD – dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. *flavin adenine dinucleotide*)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. *Fetal Bovine Serum*)

Fos – czynnik transkrypcyjny

FoxM1 – czynnik transkrypcyjny M1 z rodziny Forkhead (ang. *forkhead box protein M1*)

GBM – glejak złośliwy (ang. *glioblastoma*)

GLUT-1/ GLUT-3 – transporter glukozy 1/3 (ang. *glucose transporter 1/3*)

GPCR – receptor sprzężony z białkiem G (ang. *G-protein-coupled receptor*)

HBO – tlen hiperbaryczny (ang. *hyperbaric oxygen*)

Hec1 – czynnik transkrypcyjny (ang. *highly expressed in cancer protein*)

HIF-1/ HIF-2/ HIF-3 – czynnik indukowany hipoksją 1/2/3(ang. *hypoxia inducible factor 1/2/3*)

HIF-1α/ HIF-1β – podjednostka alfa/beta czynnika indukowanego hipoksją 1 (ang. *hypoxia inducible factor 1α/1β*)

HIF-2α/ HIF-2β – podjednostka alfa/beta czynnika indukowanego hipoksją 2 (ang. *hypoxia inducible factor 2α/2β*)

HIF-3α – podjednostka α czynnika indukowanego hipoksją 3 (ang. *hypoxia inducible factor 3α*)

HL-60 – linia komórkowa ludzkiej białaczki promielocytowej (ang. *human promyleocytic leukemia*)

http://rcin.org.pl

HR – receptor hybrydowy powstały z połączenia podjednostek receptora IR z podjednostkami receptora IGF-1R

HR-A/ HR-B – receptor hybrydowy powstały z połączenia podjednostek receptora IR-A/IR-B z podjednostkami receptora IGF-1R

HREs – elementy odpowiedzi na hipoksję (ang. *hypoxia response elements*)

HRP – peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)

IAR – terapia kombinowana interferonu-beta, nimustyny i radioterapii

IDH1/ IDH2 – gen kodujący dehydrogenazę izocytrynianową 1/2 (ang. *Isocitrate dehydrogenase 1/2 gene*)

IDO – 2,3-dioksygenaza indoloaminy (ang. *Indoleamine 2,3-dioxogenase*)

IGF-1/ IGF-2 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1/2 (ang. *insulin-like growth factor 1/2*)

IGF-1R – receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. *insulin-like growth factor 1 receptor*)

IGFBPs – białka wiążące IGFs (ang. *IGF-binding proteins*)

IKK – kinaza inhibitora kappa B (ang. *inhibitor kappa B kinase*)

IL-2/ IL-3/ IL-6 – interleukina 2/3/6 (ang. *interleukin 2/3/6*)

IR – receptor insuliny (ang. *insulin receptor*)

IR-A/ IR-B – krótsza/dłuższa izoforma receptora insuliny

JAK – kinaza Janusowa (ang. *Janus kinase*)

JNK – N-terminalna kinaza białka c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal kinases*),

K-562 – linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *human chronic erythromyeloblastoid leukemia*)

KG-1 – linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki szpikowej (ang. *human acute myelogenous leukemia*)

LN229 – linia komórkowa ludzkiego gwiaździaka (ang. *astrocytoma*)

M-6-PR – receptor mannozo-6-fosforanu i IGF-2 (ang. *IGF-2/mannose 6-phosphate receptor*)

MAD1/2 – białko punktu kontroli poprawności złożenia wrzeciona mitotycznego 1/2 (ang. *mitotic arrest deficient 1/2*)

MAPK/ MAPK15 – kinaza białkowa aktywowana mitogenami/ 15 (ang. *mitogen-activated protein kinases/ 15*)

Max – czynnik transkrypcyjny X związany z Myc (ang. *Myc-associated factor X*)

MEK – kinaza fosforylująca i aktywująca ERK (ang. *ERK kinase*)

MEM – minimalna pożywka Eagle'a (ang. *Minimum Essential Medium Eagle*)

http://rcin.org.pl

MGMT – gen kodujący metylotransferazę O^6-metyloguaniny-DNA (ang. *O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene*)

mROS – mitochondrialne reaktywne formy tlenu (ang. *mitochondrial reactive oxygen species*)

MTIC – 5-(3-metylo-(triazeno-1-yl))imidazolo-4-karboksyamid (ang. *5-(3-methyltriazen-1-yl) imidazole-4-carboxamide*)

mTOR – gen kodujący kinazę białkową serynowo/treoninową zwaną ssaczym celem rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycin kinase gene*)

MTS – sól 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazolowa

Myc (c-Myc) – protoonkogenny czynnik transkrypcyjny (ang. *cellular homologue to the transforming sequences of the avian myelocytomatosis retrovirus*)

NAD – N-końcowa domena aktywacyjna białka HIF-1 (ang. *N-terminal activation domain*)

NADPH – forma zredukowana estru fosforanowego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NEK2A – izoforma A kinazy 2 związanej z NIMA (ang. *Never in Mitosis (NIMA) related kinase 2 A*)

NF-κB – jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NOSs – syntazy tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthases*)

nPKC - nowe izoformy kinazy białkowej C (ang. *novel isoforms of protein kinase C*)

ODD – domena białkowa odpowiedzialna za degradację zależną od tlenu (ang. *oxygen-dependent degradation domain*)

OUN – ośrodkowy układy nerwowy

p21/ p27– inhibitor kinaz zależnych od cykliny 1A/1B (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A/1B*)

p53 – białko o masie cząsteczkowej 53kDa

PAS – domena białka HIF-1 odpowiedzialna za wiązanie DNA i dimeryzację (ang. *PER-ARNT-SIM homology domain*)

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanem (ang. *phosphate-buffered saline*)

PDGF-B – płytkopochodny czynnik wzrostu B (ang. *platelet-derived growth factor B*)

PDHK1 – gen kodujący kinazę dehydrogenazy pirogronianowej 1 (ang. *pyruvate dehydrogenase kinase 1 gene*)

http://rcin.org.pl

PGC-1α – koaktywator 1α receptora PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

P-gp – glikoproteina P (ang. *P-glycoprotein*)

PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositol-3-kinase*)

PIM1/ PIM2/ PIM3 – kinaza 1/2/3 z rodziny kinaz serynowo/treoninowych PIM (ang. *proviral integration site for Moloney murine leukemia virus 1/2/3*)

PIM1L – dłuższa izoforma kinazy PIM1, zlokalizowana przy błonie komórkowej

PIM1S – krótsza izoforma kinazy PIM1, zlokalizowana w jądrze komórkowym

PKC – kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*)

PKCμ – izoforma my kinazy białkowej C (ang. *protein kinase Cμ*)

PKCδ – izoforma delta kinazy białkowej C (ang. *delta isoform of protein kinase C*)

PKD1/ PKD2/ PKD3 – kinaza białkowa D1/2/3 (ang. *protein kinase D1/2/3*)

PLK1 – polokinaza 1 (ang. *polo-like-kinase 1*)

PMSF – fluorek fenylometylosulfonylu (ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

pO_2 – ciśnienie cząstkowe tlenu (ang. *oxygen partial pressure*)

pPKD1 (Ser 744/748) – forma PKD1 ufosforylowana na resztach seryn 744 i 748

pPKD1 (Ser 916) – forma PKD1 ufosforylowana na reszcie seryny 916

PTD – domena transdukcji białka (ang. *protein transduction domain*)

PTEN – gen kodujący homolog fosfatazy i tensyny (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 gene*)

RAF – białkowa kinaza serynowo/treoninowa (ang. *serine/threonine-protein kinase*)

RAS – rodzina małych GTPaz posiadających właściwości onkogenne (ang. *rat sarcoma viral onkogenne homolog protein family*)

RIPA – radioimmunoprecypitacyjna liza komórek (ang. *radio immunoprecipitation assay*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

RT – radioterapia (ang. *radiotherapy*)

SHC – białko adaptorowe (ang. *Src-homology collagen protein*)

siRNA – krótkie interferujące RNA (ang. *small intefering RNA*)

SNAI1/ SNAI2 – czynnik hamujący transkrypcję 1/2 (ang. *snail family transcriptional repressor 1/2*)

SOD2 – gen kodujący dysmutazę ponadtlenkową 2 (ang. *superoxide dismutase 2*)

Sp1 – białko specyficzności 1 (ang. *specificity protein 1*)

Src – niereceptorowa kinaza tyrozynowa (ang. *proto-oncogene tyrosine-protein kinase*)

http://rcin.org.pl

SRSF1 – czynnik splicingowy bogaty w serynę/argininę 1 (ang. *serine/arginine-rich splicing factor 1*)

STAT3/ STAT5 – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3/5 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3/5*)

T98G – linia komórkowa ludzkiego złośliwego glejaka - *glioblastoma*

TBB – 4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzotriazol

TBI – 4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

TBS – bufor płuczący przygotowany na bazie Tris i NaCl

TCTP – białko antyapoptotyczne fortilina (ang. *translationally controlled tumor protein, fortilin*)

TGF-β – transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor β*)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna (ang. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*)

TMZ – temozolomid (ang. *temozolomide*)

TP53 – gen kodujący białko P53 (ang. *tumor protein p53*)

TRG-1 – receptor 1 komórek T z łańcuchem gamma (ang. *T cell receptor gamma locus 1*)

tTBS – bufor płuczący TBS z dodatkiem Tween-20

Twist – czynnik transkrypcyjny z rodziny białek bHLH

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*)

VEGFR – receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*)

VHL – białko von Hippel-Lindau (ang. von Hippel–Lindau protein)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

WHO GI/ III/ IV – stopień złośliwości histologicznej I /III/IV wg WHO

Wnt – ścieżka sygnałowa regulująca embriogenezę, różnicowanie, przeżywalność i proliferację komórek (ang. *Wingless-related integration site*)

ZEB1 – czynnik transkrypcyjny (ang. *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*)

ZKK-1 – S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)izotiomocznik

ZKK-3 – N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)izotiomocznik

ZKKs – S-benzylopochodne izotiomocznika

http://rcin.org.pl

Streszczenie

Glioblastoma (GBM) jest najczęściej występującym nowotworem pierwotnym ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o najwyższym, IV stopniu złośliwości histologicznej wg klasyfikacji WHO. Standardowe leczenie w przypadku złośliwego glejaka oparte jest na leczeniu operacyjnym, radioterapii oraz chemioterapii. Rozlany charakter wzrostu uniemożliwia całkowitą resekcję chirurgiczną zmiany nowotworowej i prowadzi do szybkiej wznowy. Pomimo rozwoju nowoczesnych technik stosowanych w diagnostyce i leczeniu glejaków, prognoza kliniczna dla pacjentów ze zdiagnozowanym GBM pozostaje niekorzystna, a średnie przeżycie na ogół nie przekracza 16 miesięcy. Wprowadzony do leczenia glejaków chemioterapeutyk, jakim jest temozolomid, pozwala na wydłużenie czasu przeżycia pacjentów zaledwie o kilka miesięcy. Prowadzone są więc intensywne badania nad rozwojem nowoczesnych metod leczenia, w tym immunoterapii, terapii antyangiogennych oraz eksperymentalnych terapii genowych.

Znaczącą rolę w progresji złośliwych glejaków oraz oporności komórek nowotworowych na leczenie odgrywa wysoki poziom niedotlenienia tkanki nowotworowej. W warunkach niewystarczającego zaopatrzenia w tlen, w komórkach nowotworowych dochodzi do szeregu niekorzystnych zmian metabolicznych, nasilenia angiogenezy oraz zaburzenia procesu apoptozy. Głównym czynnikiem transkrypcyjnym, zaangażowanym w regulację procesów adaptacyjnych, jest czynnik indukowany hipoksją HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor 1*), zbudowany z dwóch podjednostek: α i β. Poziom podjednostki α (HIF-1α) wykazuje ścisłą zależność od poziomu natlenowania komórek.

Jedną z atrakcyjnych metod uzyskania poprawy stanu natlenowania tkanki nowotworowej oraz zahamowania aktywności białka HIF-1α wydaje się być hiperbaria tlenowa (HBO). Podawanie tlenu pod zwiększonym ciśnieniem pozwoliłoby na wydłużenie dystansu dyfuzji i dotarcia O_2 do głębszych, często źle ukrwionych partii guza. Należy spodziewać się, że lepiej natlenowana tkanka nowotworowa stanie się bardziej podatna na stosowane formy terapii. Tlen hiperbaryczny jest powszechnie wykorzystywany w leczeniu m.in. trudno gojących się ran, choroby dekompresyjnej oraz zatruć tlenkiem węgla. Hiperbarię tlenową próbowano również stosować w onkologii, szczególnie w połączeniu z innymi,

http://rcin.org.pl

dotychczas stosowanymi formami terapii: radioterapią, chemioterapią, terapią fotodynamiczną oraz leczeniem operacyjnym. Niektóre z tych badań doprowadzono do fazy badań klinicznych, jednakże nie udało się opracować procedury medycznej, która mogłaby być powszechnie stosowana w leczeniu pacjentów z chorobą nowotworową.

Progresja nowotworów prowadzi do wykształcenia mechanizmów oporności na leczenie. Z tego względu zachodzi konieczność opracowywania nowatorskich terapii z zastosowaniem bardziej efektywnych chemioterapeutyków. Nową, obiecującą grupę związków cytotoksycznych stanowią heterocykliczne pochodne izotiomocznika, szczególnie S-benzylopochodne - tzw. pentabromo-benzyloizotiomoczniki, w skrócie ZKKs. Związki tej grupy były przedmiotem badań *in vitro*, w których potwierdzono ich działanie proapoptotyczne i cytotoksyczne względem różnych komórek nowotworowych, w tym linii komórkowej *glioblastoma*. Budowa strukturalna ZKKs zbliżona jest do związków z grupy benzotriazoli (TBB) i benzimidazoli (TBI, DMAT), które są znanymi inhibitorami kinazy kazeinowej 2 (CK2). Wzmożona aktywność tej kinazy zwiększa potencjał czynników onkogennych i sprzyja transformacji nowotworowej. Ze względu na podobieństwo strukturalne do znanych inhibitorów CK2 oczekiwano, że ZKKs również będą efektywnie hamowały aktywność tej kinazy. Jednak badania na szerokim panelu kinaz białkowych wykazały, że ZKK-3 (N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)izotiomocznik) słabo hamuje CK2, posiada natomiast zdolność do specyficznej inhibicji innych kinaz, w tym kinazy białkowej D1 (PKD1). Kinaza ta odpowiada za regulację detoksykacji reaktywnych form tlenu i azotu, powstających w mitochondriach i chroni komórki przed stresem oksydacyjnym. Zaburzenia ekspresji PKD1 sprzyjają rozwojowi licznych procesów patologicznych, w tym także chorób nowotworowych. Można przypuszczać, że poprzez regulację poziomu PKD1, można byłoby wpływać na rozwój procesów nowotworowych.

http://rcin.org.pl

Celem prowadzonych badań była ocena wpływu różnych warunków tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego, na potencjał przeciwnowotworowy wybranej pochodnej izotiomocznika – ZKK-3 wobec komórek nowotworowych linii złośliwego glejaka T98G *in vitro*.

Cele szczegółowe obejmowały:

1) Porównanie proliferacji oraz żywotności komórek nowotworowych linii T98G w różnych warunkach tlenowych: normoksji, anoksji oraz hipoksji.
2) Ocenę wpływu natleniania hiperbarycznego na proces proliferacji oraz żywotność komórek nowotworowych linii T98G.
3) Ocenę wpływu HBO na poziom ekspresji białka HIF-1α w komórkach nowotworowych linii T98G.
4) Ocenę efektu cytotoksycznego pochodnej izotiomocznika ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych oraz przy zastosowaniu natleniania hiperbarycznego.
5) Ocenę wpływu ZKK-3 na poziom ekspresji kinazy białkowej PKD1 oraz poziom jej form ufosforylowanych: pPKD1 (Ser 916) i pPKD1 (Ser 744/748) w różnych warunkach tlenowych oraz przy zastosowaniu natleniania hiperbarycznego.

Przyjęta hipoteza badawcza zakładała, że podawanie tlenu hiperbarycznego pozwoli na obniżenie stopnia niedotlenienia komórek *glioblastoma* linii T98G, uwrażliwiając je tym samym na działanie wybranej pochodnej izotiomocznika, co mogłoby stanowić potencjalnie skuteczną linię działania w terapii przeciwnowotworowej. Można było przypuszczać, że hamowanie aktywności kinazy PKD1 przez ZKK-3 może spotęgować stres oksydacyjny i w związku z tym nasilić efekt antyproliferacyjny proponowanego połączenia ZKK-3/HBO.

Doświadczenia prowadzono na ludzkiej linii komórkowej złośliwego nowotworu glejopochodnego - *glioblastoma* T98G (*American Type Culture Collection*) o IV-tym stopniu złośliwości histologicznej wg klasyfikacji WHO (WHO GIV).

Do badań efektu cytotoksycznego użyto modyfikowanej pochodnej izotiomocznika – N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)izotiomocznika (ZKK-3), stosowanej w stężeniach 10 μM, 25 μM i 50 μM.

http://rcin.org.pl

Hodowle komórkowe poddane były działaniu różnych warunków tlenowych:
1/ normoksja (21% O_2/ 5% CO_2/ 74% N_2) - 24-godzinna inkubacja po podaniu ZKK-3
2/ anoksja (5% CO_2/ 95% N_2) – 24-godzinna inkubacja po podaniu ZKK-3
3/ hipoksja (1% O_2/ 5% CO_2/ 94% N_2) – 24-godzinna inkubacja po podaniu ZKK-3
4/ hiperbaria tlenowa (HBO, 97,5% O_2/ 2,5% CO_2, ciśnienie 2 ATA) – 1-godzinna inkubacja po podaniu ZKK-3, a następnie 23-godzinna inkubacja w warunkach normoksyjnych
5/ hipoksja/hipoksja (podwójna hipoksja) – 24-godzinna preinkubacja w warunkach hipoksyjnych przed podaniem ZKK-3, następnie przedłużenie hipoksji przez kolejne 24 godziny
6/ hipoksja/hiperbaria tlenowa – 24-godzinna preinkubacja w warunkach hipoksyjnych przed podaniem ZKK-3, następnie analogicznie jak w pkt 4.

Oceniano proliferację oraz żywotność komórek *glioblastoma* linii T98G, traktowanych ZKK-3 w warunkach standardowych (normoksja), niedoboru tlenu (anoksja, hipoksja) oraz hiperbarii tlenowej (HBO). Oceny proliferacji dokonywano po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3 w liczniku *Multisizer 3 Coulter Counter* (Beckman Coulter). Żywotność komórek określano po 24 i 48 godzinach inkubacji z ZKK-3, posługując się zmodyfikowanym testem cytotoksyczności MTS z wykorzystaniem odczynnika CellTiter 96®AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Badano również wpływ HBO na poprawę stopnia natlenowania komórek nowotworowych poprzez oznaczenie poziomu ekspresji białka HIF-1α w lizatach komórkowych metodą testu ELISA. Ekspresję kinazy PKD1 oraz poziom jej form ufosforylowanych, pPKD1 (Ser 916) i pPKD1 (Ser 744/748), w komórkach *glioblastoma* oceniano przy użyciu techniki Western Blot.

Uzyskane wyniki pokazują, że w warunkach normoksji następuje istotne statystycznie obniżenie proliferacji komórek ludzkiej linii *glioblastoma* T98G traktowanych ZKK-3 w stężeniach 25 μM i 50 μM. Wraz ze wzrostem stężenia badanej pochodnej izotiomocznika istotnie maleje także żywotność komórek linii T98G po 24 i 48 godzinach inkubacji.

W warunkach beztlenowych liczba komórek glejaka również ulega znaczącemu obniżeniu po podaniu ZKK-3, jednak spadek ten jest mniej gwałtowny

http://rcin.org.pl

niż w warunkach standardowych. Co więcej, sama anoksja powoduje istotne spowolnienie proliferacji nawet bez dodatku ZKK-3 w porównaniu do normoksji. Jednakże żywotność komórek w anoksji jest zdecydowanie wyższa niż w warunkach standardowych, zarówno w grupach kontrolnych, jak i doświadczalnych po 24 i 48 godzinach inkubacji z ZKK-3 w stężeniu 10 μM i 25 μM. Znaczący efekt cytotoksyczny testowanego związku w warunkach anoksji obserwowany jest dopiero przy wyższych stężeniach i przedłużonej ekspozycji na działanie ZKK-3.

Zastosowanie samej hipoksji, jak również połączonej z podaniem ZKK-3 w stężeniu 10 μM nie powoduje znaczących różnic w proliferacji komórek linii T98G w porównaniu do warunków normoksji. Dopiero podanie wyższych stężeń ZKK-3 wywołuje istotny statystycznie spadek liczby komórek, niezależnie od warunków tlenowych. Ponadto, po zastosowaniu 50 μM ZKK-3 liczba komórek w warunkach obniżonego stężenia tlenu jest istotnie wyższa niż w warunkach standardowych. Sama hipoksja znacząco obniża natomiast żywotność komórek *GBM in vitro* w porównaniu do normoksji zarówno po 24, jak i 48 godzinach. W warunkach niedotlenienia tylko przy stężeniu 50 μM badany związek wywołuje spadek żywotności komórek linii T98G w sposób istotny statystycznie, zarówno po jedno-, jak i dwudniowej ekspozycji. Co więcej, po 48 godzinach inkubacji z badaną pochodną izotiomocznika w stężeniu 10 μM i 25 μM żywotność komórek jest wyższa w warunkach obniżonego stężenia tlenu niż w warunkach standardowych.

Hiperbaria tlenowa podawana samodzielnie nie zmienia proliferacji oraz żywotności komórek linii T98G, zarówno w porównaniu do warunków standardowych, jak i niedotlenienia. Jednoczesne stosowanie HBO i ZKK-3 w stężeniu 50 μM skutkuje istotnie statystycznie większym obniżeniem liczby komórek *glioblastoma in vitro*, niż w warunkach normoksji. Żywotność komórek linii T98G traktowanych testowaną pochodną izotiomocznika również ulega zmniejszeniu pod wpływem natleniania hiperbarycznego. Po 24-godzinnej inkubacji z ZKK-3, spadek liczby żywych komórek w warunkach HBO jest znacząco większy w porównaniu do normoksji jedynie po podaniu badanego związku w stężeniu 50 μM. Jednak po 48 godzinach istotne statystycznie różnice pomiędzy warunkami HBO i normoksji obserwuje się także przy niższych stężeniach ZKK-3.

http://rcin.org.pl

Bezpośrednie porównanie proliferacji komórek glejaka *in vitro* w warunkach hiperbarii tlenowej i hipoksji pokazuje, że w obu warunkach tlenowych wzrost komórek linii T98G jest znacząco spowolniony po podaniu ZKK-3 w stężeniach 25 μM i 50 μM. Jednakże istotnie statystycznie silniejszy efekt cytotoksyczny badanej pochodnej izotiomocznika uzyskuje się po połączeniu z HBO. Co więcej, pod wpływem tlenu hiperbarycznego ZKK-3 znacząco redukuje żywotność komórek nowotworowych już przy stężeniu 10 μM. Wrażliwość komórek na działanie testowanego związku jest zdecydowanie wyższa w warunkach HBO niż w przypadku hipoksji, niezależnie od czasu ekspozycji na działanie ZKK-3. Jedynie po podaniu ZKK-3 w stężeniu 50 μM, niezależnie od warunków tlenowych oraz czasu inkubacji, nie obserwuje się różnic istotnych statystycznie.

Przeprowadzone badania potwierdzają, że poziom białka HIF-1α w komórkach linii T98G ściśle zależy od warunków tlenowych w jakich są one hodowane. W komórkach utrzymywanych w hipoksji ekspresja HIF-1α jest znacząco wyższa w porównaniu do warunków standardowych. Wydłużenie czasu niedotlenienia (preinkubacja w warunkach hipoksji przed podaniem ZKK-3) sprawia, że wzrost poziomu HIF-1α jest jeszcze większy. Z drugiej strony, ekspozycja na działanie HBO nie powoduje istotnych zmian w poziomie HIF-1α w porównaniu do normoksji. Wyjątek stanowią lizaty z grupy hipoksja/HBO traktowane wyższymi stężeniami ZKK-3, w których odnotowuje się znaczące obniżenie poziomu badanego białka. Co więcej, bezpośrednie porównanie ekspresji HIF-1α w grupach preinkubowanych w analogicznych warunkach tlenowych pokazuje, że podawanie HBO prowadzi do znacznego zahamowania aktywności badanego białka w stosunku do hipoksji.

Testowana pochodna pentabromobenzyloizotiomocznika nie wpływa znacząco na ekspresję kinazy białkowej D1 (PKD1) w komórkach *glioblastoma in vitro*. Inkubacja z ZKK-3 w stężeniu 50 μM skutkuje natomiast istotnym statystycznie spadkiem poziomu pPKD1 (Ser 916), niezależnym od stosowanych warunków tlenowych, jak również znaczącym wzrostem poziomu pPKD1 (Ser 744/748) w warunkach standardowych, hipoksji oraz HBO. Wysoce prawdopodobnym wydaje się zatem, że podawanie wysokiego stężenia ZKK-3 zapobiega fosforylacji PKD1 właśnie na reszcie Ser 916.

http://rcin.org.pl

Ekspresja PKD1 w komórkach linii T98G nie ulega istotnym zmianom pod wpływem różnych warunków tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego, zarówno w grupie kontrolnej jak i grupach traktowanych ZKK-3. W hodowlach, którym nie podano związku cytotoksycznego, następuje znaczący spadek poziomu pPKD1 (Ser 916) w hipoksji, HBO oraz podwójnej hipoksji. Z kolei w przypadku pPKD1 (Ser 744/748) jedynie w grupie kontrolnej dochodzi do znaczącego wzrostu aktywności w warunkach hipoksja/HBO w stosunku do normoksji.

Wnioski

- Brak tlenu (anoksja) oraz warunki obniżonego poziomu tlenu (hipoksja) osłabiają efekt cytotoksyczny pochodnej izotiomocznika ZKK-3 i sprzyjają lepszej przeżywalności komórek *glioblastoma* w warunkach *in vitro*.
- Podanie tlenu hiperbarycznego istotnie obniża proliferację komórek linii złośliwego glejaka T98G oraz zwiększa ich wrażliwość na testowaną pochodną izotiomocznika – ZKK-3. Korzystny efekt cytotoksyczny ZKK-3/HBO można uzyskać przy niższych stężeniach badanego związku oraz po krótszym czasie ekspozycji.
- Poziom białka HIF-1α w komórkach linii T98G wzrasta w warunkach hipoksji, natomiast ulega obniżeniu pod wpływem natleniania hiperbarycznego. Może to sugerować, że HBO zmniejszając niedotlenienie i poziom markerów hipoksji, obniży oporność komórek nowotworowych na działanie cytostatyków.
- Spadek poziomu pPKD1 (Ser 916) po podaniu ZKK-3 wskazuje, że badana pochodna pentabrombenzyloizotiomocznika wykazuje właściwości inhibitora względem tej formy kinazy białkowej D1.
- Brak znaczących różnic w poziomie PKD1 i jej ufosforylowanych form w komórkach *glioblastoma* poddawanych działaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego, sugeruje, że hamowanie aktywności kinazy białkowej D1 nie jest wiodącym mechanizmem działania cytotoksycznego ZKK-3/HBO.
- Połączenie pochodnej izotiomocznika ZKK-3 i natleniania hiperbarycznego można rozważać jako obiecujące podejście terapeutyczne w leczeniu nowotworów mózgu o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej.

http://rcin.org.pl

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most frequent primary tumour of the central nervous system corresponding histologically to the highest, IV grade of malignancy according to WHO classification (WHO GIV). Standard treatment of GBM is based on surgery, radiotherapy and chemotherapy. The diffuse nature of growth prevents complete surgical resection of neoplastic lesions and leads to rapid recurrence. Despite the improvement of novel diagnostic and therapeutic strategies of high-grade gliomas, the clinical prognosis for the patients remains poor and their median survival is usually less than 16 months. Temozolomide, the chemotherapeutic commonly used against gliomas, allows to extend the time of patient's survival by only a few months. Therefore, intensive research is conducted on the development of modern treatment strategies, including immunotherapy, anti-angiogenic therapies and experimental gene therapies.

The pivotal factor responsible for *glioblastoma* progression and its high resistance to radiation and chemotherapy is high level of tumour hypoxia. Under the conditions of insufficient oxygen supply, in tumour cells there are a number of adverse metabolic changes, intensification of angiogenesis and abnormal apoptosis. These adaptive changes are mainly regulated by hypoxia inducible factor 1 (HIF-1). The transcription factor is the heterodimer composed of two subunits: α and β. Expression of α subunit (HIF-1α) strongly depends on the level of cell oxygenation.

A promising way to improve the oxygenation of neoplastic tissue and inhibit HIF-1α activity seems to be a hyperbaric oxygen (HBO) therapy. Application of oxygen under elevated pressure would allow to extend its diffusion distance and reach O_2 to deeper, often poorly vascularized, tumor areas. It should be expected that better oxygenated tumour tissue will become more susceptible to proposed therapies. HBO is actually widely used as an adjunctive treatment for various pathological states, including problematic wounds healing, decompression sickness or carbon monoxide poisoning. Lately, studies on its use in oncology have been also conducted, especially in combination with other therapies used so far: radiotherapy, chemotherapy, photodynamic therapy and surgery. Some of these studies have reached the clinical trial phase, but no medical procedure was developed that could be widely used in the treatment of patients with cancer.

http://rcin.org.pl

Tumour progression leads to the formation of several therapy resistance mechanisms. Therefore, there is a need to develop innovative treatment using more effective chemotherapeutic agents. A novel, promising group of cytotoxic compounds are heterocyclic isothiourea derivatives, particularly S-benzylderivatives – so called pentabromobenzylisothioureas, known as ZKKs. Those compounds were the subject of *in vitro* studies that confirmed their proapoptotic and cytotoxic properties toward various kinds of tumour cells, including the *glioblastoma* cell line. Structure of ZKKs is similar to compounds from the group of benzotriazoles (TBB) and benzimidazoles (TBI, DMAT), which are known inhibitors of casein kinase 2 (CK2). Increased activity of this kinase increases the potential of oncogenic factors and promotes neoplastic transformation. Due to the structural similarity to CK2 inhibitors, it was expected that ZKKs would also effectively inhibit activity of this kinase. However, studies on a wide panel of protein kinases showed that ZKK-3 (N,N'-dimethyl-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzyl)-isothiouronium bromide) weakly inhibits CK2. Instead of that it has the ability to specifically inhibit other kinases, including protein kinase D1 (PKD1). This kinase mediates detoxification of mitochondrial reactive oxygen and nitrogen species and in this way protects the cells from oxidative stress. Disturbances of PKD1 expression leads to the development of numerous pathological states, including neoplastic processes. It can be assumed that by the regulation of PKD1 level it will be possible to influence the tumour growth.

The aim of the study was to examine the effect of various oxygen conditions, including hyperbaric oxygenation, on the anti-tumour potential of the selected cytotoxic compound (isothiourea derivate – ZKK-3) against tumour cells of the T98G *glioblastoma* line.

The detailed aims included:

1) Comparison of the proliferation and viability of T98G cell line under various oxygen conditions: normoxia, anoxia and hypoxia.
2) Evaluation of the influence of hyperbaric oxygenation on the proliferation and viability of T98G cell line.
3) Evaluation of the effect of HBO on the expression of HIF-1α protein in T98G cell line.

http://rcin.org.pl

4) Evaluation of the cytotoxic effect of the ZKK-3 isothiourea derivative under various oxygen conditions and after hyperbaric oxygenation.
5) Evaluation of the effect of ZKK-3 on the expression of protein kinase PKD1 and the level of its phosphorylated forms: pPKD1 (Ser 916) and pPKD1 (Ser 744/748) in various oxygen conditions and after hyperbaric oxygenation.

The research hypothesis assumed that the administration of hyperbaric oxygen allows to diminish level of hypoxia in *glioblastoma* T98G cell line, thus sensitizing them to selected isothiourea derivative, which may be a promising strategy in anticancer therapy. It could be expected that inhibition of PKD1 kinase activity by ZKK-3 might increase the oxidative stress and therefore enhance anti-proliferative effect of the proposed combination of ZKK-3/HBO.

Studies were performed on a human T98G *glioblastoma* cell line (*American Type Culture Collection*) with IV grade of malignancy according to WHO classification (WHO GIV).

The cytotoxic effect was examined using a modified isothiourea derivative N,N'-dimethyl-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzyl)-isothiouronium bromide (ZKK-3), applied in concentrations of 10 μM, 25 μM and 50 μM

Cell cultures were exposed to various oxygen conditions:

1/ normoxia (21% O_2/ 5% CO_2/ 74% N_2) – 24-hours incubation after administration of ZKK-3

2/ anoxia (5% CO_2/ 95% N_2) – 24-hours incubation after administration of ZKK-3

3/ hypoxia (1% O_2/ 5% CO_2/ 94% N_2) – 24-hours incubation after administration of ZKK-3

4/ hyperbaric oxygen (HBO, 97,5% O_2/ 2,5% CO_2, pressure of 2 ATA) – 1-hour incubation after administration of ZKK-3 and then 23-hours incubation under standard oxygen conditions

5/ hypoxia/hypoxia („double hypoxia") – 24-hours incubation under hypoxia conditions before administration of ZKK-3 and then prolongation of hypoxia for the next 24 hours

6/ hypoxia/hyperbaric oxygen – 24-hours preincubation under hypoxia conditions before administration of ZKK-3 and then analogically to point 4.

http://rcin.org.pl

The proliferation and viability of T98G cells, treated with ZKK-3 under standard oxygen conditions (normoxia), oxygen deficiency conditions (anoxia, hypoxia) and hyperbaric oxygen conditions were evaluated. The proliferation of *glioblastoma* cells was assessed after 24 hours of incubation with ZKK-3 using the *Multisizer 3 Coulter Counter* (Beckman Coulter). The viability of T98G cell line was determined 24 and 48 hours post ZKK-3 administration by modified MTS cytotoxic assay using CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). The impact of HBO on the oxygenation status of glioma cells was also examined by the determination of the expression of HIF-1α protein in cell lysates by ELISA test (HIF-1A ELISA Kit, Thermo Scientific). Expression of PKD1 kinase and the level of its phosphorylated forms, pPKD1 (Ser 916) and pPKD1 (Ser 744/748), were evaluated using Western Blot technique.

The obtained results show that normoxia conditions results in statistically significant reduction of the proliferation of human T98G *glioblastoma* cells treated with ZKK-3 in concentrations of 25 μM and 50 μM. With the increasing concentration of the tested compound, the viability of the T98G cells is also significantly reduced after 24 and 48 hours of incubation.

In anaerobic conditions the number of glioma cells declines after administration of ZKK-3, however this decrease is less rapid than in standard conditions. Moreover, anoxia itself results in significant diminution of cells' proliferation, even without the addition of ZKK-3 compared to normoxia. However, cell viability is significantly higher in anoxia than in standard conditions, both in control and experimental groups incubated with 10 μM and 25 μM of ZKK-3 for 24 and 48 hours. Significant cytotoxic effect of tested compound is observed only after higher doses or prolonged exposure to ZKK-3.

Hypoxia conditions alone or in combination with ZKK-3 at a concentration of 10 μM does not change the proliferation of T98G cells in comparison to normoxia. Statistically significant reduction of number of glioma cells is observed after supplementation with higher concentrations of ZKK-3, regardless of oxygen conditions. Moreover, after incubation with 50 μM of ZKK-3 the number of cells under low oxygen concentration is significantly higher than in standard conditions. Hypoxia alone significantly reduces the viability of GBM cells *in vitro*

http://rcin.org.pl

in comparison to normoxia, both after 24 and 48 hours. In hypoxia only using 50 μM of tested agent induces statistically significant diminution of viability of T98G cells, both after one and two days of exposure. Furthermore, after 48-hours of incubation with 10 μM and 25 μM of ZKK-3, the cell viability is higher under low oxygen conditions than in standard conditions.

Hyperbaric oxygen applied alone does not change the proliferation and viability of T98G cells in comparison to both standard conditions and hypoxia. HBO combined with 50 μM of ZKK-3 causes significantly greater reduction in the number of *glioblastoma* cells *in vitro* then in normoxia conditions. The viability of glioma cells treated with the tested isothiourea derivative is also reduced after hyperbaric oxygenation. After a 24 hours of incubation, the diminution of the number of viable cells under HBO is significantly higher than in normoxia, only after administration of the tested compound at concentration of 50 μM. However, after 48 hours of incubation, statistically significant differences between HBO and normoxia conditions can be observe already at lower ZKK-3 concentrations.

Direct comparison of the proliferation of glioma cells under hyperbaric oxygenation and hypoxia shows that under both these oxygen conditions, T98 glioma cells growth is significantly slowed after administration of ZKK-3 at concentrations of 25 μM and 50 μM. However, a notably greater cytotoxic effect of the tested isothiourea derivative can be achieved after combination with HBO. Moreover, under the influence of hyperbaric oxygen ZKK-3 significantly reduces the viability of neoplastic cells already at the concentration of 10 μM. The sensitivity of cells to the tested compound is much higher in HBO than in hypoxia, irrespective of the time of exposure. Only after administration of ZKK-3 at concentration of 50 μM, no statistically significant differences are observed.

The conducted studies confirms that the level of HIF-1α protein in T98G cells strongly depends on the oxygen conditions in which the cells are cultured. In cells maintained under hypoxia, the expression of HIF-1α is significantly elevated compared to standard conditions. The prolongation of the duration of oxygen deficiency (preincubation under hypoxia prior to the administration of ZKK-3) results in even higher increase of HIF-1α level. On the other hand, the exposure to HBO does not induce significant changes of HIF-1α level compared to normoxia. The exceptions are lysates from hypoxia/HBO group treated with higher

http://rcin.org.pl

concentration of ZKK-3, in which a significant decrease in the level of the tested protein is noted. Moreover, direct comparison of HIF-1α expression in preincubated groups under analogical oxygen conditions shows that administration of HBO results in significant inhibition of the activity of this protein in relation to hypoxia.

The selected pentabromobenzylisothiourea does not significantly change the expression of protein kinase D1 (PKD1) in *glioblastoma* cells *in vitro*. However, incubation with ZKK-3 at the concentration of 50 μM causes a statistically significant decrease of pPKD1 (Ser 916) level, regardless of the applied oxygen conditions, as well as a significant increase of pPKD1 (Ser 744/748) level in standard, hypoxia and HBO conditions. Therefore, it seems possible that the administration of ZKK-3 at a concentration of 50 μM prevents the PKD1 phosphorylation at the rest of Ser 916.

The expression of PKD1 in T98G cells is unchanged under different oxygen conditions, including hyperbaric oxygenation, both in the control group and groups treated with ZKK-3. In the cell cultures that do not be treated with selected cytotoxic compound, the significant diminution of pPKD1 (Ser 916) level occurs in hypoxia, HBO and double hypoxia conditions. Likewise, only in control group there is a significant increase of pPKD1 (Ser 744/748) level under hypoxia/HBO conditions in comparison to normoxia.

Conclusions

- Oxygen deficiency (anoxia) and reduced oxygen conditions (hypoxia) diminish the cytotoxic effect of the ZKK-3 isothiourea derivate and promote better survival of *glioblastoma* cells *in vitro*.
- Administration of hyperbaric oxygen significantly reduces the proliferation of malignant glioma cells *in vitro* and increases their sensitivity to the selected isothiourea derivative ZKK-3. The beneficial cytotoxic effect of ZKK-3/HBO can be achieved at the lower concentrations of the tested compound and after reduced exposure time.
- The level of HIF-1α protein in T98G line is elevated under hypoxia conditions but decreases under hyperbaric oxygenation. It could suggest that HBO by diminution of oxygen deficiency and level of hypoxia markers may help to reduce the resistance of tumour cells to cytostatics.

http://rcin.org.pl

- Decrease of pPKD1 (Ser 916) level after ZKK-3 administration indicates that tested pentabromobenzylisothiourea exhibits inhibitory properties against this form of protein kinase D1.
- Lack of significant differences in the level of PKD1 and its phosphorylated forms in *glioblastoma* cells treated with ZKK-3 under various oxygen conditions, including hyperbaric oxygenation, suggest that inhibition of protein kinase D1 activity is not a leading mechanism of cytotoxic activity of ZKK-3/HBO.
- The combination of isothiourea derivative ZKK-3 and hyperbaric oxygenation can be considered as a promising therapeutic approach in the treatment of brain tumors with the highest grade of histological malignancy.

http://rcin.org.pl

1. Wstęp

Nowotwory stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zgonów ludności na całym świecie. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) w 2014 roku odnotowano 14,1 milionów nowych przypadków zachorowania na nowotwory i zgodnie z prognozami *World Cancer Report* liczba ta może wzrosnąć w 2020 roku do 17 mln. Liczba zgonów z powodu chorób nowotworowych w 2015 roku wyniosła 8,2 milionów [1, 2]. W Polsce zachorowalność na nowotwory złośliwe w ciągu ostatnich trzech dekad zwiększyła się ponad dwukrotnie. W 2013 roku wynosiła ponad 156 tysięcy i dotyczyła w równej mierze kobiet, jak i mężczyzn [3]. W 2014 roku umieralność na nowotwory w Polsce przekroczyła 94 tysiące. Wzrost liczby zachorowań i zgonów z powodu chorób nowotworowych wynika zarówno z przyczyn demograficznych, związanych ze starzeniem się społeczeństwa, jak i z rozwoju przemysłu i postępującej degradacji środowiska. Rozwojowi nowotworów sprzyja niezdrowy tryb życia m.in. palenie papierosów, nadużywanie alkoholu, niewłaściwa dieta, otyłość i brak aktywności fizycznej. Ryzyko zachorowania zwiększa też ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe lub jonizujące, rakotwórcze związki chemiczne (np. azbest) czy niektóre mikroorganizmy chorobotwórcze (np. wirus brodawczaka ludzkiego - HPV).

Leczenie nowotworów oparte jest w głównej mierze na leczeniu operacyjnym oraz radio- i/lub chemioterapii. Niestety, komórki nowotworowe często wykazują oporność na stosowane terapie. Z tego powodu zachodzi konieczność projektowania bardziej skutecznych leków, opracowywania nowoczesnych strategii terapeutycznych (np. immunoterapia, terapia antyangiogenna, terapia genowa) oraz poszukiwania nowych form postępowania (np. wykorzystanie nanotechnologii jako platformy dostarczania leków).

Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) stanowią około 2% wszystkich nowotworów, diagnozowanych zarówno w skali globalnej, jak i w Polsce [1, 3]. W 2012 roku odnotowano ponad 256 tysięcy przypadków zachorowań na nowotwory mózgu i innych części układu nerwowego na całym świecie, w tym 4467 przypadków na terenie naszego kraju [4]. Śmiertelność wynosiła odpowiednio 189 tysięcy przypadków na świecie oraz 3029 przypadków w Polsce.

http://rcin.org.pl

1.1. Glejaki – pierwotne nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN)

Nowotwory glejopochodne mózgu, tzw. glejaki, stanowią ponad 30% guzów wewnątrzczaszkowych, diagnozowanych najczęściej u osób pomiędzy 40 a 65 rokiem życia [5, 6]. Do grupy tej należą nowotwory o różnym fenotypie oraz o różnym stopniu złośliwości histologicznej (od I do IV). Najnowsza klasyfikacja nowotworów układu nerwowego WHO 2016 wprowadza diagnostykę fenotypowo-genotypową i za postawę klasyfikacji rozlanych glejaków przyjmuje status genu *IDH*, kodującego dehydrogenazę izocytrynianową. Ze względu na fenotyp glejaków wyróżniamy nowotwory astrocytarne (gleju gwiaździstego), do których zaliczamy gwiaździaka (ang. *astrocytoma*), gwiaździaka anaplastycznego (ang. *anaplastic astrocytoma*) i złośliwego glejaka (ang. *glioblastoma*, GBM) oraz nowotwory oligodendroglejowe (gleju skąpowypustkowego), do których należy skąpodrzewiak (ang. *oligodendroglioma*) i skąpodrzewiak anaplastyczny (ang. *anaplastic oligodendroglioma*) [7, 8]. Wśród rozlanych glejaków najlepsze rokowanie wykazuje skąpodrzewiak, zdecydowanie gorsze rokowanie wiąże się z rozrostem nowotworów astroglejowych [9]. Najbardziej złośliwym glejakiem jest glejak o IV stopniu złośliwości - *glioblastoma*.

1.1.1. *Glioblastoma* (GBM)

Glioblastoma (GBM), czyli glejak złośliwy, dawniej zwany glejakiem wielopostaciowym, jest najczęściej występującym nowotworem pierwotnym OUN, stanowiącym około 15-20% wszystkich guzów mózgu, diagnozowanych u osób dorosłych [10]. Średnia wieku osób, u których zdiagnozowano GBM, wynosi 64 lata, jednak choroba ta może wystąpić w każdym wieku, nawet u małych dzieci [11]. *Glioblastoma* koresponduje z najwyższym, IV stopniem złośliwości histologicznej i daje bardzo niekorzystne rokowanie.

GBM jest nowotworem pochodzenia astroglejowego o heterogennym obrazie morfologicznym. Zwykle dominują nisko zróżnicowane, drobne, czasem pleomorficzne komórki nowotworowe, obecne są jednak również dość dobrze zróżnicowane nowotworowe astrocyty [10, 12]. Glejak ten charakteryzuje się nasiloną atypią jąder komórkowych oraz wysoką aktywnością mitotyczną. Cechą wyróżniającą *glioblastoma* jest nasilona proliferacja mikronaczyń z tworzeniem

http://rcin.org.pl

struktur kłębuszkowych oraz obecność obszarów martwicy. Występują zarówno drobne mikromartwice, otoczone pseudopalisadowymi układami komórek nowotworowych, jak i rozległe obszary martwicy ischemicznej. Są to cechy patognomoniczne glejaka o IV stopniu złośliwości wg WHO, których potwierdzenie jest warunkiem koniecznym do postawienia rozpoznania. Szybka proliferacja komórek nowotworowych i tworzenie nieprawidłowych naczyń prowadzą do przewlekłego niedotlenienia tkanki nowotworowej i wytworzenia „błędnego koła" hipoksji i zaburzonej angiogenezy. Dlatego w obrębie tkanki nowotworowej *glioblastoma* utrzymuje się przewlekłe niedotlenienie, które stanowi negatywny czynnik prognostyczny.

Obowiązująca do niedawna klasyfikacja wyróżniała dwa rodzaje *glioblastoma* w zależności od mechanizmu ich rozwoju. W większości przypadków GMB powstaje *de novo* z prawidłowych komórek glejowych w wyniku wieloetapowego procesu kancerogenezy (około 90% przypadków). Jest to tzw. „pierwotny" *glioblastoma*, najczęściej diagnozowany u osób powyżej 60 roku życia. Średnie przeżycie pacjentów z pierwotnym GBM na ogół nie przekracza 16 miesięcy [13, 14]. Z kolei tzw. „wtórny" *glioblastoma* rozwija się z gwiaździaka o niższym stopniu złośliwości i zazwyczaj występuje u młodszych pacjentów w wieku 39-45 lat. Takie nowotwory cechuje zazwyczaj nieco lepsza prognoza.

W 2016 roku wprowadzono nową klasyfikację nowotworów OUN wg WHO, opartą na zintegrowanej charakterystyce fenotypowo-genotypowej [15]. W klasyfikacji tej wyróżnia się trzy podtypy *glioblastoma*: *IDH-wildtype, IDH-mutant* oraz *NOS* (ang. *not otherwise specified*) w zależności od obecności lub braku mutacji w genach *IDH1* lub *IDH2,* kodujących dehydrogenazę izocytrynianową. *Glioblastoma IDH-wildtype*, który stanowi 80% przypadków złośliwych glejaków, rozwija się *de novo* i nie posiada mutacji genu *IDH1/2*. Z kolei *glioblastoma IDH-mutant,* który wykazuje mutację w genach *IDH1* lub *IDH2,* wywodzi się z nowotworów o niższym stopniu złośliwości i koresponduje z GBM wtórnym. IDH jest enzymem cyklu Krebsa, katalizującym przekształcenie izocytrynianu do α-ketoglutaranu. W przypadku mutacji w genie *IDH* dochodzi do spadku aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej, zmniejszenia stężenia α-ketoglutaranu i indukcji czynnika HIF-1α (ang. *hypoxia inducible factor 1α*) [16]. Mutacje *IDH1/2* stanowią korzystny czynnik prognostyczny, jednak są one obecne

http://rcin.org.pl

zaledwie u 10% GBM. Średnia wieku osób ze zdiagnozowanym *glioblastoma IDH-mutant* jest niższa niż pacjentów z *glioblastoma IDH-wildtype*. Podtyp *glioblastoma NOS* można rozpoznać w przypadkach, w których nie określono mutacji w genach *IDH1/2*. Proponowany był również inny podział *glioblastoma* na podtyp proneuralny, neuralny, klasyczny i mezenchymalny, oparty na szerszej analizie zmian genetycznych, obejmujących mutacje w genach *PDGFRA* (gen kodujący receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu A), *IDH1*, *EGFR* (gen kodujący receptor naskórkowego czynnika wzrostu) oraz *NF1* (gen kodujący neurofibrominę 1) [17].

Oprócz mutacji genu *IDH1/2*, w *glioblastoma* występują inne nieprawidłowości materiału genetycznego, do których należą: metylacja promotora genu *MGMT*, kodującego metylotransferazę O^6-metyloguaniny-DNA (MGMT), delecja chromosomu 10q, mutacja lub delecja genu supresorowego *PTEN* (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 gene*), amplifikacja genu *EGFR*, delecja genu retinoblastoma (RB), mutacje genu *TP53* oraz homozygotyczna delecja *CDKN2A/2B* (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B*). Badania molekularne pozwoliły wyodrębnić trzy ścieżki sygnałowe, ulegające mutacjom w większości przypadków GBM: szlak receptorowej kinazy tyrozynowej (RTK)/RAS/PI3K, szlak p53 oraz szlak retinoblastoma [18]. Zmiany w obrębie tych szlaków obserwowane są odpowiednio w 88%, 87% i 78% złośliwych glejaków.

Etiologia *glioblastoma* pozostaje nieokreślona. Jedynym uznanym czynnikiem kancerogennym jest długotrwała ekspozycja na duże dawki promieniowania jonizującego, stosowane zazwyczaj podczas agresywnej radioterapii innych nowotworów głowy i szyi [10, 11, 19]. Inne czynniki rakotwórcze, takie jak dym papierosowy, pestycydy, formaldehydy, urazy głowy, zła dieta, fale elektromagnetyczne (emitowane na przykład przez telefony komórkowe), nie znalazły potwierdzenia w etiopatogenezie tego nowotworu. Objawy kliniczne *glioblastoma* zależą od lokalizacji zmiany nowotworowej; najczęściej występują ogniskowe objawy neurologiczne, wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego, bóle głowy, zaburzenia funkcji poznawczych, rzadko napady padaczkowe [20].

GBM zlokalizowany jest najczęściej w obrębie półkul mózgu, rzadziej w móżdżku, pniu mózgu lub rdzeniu kręgowym. Pomimo bardzo dużej inwazyjności

http://rcin.org.pl

miejscowej nie daje odległych przerzutów [20]. Rozpoznanie oparte jest na badaniach obrazowych: rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI) oraz tomografii komputerowej (ang. *computed tomography*, CT), wspomaganych technikami tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (ang. *single-photon emission computed tomography*, SPECT) i pozytonowej tomografii emisyjnej (ang. *positron emission tomography*, PET). Stosowane jest także znakowanie fluorescencyjne przy użyciu izotopu 18F.

Standardowe leczenie *glioblastoma* oparte jest na leczeniu operacyjnym, radioterapii (RT) oraz chemioterapii [10, 11]. Zastosowanie terapii uzupełniającej jest istotne, gdyż ze względu na rozlany charakter wzrostu, całkowita resekcja chirurgiczna zmiany nowotworowej jest niemożliwa. Stanowi to główną przyczynę wznowy guza i nawrotu choroby. Nie bez znaczenia jest również fakt, że GBM często zlokalizowany jest w obszarach elokwentnych mózgu, co utrudnia lub uniemożliwia jego całkowitą resekcję. Pooperacyjna radioterapia ma na celu przedłużenie okresu remisji. Od 2005 roku chemioterapia w przypadkach złośliwych glejaków bazuje w głównej mierze na zastosowaniu temozolomidu (TMZ). Lek ten podawany jest doustnie w trakcie oraz po radioterapii [21, 22]. TMZ przekształca się w organizmie w aktywną pochodną karboksyamidu - MTIC (5-(3-metylo-(triazeno-1-yl))imidazolo-4-karboksyamid), która następnie ulega hydrolizie do 5-aminoimidazolo-4-karboksyamidu (AIC) i metylohydrazyny, wykazującej właściwości alkilujące [23]. MTIC metyluje guaniny w miejscach N7 i O6, w ten sposób uniemożliwiając łączenie się uszkodzonych nici DNA, zahamowanie replikacji i apoptozę komórek nowotworowych. Niski poziom metylacji promotora genu *MGMT* stanowi negatywny czynnik prognostyczny odpowiedzi pacjentów na leczenie temozolomidem. Gen ten reguluje ekspresję enzymu MGMT, znoszącego działanie TMZ poprzez przyłączanie do siebie grup metylowych, pochodzących ze zmetylowanych przez MTIC reszt guaniny [23, 24]. Niestety, zarówno stosowanie radioterapii, jak i chemioterapii związane jest z występowaniem niepożądanych skutków ubocznych. Prowadzone są także badania nad skutecznością immunoterapii i terapii antyangiogennej w leczeniu złośliwych glejaków z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko czynnikowi wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGF (terapia z wykorzystaniem bewacizumabu), EGFR bądź bFGF (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów) [10]. Jedną z najnowszych

http://rcin.org.pl

proponowanych strategii terapeutycznych jest wspomaganie standardowej terapii (resekcja chirurgiczna/radioterapia/temozolomid) leczeniem przy użyciu tzw. TTFields (ang. *Tumor-Treating Fields*), czyli zmiennych pól elektrycznych o niskiej intensywności i średniej częstotliwości [25]. Powodują one zahamowanie podziałów komórkowych zachodzących na drodze mitozy oraz apoptozę komórek nowotworowych, przez co wydłużają średnie przeżycie pacjentów bez dodatkowych, niepożądanych skutków ubocznych [26]. Niestety, pomimo zaawansowanych technik diagnostycznych i wielokierunkowego (także eksperymentalnego) podejścia terapeutycznego, leczenie *glioblastoma* wciąż pozostaje mało efektywne.

1.2. Hipoksja tkanki nowotworowej

Wyniki licznych badań naukowych dowodzą, że znaczącą rolę w progresji nowotworu odgrywa przewlekłe niedotlenienie tkanek, tzw. hipoksja. Pojęciem hipoksji określany jest stan, w którym niedobór tlenu w tkance przekracza zapotrzebowanie na O_2. Niedotlenienie występuje w warunkach mniejszej dostępności tlenu lub przy obniżonym ciśnieniu cząstkowym tlenu (pO_2) i skutkuje ograniczeniem lub wręcz zahamowaniem funkcji życiowych komórek [27]. Hipoksja może być spowodowana spadkiem transportu O_2 we krwi tętniczej w przebiegu np. chorób układu oddechowego, anemii, zatruć tlenkiem węgla. Może być również wywołana zaburzeniami perfuzji tkanek, dyfuzji lub mechanizmów zużywania tlenu przez komórki. W zależności od przyczyny i czasu trwania wyróżniamy kilka rodzajów hipoksji [28, 29]. Hipoksja ostra jest zjawiskiem przejściowym, wywołanym czasowym spadkiem ciśnienia O_2 z powodu zaburzeń strukturalnych i funkcjonalnych mikronaczyń (zaburzenia perfuzji). Regularnie nawracające przypadki przejściowej hipoksji określone zostały mianem hipoksji cyklicznej. Z kolei hipoksja przewlekła (chroniczna) jest skutkiem wydłużenia drogi dyfuzji tlenu i dotyka zazwyczaj komórki zlokalizowane w dużej odległości od naczyń krwionośnych (powyżej 70 μm). Niektóre źródła, jako osobny rodzaj niedotlenienia, definiują hipoksję anemiczną, wywołaną spadkiem zdolności przenoszenia tlenu przez krew w wyniku choroby nowotworowej lub terapii przeciwnowotworowej. Poziom natlenowania tkanek można mierzyć metodami bezpośrednimi (inwazyjnymi) lub pośrednimi (obrazowanie), w zależności od rodzaju tkanki [28-33]. Pomiaru bezpośredniego dokonuje się przy użyciu mikrosensorów,

http://rcin.org.pl

do których należą powszechnie stosowana polarograficzna elektroda tlenowa (ang. *polarographic oxygen electrode*, POE) i tlenowa elektroda Clarka oraz sensorów optycznych lub wewnątrzkomórkowych markerów hipoksyjnych (np. nitroimidazoli takich jak mizoinidazol czy pimonidazol). Metody pośrednie obejmują techniki obrazowania, takie jak rezonans magnetyczny (MRI), spektroskopię rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance spectroscopy*, MRS), spektroskopię bliskiej podczerwieni (ang. *near infrared spectroscopy*, NIR) czy pozytonową tomografię emisyjną (PET), coraz częściej wspomaganą użyciem znakowania izotopowego (np. [^{18}F]-fluoroimidazolem, FMISO). Hipoksję można również badać stosując tradycyjne obserwacje mikroskopowe lub poprzez oznaczanie markerów hipoksji np. HIF-1α, transportera glukozy 1 (GLUT-1) i anhydrazy węglanowej IX (CA-IX) [28].

Wartość krytyczna pO_2, poniżej której mówimy o hipoksji, jest różna w zależności od tkanki i średnio wynosi 8-10 mmHg [27, 34]. Niski stopień natlenowania skutkuje zahamowaniem cyklu komórkowego, zmianami metabolicznymi i genetycznymi, a w skrajnych przypadkach prowadzi do śmierci komórek na drodze apoptozy lub nekrozy [28]. Z drugiej strony, zmiany te mogą prowadzić do transformacji nowotworowej i wyodrębnienia populacji komórek o bardzo agresywnym fenotypie. Trwają dyskusje nad tym, który rodzaj hipoksji, przewlekła czy cykliczna, pełni główną rolę w progresji nowotworu i związanej z nią oporności na leczenie [35]. W szybko rozwijających się nowotworach oraz w guzach o średnicy powyżej 70 μm, transport tlenu do regionów zlokalizowanych w głębi tkanki nowotworowej i oddalonych od naczyń krwionośnych jest znacznie ograniczony [36]. W konsekwencji, w tkance większości guzów, średnie pO_2 (2,5-30 mmHg) jest zdecydowanie niższe niż w tkance zdrowej (24-66 mmHg) [37].

Niedotlenienie występuje również w glejakach. Ciśnienie cząstkowe tlenu w prawidłowej tkance mózgu oscyluje w przedziale 25-60 mmHg [34, 38]. Z kolei w guzach glejopochodnych średnie pO_2 wynosi 13-15 mmHg, w tym dla gwiaździaków o niższym stopniu złośliwości 7,3-15,3 mmHg, zaś w przypadku *glioblastoma* spada do 9,6 mmHg [39]. Ciśnienie na obrzeżach guza jest wyższe niż w głębi tkanki nowotworowej, gdzie w skrajnych przypadkach może wynosić nawet poniżej 2,5 mmHg [34]. Wysoki poziom niedotlenienia stanowi negatywny czynnik prognostyczny w odniesieniu do przeżywalności pacjentów oraz ich odpowiedzi

http://rcin.org.pl

na standardowe formy leczenia, radio- i chemioterapię [28, 37]. Oporność *glioblastoma* na stosowane terapie wynika przede wszystkim z rozlanego nacieku komórek nowotworowych oraz wadliwej angiogenezy. Czynniki te tworzą dwa tzw. "błędne koła", w których kluczową rolę pełni właśnie hipoksja [40, 41]. Nadmierna i gwałtowna proliferacja komórek nowotworowych nie sprzyja formowaniu prawidłowych naczyń krwionośnych, zdolnych do zaopatrzenia całej objętości guza w wystarczającą ilość tlenu. Skutkuje to powstawaniem licznych obszarów hipoksyjnych, co z kolei z jednej strony jest sygnałem do dodatkowej stymulacji zaburzonej angiogenezy, z drugiej strony stymuluje migrację komórek nowotworowych wzdłuż szlaków mielinowych istoty białej mózgu do rejonów lepiej natlenowanych. Prawidłowe naczynia krwionośne ulegają regresji, co znów nasila hipoksję tkanki i inwazyjność komórek nowotworowych.

Tlen cząsteczkowy ma silne powinowactwo do elektronów, pochodzących z promieniowania jonizującego i wchodzi w reakcje z wolnymi rodnikami, wytwarzanymi pod wpływem radioterapii [42]. Powstające cząsteczki aktywne, tzw. reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), powodują nieodwracalne uszkodzenia nici DNA i w konsekwencji prowadzą do śmierci komórek nowotworowych. Niedobór tlenu sprawia, że produkcja ROS gwałtownie maleje, co prowadzi do spadku wrażliwości komórek nowotworowych na radioterapię [27, 42, 43]. Szacuje się, że krytyczne ciśnienie cząstkowe O_2 w guzie, konieczne dla skutecznego działania RT, wynosi 25-30 mmHg [29]. Na efektywność radioterapii ma również wpływ faza cyklu komórkowego, w której znajdują się komórki nią traktowane. Komórki nowotworowe, będące w fazie G_2/M (aktywnych podziałów komórkowych) są bardziej wrażliwe na promieniowanie jonizujące niż komórki w fazie S lub G_1, w trakcie których aktywność enzymów naprawiających DNA jest największa [43]. Niestety, w warunkach niedotlenienia cykl komórkowy ulega zahamowaniu w fazie G_1 [44, 45].

Jak wspomniano powyżej, hipoksja powoduje poważne zaburzenia w budowie naczyń krwionośnych i perfuzji tkanki nowotworowej. Pogorszeniu ulega wówczas nie tylko transport tlenu do wnętrza masy guza za pośrednictwem erytrocytów, ale także transport i dystrybucja chemioterapeutyków do komórek [34]. W efekcie cytotoksyczne działanie leków obejmuje niewielką liczbę komórek nowotworowych w lepiej natlenowanych partiach guza. Zastosowanie zwiększonych

http://rcin.org.pl

dawek leku nie stanowi rozwiązania problemu, gdyż niesie za sobą ryzyko nadmiernej toksyczności względem tkanki otaczającej zmianę nowotworową [46, 47]. W warunkach niewystarczającego zaopatrzenia w tlen i substancje odżywcze, proliferacja komórek ulega znacznemu spowolnieniu. Część z nich może nawet przejść w tzw. „stan uśpienia". Tymczasem działanie niektórych chemioterapeutyków jest skuteczne głównie w stosunku do aktywnie dzielących się komórek nowotworowych. Do związków tych należy np. 5-fluorouracyl (5-FU), doksorubicyna, karboplatyna, melfalan, bleomycyna i etopozyd. Skuteczność tych związków w warunkach hipoksji ulega znacznemu osłabieniu. Niemniej istotny jest fakt, że w warunkach niedoboru tlenu dochodzi do aktywacji białek z rodziny Bcl-2, hamujących apoptozę wywołaną działaniem chemioterapeutyków opartych na platynie (cisplatyny, karboplatyny). W efekcie dochodzi do wykształcenia lekooporności na te związki. Z kolei zaburzenia procesu zwijania się białek w siateczce śródplazmatycznej, spowodowane niedotlenieniem, skutkują obniżeniem wrażliwości komórek na leki ukierunkowane przeciw topoizomerazie II np. doksorubicynę.

Znaczenie niedotlenienia w rozwoju procesu nowotworowego zachęciło do podjęcia prób, mających na celu przezwyciężenie hipoksji i zahamowanie jej negatywnych skutków [37, 42, 48]. Próbowano zwiększyć zdolność krwinek czerwonych do transportu O_2 poprzez transfuzje oraz podawanie erytropoetyny - hormonu peptydowego, stymulującego różne etapy erytropoezy. Stosowano również sztuczne nośniki tlenu, oparte na rdzeniu z hemoglobiny lub perfluorowęgla (substytuty czerwonych krwinek) [49, 50]. Poprawę natlenowania tkanek można również osiągnąć poprzez oddychanie mieszaniną gazową o zwiększonej zawartości O_2, na przykład czystym tlenem lub karbogenem (mieszanina gazowa zawierająca 95% O_2 i 5% CO_2) [51-55]. Obiecującym rozwiązaniem wydaje się być podawanie tlenu pod zwiększonym ciśnieniem czyli tzw. terapia tlenem hiperbarycznym. Sposobem na zniwelowanie skutków hipoksji może być zahamowanie działania białek nią aktywowanych przy użyciu ich małocząsteczkowych antagonistów (np. inhibicja HIF-1 przez cząsteczki siRNA (ang. *small intefering RNA*) lub 2-metoksyestradiol) lub specyficznych przeciwciał (np. terapia antyangiogenna bewacizumabem przeciwko VEGF) [56]. Potencjalną strategią terapeutyczną wydaje się być także użycie chemioterapeutyków aktywowanych w warunkach niedoboru

http://rcin.org.pl

tlenu [57]. Tego rodzaju związki podawane są w postaci proleków, które dopiero w środowisku hipoksji ulegają bioredukcji do formy cytotoksycznej. Przykładem leku o takim działaniu jest 5-fluorocytozyna (5-FC), która w warunkach hipoksji ulega redukcji do aktywnej formy 5-fluorouracylu. Podobnie związek TH-302, należący do grupy tetraimidazoli, w warunkach niskiego pO_2 ulega konwersji do bromoizofosforoamidoiperytu (Br-IPM), rozrywającego wiązania pomiędzy nićmi DNA [33, 56]. Ciekawym przykładem związku aktywowanego hipoksją jest białko fuzyjne PTD-ODD [58]. Obecna w nim domena PTD odpowiada za transport leku do wnętrza niedotlenionych komórek, zaś domena ODD zapewnia jego stabilizację w tym środowisku i jednoczesną degradację w warunkach normoksji. Do tego kompleksu dołączona może być trzecia domena, która w zależności od charakteru, determinuje działanie powstałego białka fuzyjnego. I tak kompleks PTD-ODD-EGFP (ang. *enhanced green fluorescent protein*) używany może być do specyficznego znakowania komórek w warunkach hipoksji. Fuzja z prokaspazą-3 skutkuje powstaniem leku o nazwie POP33, który wykazuje silne właściwości cytotoksyczne, ukierunkowane przeciwko niedotlenionym komórkom nowotworowym. Z kolei zastosowanie terapii genetycznej mogłoby pomóc opracować specyficzne dla hipoksji systemy ekspresji genów i w ten sposób nasilić apoptozę komórek nowotworowych.

1.2.1. Czynnik indukowany hipoksją 1 (HIF-1)

Komórki nowotworowe, przystosowując się do wzrostu w warunkach obniżonej dostępności tlenu, przechodzą szereg zmian adaptacyjnych i mutacji, regulowanych w głównej mierze przez czynnik indukowany hipoksją - HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor 1*) [37, 48]. Jest to nadekspresjonowany w stanie hipoksji czynnik transkrypcyjny, indukujący ekspresję ponad 100 genów, kodujących białka odpowiedzialne za przystosowanie komórek do wzrostu w warunkach hipoksji. Zaliczamy do nich między innymi białka metabolizmu beztlenowego (np. enzymy glikolityczne), białka biorące udział w transporcie glukozy (np. GLUT1) i żelaza (np. transferrynę), białka regulujące hematopoezę (np. erytropoetynę) oraz angiogenezę (VEGF, bFGF, EGFR) [48]. W efekcie, komórki nowotworowe wykształcają oporność na stosowane formy leczenia.

http://rcin.org.pl

HIF-1 jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek: α i β, które należą do rodziny czynników transkrypcyjnych, zawierających na N-końcu domeny bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*) oraz PAS (ang. *PER-ARNT-SIM homology domain*) odpowiedzialne za wiązanie DNA i dimeryzację [58]. Oprócz nich, w białkach występuje również domena ODD, decydująca o degradacji pod wpływem tlenu oraz dwie domeny transkrypcyjne: NAD - zlokalizowana na N-końcu białka i CAD - zlokalizowana na C-końcu. Ekspresja podjednostki HIF-1β, zwanej też Arnt1 (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 1*) jest ciągła i niezależna od poziomu tlenu, zaś poziom podjednostki HIF-1α zależy od dostępności tlenu w komórkach [48]. Ze względu na te zależności, poziom białka HIF-1α uznawany jest za dobry marker hipoksji. W warunkach normooksji dochodzi do hydroksylacji prolin Pro 564 i Pro 402 w domenie ODD cząsteczki HIF-1α przez zawierające żelazo hydroksylazy prolinowe - PHD1, PHD2 i PHD3. Następnie zhydroksylowane HIF-1α wchodzi w interakcje z kompleksem białka VHL (von Hippel-Lindau), elonginy B, elonginy C i kulliny 2 (Cul-2), który pełni funkcję ligazy ubikwityny E3. Znakowana ubikwityną cząsteczka ulega degradacji w proteasomie. Drugi posttranslacyjny mechanizm kontroli aktywności HIF-1 działa w oparciu o hydroksylację asparaginy Asn803, regulowaną działaniem tzw. czynnika hamującego HIF-1 - FIH1 (ang. *factor inhibiting HIF-1*) [33, 59, 60]. Z kolei w warunkach hipoksji niedobór cząsteczek tlenu uniemożliwia hydroksylację cząsteczki, która przedostaje się do jądra komórkowego, gdzie poprzez domeny PAS łączy się z podjednostką β, tworząc aktywny czynnik transkrypcyjny. Aktywne HIF-1 poprzez domenę bHLH może wiązać się z sekwencjami promotorowymi HREs (ang. *hypoxia response elements*), zlokalizowanymi w obrębie sekwencji kodujących genów docelowych i w ten sposób powodować aktywację tych genów [61]. Sekwencje HREs występują w ponad 100 genach zależnych od HIF-1.

Białko HIF-1 jest najlepiej poznanym białkiem z rodziny bHLH-PAS, ekspresjonowanym niemal we wszystkich komórkach ludzkich. Do rodziny tej zaliczane są również białka HIF-2 oraz HIF-3, obecne jedynie w niektórych komórkach np. hepatocytach, komórkach śródbłonka i komórkach macierzystych glejaków [62, 63]. Sugeruje to, że o ile HIF-1 jest markerem niedoboru tlenu we wszystkich komórkach, to HIF-2 i HIF-3 pełnią bardziej wyspecjalizowane role. W komórkach nowotworowych odnotowuje się wzrost ekspresji zarówno HIF-1α,

http://rcin.org.pl

jak i HIF-2α, które są do siebie zbliżone pod względem budowy strukturalnej. Z kolei podjednostka HIF-3α również zawiera w swojej strukturze domenę wiążącą DNA, ale w odróżnieniu od pozostałych izoform nie posiada domeny aktywacji transkrypcyji i dzięki temu może pełnić rolę negatywnego regulatora odpowiedzi na hipoksję [61]. Może ona bowiem konkurencyjnie łączyć się z podjednostkami HIF-1β i HIF-2β nie aktywując genów regulowanych przez te białka.

Wyniki licznych badań dowodzą, że w guzach glejopochodnych dochodzi do nadekspresji białka HIF-1α. Jego poziom różni się w zależności od rodzaju nowotworu i stopnia jego złośliwości [64]. Najwyższa ekspresja HIF-1α występuje z guzach silnie niedotlenionych, takich jak *glioblastoma*. Tymczasem w mniej złośliwym gwiaździaku anaplastycznym (WHO GIII) jego poziom jest wyraźnie niższy. Co ciekawe, w niektórych guzach o łagodnej biologii, w których nie występują obszary hipoksji np. oponiakach przejściowych (WHO GI), poziom HIF-1α jest tylko nieznacznie niższy [65]. Sugeruje to, że białko to może być aktywowane także poprzez inne mechanizmy, niezależne od stopnia niedotlenienia tkanki nowotworowej, na przykład wskutek działania onkogenów. Najbardziej prawdopodobne mechanizmy takiego zjawiska bazują na inaktywacji w wyniku zmian epigenetycznych lub mutacji genów supresorowych *p53, PTEN* lub *VHL* oraz aktywacji onkogenów *Ras, Raf, Src, mTOR, Myc* i *PI3K*. Przykładowo, u pacjentów cierpiących na dziedziczny zespół von Hippel-Lindau, charakteryzujący się występowaniem mutacji w obu allelach genu *VHL*, dochodzi do deregulacji aktywności HIF-1 i zwiększonej predyspozycji do rozwoju nowotworów, między innymi nerek, ośrodkowego układu nerwowego, nadnerczy i siatkówki [33].

Ochronne działanie HIF-1 i HIF-2 oraz ich promujący wpływ na progresję nowotworową sprawiły, że zahamowanie ich ekspresji uznano za potencjalną strategię terapeutyczną [48]. W tym celu używano inhibitorów drobnocząsteczkowych, na przykład antybiotyku geldanamycyny, będacego inhibitorem białka szoku cieplnego 90 (ang. *heat shock protein* 90, Hsp90), który kieruje HIF-1α do degradacji w proteasomie niezależnie od białka VHL. Stosowano też inhibitory topoizomeraz, hamujące translację HIF-1α lub digoksynę lub rapamycynę, zaburzające jego transkrypcję [66]. Skutecznym sposobem obniżającym syntezę HIF-1α okazało się podawanie 2-metoksyestradiolu, uszkadzającego mikrotubule cytoszkieletu lub stosowanie cząsteczek krótkich interferujących RNA

http://rcin.org.pl

(siRNA) [61]. Celowanie w ścieżki sygnałowe, regulujące aktywność białek HIF, również daje obiecujące rezultaty. Zahamowanie aktywności HIF-1 skutkuje między innymi wzrostem wrażliwości komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące oraz chemioterapeutyki, takie jak karboplatyna czy etopozyd.

1.2.2. Przystosowywanie komórek do warunków hipoksji

Komórki nowotworowe wykształcają szereg mechanizmów obronnych, które pozwalają im zaadaptować się do wzrostu w środowisku o obniżonej dostępności tlenu [46]. Jednym z takich mechanizmów jest zmiana metabolizmu tlenowego (glikoliza połączona z cyklem Krebsa i fosforylacją oksydacyjną) na metabolizm beztlenowy - anaerobowy (glikoliza połączona z fermentacją mlekową) [59]. W procesie glikolizy beztlenowej z jednej cząsteczki glukozy przy zużyciu 2 ATP, powstają 4 cząsteczki ATP. Ostateczny bilans energetyczny daje więc zysk tylko w postaci 2 cząsteczek ATP i sprawia, że oddychanie anaerobowe jest procesem znacznie mniej wydajnym niż fosforylacja oksydacyjna, dająca końcowy zysk 36 cząsteczek ATP [60]. Jednocześnie zapotrzebowanie na energię u proliferujących komórek nowotworowych jest bardzo wysokie, co skutkuje koniecznością pobierania dużych ilości glukozy w celu zrekompensowania niedostatku energetycznego. Proces ten jest regulowany przez transportery glukozy, takie jak GLUT-1 (ang. *glucose transporter 1*) i GLUT-3 (ang. *glucose transporter 3*), kodowane przez geny nadekspresjonowane pod wpływem HIF-1. Czynnik indukowany hipoksją 1 sprzyja oddychaniu beztlenowemu także poprzez regulację enzymów glikolitycznych, rozkładających cukry złożone do cukrów prostych. Do enzymów tych należą: heksokinaza (HK), aldolazy, kinaza fosfoglicerynianowa 1 (PGK1), enolaza, kinaza pirogronianowa M (PKM) oraz dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA) [36, 59]. Zwiększenie tempa glikolizy beztlenowej powoduje wzmożoną produkcję pirogronianu, który następnie, w reakcji katalizowanej przez LDHA, jest przekształcany do mleczanu. W efekcie dochodzi do wzrostu zakwaszenia komórek. Regulacja pH komórek zależy od HIF-1, który indukuje działanie anhydrazy węglanowej IX (CA-IX), katalizującej powstawanie jonów HCO_3^-. Jony te są następnie transportowane do wnętrza komórki. Jednocześnie mleczan transportowany jest z cytozolu poza błonę komórkową. Wzrost zakwaszenia przestrzeni zewnątrzkomórkowej pobudza migrację komórek nowotworowych.

http://rcin.org.pl

Dlatego CA-IX uznawany jest za czynnik sprzyjający przeżywalności komórek i ich bardziej inwazyjnemu fenotypowi.

W hipoksji dochodzi również do zaburzeń w cyklu Krebsa i fosforylacji oksydacyjnej oraz indukcji autofagii mitochondriów [59, 60]. Przykładem jest zależne od HIF-1 obniżenie aktywności dehydrogenazy pirogronianowej, przekształcającej pirogronian powstały z glikolizy w acetylo-CoA, będący substratem cyklu Krebsa. W warunkach beztlenowych ulega zmianie także metabolizm lipidów. Dodatkowo zwiększona zostaje ekspresja czynnika transkrypcyjnego Myc, regulującego metabolizm glutaminy (Gln), istotny dla syntezy aminokwasów, kwasów nukleinowych i kwasów tłuszczowych. Wzrost utleniania Gln potęguje proliferację komórek nowotworowych, ich niestabilność genetyczną i inwazyjność.

W warunkach hipoksji dochodzi również do nasilenia angiogenezy poprzez wzrost aktywności czynników proangiogennych przy jednoczesnym zahamowaniu czynników antyangiogennych [43, 56]. HIF-1 indukuje nadekspresję czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) i jego receptora VEGFR, receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF), transformującego czynnika wzrostu beta (TGF-β) oraz istotnego w rozwoju nowotworów glejopochodnych - płytkopochodnego czynnika wzrostu B (PDGF-B). Prowadzi to do wzmożonego formowania, w większości nieprawidłowych, naczyń krwionośnych. Takie wadliwe unaczynienie sprzyja rozwojowi nowotworu i nasila migrację komórek nowotworowych do miejsc lepiej natlenowanych. Wzrost inwazyjności związany jest także z wytworzeniem fenotypu mezenchymalnego, indukowanego między innymi przez EGF, TGF-β i PDGF [66, 67]. Towarzyszą mu zmiany ekspresji białek adhezyjnych (kadheryny, integryn) i czynników transkrypcyjnych (ZEB1, Twist, SNAI1 i SNAI2, jak również HIF1α i HIF2α).

Niedotlenienie indukuje również zmiany w mechanizmach kontrolowanej śmierci komórek [46]. Mutacji ulega między innymi gen *p53*, pełniący istotną rolę w kontroli cyklu komórkowego oraz aktywacji apoptozy. Wzrost poziomu zmutowanego *p53* skutkuje osłabieniem apoptozy i wzrostem niestabilności genetycznej. Co więcej, gen ten może wówczas aktywować działanie telomeraz, dodatkowo nadekspresjonowanych w warunkach hipoksji, i w ten sposób spowalniać

http://rcin.org.pl

utratę telomerów przez chromosomy. W efekcie komórki nowotworowe mogą podlegać niekontrolowanej liczbie podziałów mitotycznych. Pod wpływem hipoksji dochodzi także do zaburzenia równowagi pomiędzy inhibitorami (np. Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-W) i promotorami apoptozy, należącymi do rodziny białek Bcl-2 (np. Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs). HIF-1 indukuje miedzy innymi nadekspresję czynnika antyapoptotycznego Bcl-2 i przez to uodparnia komórki na toksyczne działanie chemioterapeutyków. Co więcej, białko Bcl-2 może być aktywowane w warunkach hipoksji na drodze niezależnej od HIF-1, poprzez ścieżkę jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB, indukującego transkrypcję *COX-2*, który stymuluje angiogenezę i aktywność Bcl-2 [36]. Jednocześnie dochodzi do spadku aktywności proapoptotycznego czynnika Bax. Komórki nowotworowe wykształcają mechanizmy obrony, regulujące programowaną śmierć na różnych jej etapach. Przykładowo, w warunkach hipoksji w komórkach *glioblastoma* dochodzi do nadekspresji białka proapoptotycznego BNIP3, jednakże zostaje ono zatrzymane w jądrze komórkowym, przez co indukcja apoptozy zostaje zahamowana [33].

Występujące w guzach nowotworowych obszary niedotlenienia stanowią idealne nisze dla wzrostu tzw. nowotworowych komórek macierzystych (ang. *cancer stem cells*, CSCs) [63]. Ograniczenia w dostępie tlenu sprzyjają utrzymaniu stanu niezróżnicowania przez te komórki. W nowotworowych komórkach macierzystych dochodzi do nadekspresji takich czynników jak VEGF, HIF-1, jak również HIF-2. Również w nowotworach mózgu w warunkach hipoksji obserwuje się wzrost markerów komórek macierzystych (np. CD133, CD44) i populacji komórek o cechach zbliżonych do komórek macierzystych (ang. *glioblastoma stem-like cells*, GSCs) [56, 61]. Obecność takich komórek zwiększa oporność nowotworów na stosowane terapie oraz ryzyko wystąpienia nawrotów choroby.

1.3. Hiperbaria tlenowa

W procesie oddychania tlen rozprowadzany jest po całym organizmie za pośrednictwem krwi poprzez dwa mechanizmy transportowe. Dominuje transport oparty na tworzeniu nietrwałego kompleksu tlenu cząsteczkowego z hemoglobiną, tzw. oksyhemoglobiny. Tlen uwalniany jest z tego kompleksu po dotarciu do tkanek, w których ciśnienie pO_2 jest niższe. W warunkach normalnego ciśnienia atmosferycznego zmianie w oksyhemoglobinę ulega około 97% hemoglobiny [46].

http://rcin.org.pl

Drugi mechanizm polega na transporcie O_2 w formie rozpuszczonej w osoczu krwi. Osocze wysycone jest tlenem tylko w 0,32%. Pozwala to założyć, że w przypadku zwiększenia ilości tlenu dostającego się do krwiobiegu, „nadmiar" O_2 rozprowadzany byłby dalej do tkanek właśnie przez osocze [68]. Zgodnie z prawem Henry'ego, wzrost ciśnienia cząstkowego pO_2 we wdychanym powietrzu skutkowałby wzrostem liczby cząsteczek tlenu w osoczu krwi a następnie w tkankach organizmu [69]. Zwiększenie ciśnienia cząstkowego tlenu wdychanego przez organizm można osiągnąć poprzez zastosowanie terapii z wykorzystaniem natleniania hiperbarycznego (ang. *hyperbaric oxygen therapy*, HBOT). Tlenem hiperbarycznym (ang. *hyperbaric oxygen*, HBO) nazywamy tlen podawany pod ciśnieniem większym niż 1 atmosfera, która odpowiada ciśnieniu atmosferycznemu panującemu na powierzchni ziemi na poziomie morza [70]. Zastosowanie HBO pozwala na zwiększenie dystansu dyfuzji tlenu w głąb tkanek i dotarcie rozpuszczonego O_2 do obszarów słabo unaczynionych [47]. Ponadto, tlen hiperbaryczny zwiększa elastyczność erytrocytów oraz zmniejsza agregację płytek krwi, co dodatkowo wpływa korzystnie na poprawę stanu natlenowania tkanek. Co więcej, HBO wpływa także korzystnie na procesy angiogenezy, aktywację fagocytozy oraz produkcję kolagenu przez fibroblasty. Powyższe zalety natleniania hiperbarycznego, w połączeniu z jego znikomą toksycznością, sprawiły, że HBOT znalazła zastosowanie w leczeniu wielu stanów patologicznych, wywołanych niedotlenieniem (hipoksją) lub niedokrwieniem (ischemią) [69, 71]. Standardowe procedury HBOT zakładają oddychanie pacjentów niemal czystym (~100%) tlenem, podawanym pod ciśnieniem od 1,5 do 2,5 atmosfer absolutnych (ATA), przy czym atmosfera absolutna rozumiana jest jako suma ciśnienia atmosferycznego i ciśnienia manometrycznego, panującego w komorze hiperbarycznej [47]. Tlen hiperbaryczny jest szeroko stosowany jako terapia wspomagająca w leczeniu wielu schorzeń, takich jak uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjne [72-74], tętnicze zatory gazowe [75, 76], zatrucie tlenkiem węgla [77-79], późne uszkodzenia popromienne [80-83], choroba dekompresyjna [84], trudno gojące się rany [85, 86], złamania kości [87, 88] i dysfunkcje wątroby [89].

http://rcin.org.pl

1.3.1. Zastosowanie natleniania hiperbarycznego w leczeniu nowotworów

Jak opisano powyżej, jednym z głównych powodów niskiej skuteczności terapii przeciwnowotworowych jest występowanie w guzach litych obszarów silnie niedotlenionych. Podejrzewa się, że jednym ze sposobów na skuteczną poprawę stanu natlenowania tkanki nowotworowej mogłoby być natlenianie hiperbaryczne. Potwierdzono eksperymentalnie, że wdychanie czystego tlenu lub karbogenu o zwiększonym ciśnieniu skutkuje nawet 5-krotną poprawą natlenowania tkanki guza i redukcją obszarów hipoksyjnych w różnych modelach *in vivo* [51, 90]. Istnieje wiele publikacji poświęconych możliwości zastosowania natleniania hiperbarycznego w leczeniu nowotworów [46, 47, 91, 92]. Początkowe doniesienia literaturowe były jednak dość rozbieżne. Wyniki badań niektórych autorów sugerowały, iż podawanie tlenu pod zwiększonych ciśnieniem może sprzyjać proliferacji komórek nowotworowych, tak jak ma to miejsce w przypadku fibroblastów i komórek nabłonka podczas procesu gojenia się ran [85, 93-95]. Takie rezultaty mogły być spowodowane zastosowaniem bardziej intensywnej terapii HBO, niż jest to rekomendowane. Ostatecznie niemal jednoznacznie wykluczono owo ryzyko i udowodniono, że o ile sam tlen hiperbaryczny może powodować jedynie spowolnienie rozwoju choroby, to jego zastosowanie, jako leczenia wspomagającego terapie standardowe (radio- i chemioterapię, terapię fotodynamiczną), skutkuje nasileniem ich efektu terapeutycznego [96]. Użycie HBO, skojarzonego z zabiegami resekcji chirurgicznej, może pomóc złagodzić dolegliwości i przyspieszyć proces gojenia się ran pooperacyjnych i skrócić okres rekonwalescencji pacjentów [97]. Ponadto, podawanie tlenu pod zwiększonym ciśnieniem indukuje w komórkach nowotworowych tzw. przejście mezenchymalno-epitelialne (MET), skutkujące konwersją złośliwego fenotypu mezenchymalnego w bardziej łagodny fenotyp nabłonkowy [98].

1.3.1.1. Zastosowanie natleniania hiperbarycznego w skojarzeniu z radioterapią

Powszechnie wiadomo, że terapia z wykorzystaniem promieniowania jonizującego daje najkorzystniejsze rezultaty wobec guzów wykazujących dobry stopnień natlenowania. Natomiast leczenie silnie niedotlenionej tkanki

http://rcin.org.pl

nowotworowej wymaga użycia większych dawek promieniowania, przez co zwiększa się ryzyko wystąpienia powikłań popromiennych [99]. Obecność cząsteczek tlenu jest kluczowa dla skutecznego działania radioterapii (RT), która w głównej mierze oparta jest na występowaniu tzw. „klasycznego efektu tlenowego". Efekt ten polega na radiolizie cząsteczek wody, w wyniku której dochodzi do powstania niestabilnych rodników wodorowych ($H^{\bullet}$) i hydroksylowych ($HO^{\bullet}$), które z kolei wchodzą w reakcje z tlenem cząsteczkowym. Produktami tych reakcji są reaktywne formy tlenu, takie jak rodniki wodoronadtlenkowe ($HO_2^{\bullet}$) i nadtlenki wodoru (H_2O_2), które powodują uszkodzenia struktur komórkowych i nici DNA. Prowadzi to do zaburzeń podziałów komórkowych oraz procesów metabolicznych, a ostatecznie do śmierci komórek [48, 100]. „Efekt tlenowy" stanowi pośredni, jednak dominujący mechanizm działania RT. Bezpośredni, ale mniej efektywny mechanizm polega na wywołaniu uszkodzenia przez wolne elektrony, powstałe wskutek absorpcji promieniowania przez tkankę nowotworową. Podawanie tlenu hiperbarycznego pomaga zwiększyć natlenowanie guza i przez to uwrażliwić go na działanie radioterapii. Skutkuje to redukcją masy guza przy jednoczesnej minimalizacji ryzyka wystąpień powikłań popromiennych [81, 91, 101]. Liczne badania *in vivo* oraz próby kliniczne łączenia RT z HBO potwierdzają, że tego rodzaju terapia kombinowana przynosi korzystniejsze efekty niż napromieniowywanie w warunkach normobarycznych i przyczynia się do wydłużenia przeżywalności pacjentów [102-104]. Niestety, jej skuteczność wydaje się być zależna od rodzaju nowotworu i jest niższa w przypadku np. guzów pęcherza moczowego [103]. Rozbieżne wyniki otrzymano także przy próbach stosowania RT/HBO w leczeniu nowotworów głowy i szyi, w których odnotowywano liczne skutki uboczne. Mogło być to jednak spowodowane zastosowaniem bardziej agresywnej terapii kombinowanej, niż jest to rekomendowane [104-108].

1.3.1.2. Zastosowanie natleniania hiperbarycznego w połączeniu z chemioterapią

Natlenianie hiperbaryczne ma korzystny wpływ na procesy angiogenezeny i sprzyja formowaniu prawidłowych naczyń krwionośnych. Podawanie HBO do litych guzów nowotworowych może pomóc naprawić ich wadliwe unaczynienie

http://rcin.org.pl

i polepszyć transport krwi w obrębie całej zmiany patologicznej. Dzięki temu, usprawnieniu ulega również transport substancji leczniczych, które mogą wnikać w głąb guza i docierać do większej liczby komórek nowotworowych [46, 47]. Ponadto, stosowanie HBOT skutkuje wzrostem ciśnienia cząstkowego tlenu we krwi, co prowadzi do wzrostu stresu oksydacyjnego i produkcji dużych ilości reaktywnych form tlenu (ROS). ROS powodują utlenianie struktur komórkowych, uszkodzenia nici DNA, apoptozę i śmierć komórek. Ich produkcję przez komórki eukariotyczne indukują także niektóre leki, stosowane w chemioterapii [100]. Niestety, mutacje wywoływane przez ROS mogą zaburzać proces apoptozy i prowadzić do wykształcenia przez komórki fenotypu oporności na podawane związki cytotoksyczne. Nasilenie stresu oksydacyjnego, poprzez wspomaganie chemioterapii natlenianiem hiperbarycznym, może umożliwić przezwyciężenie mechanizmów obronnych i wywołać śmierć komórek nowotworowych. Zastosowanie cisplatyny i HBO w badaniach *in vivo* pokazuje, że takie połączenie może dawać pozytywne efekty terapeutyczne w leczeniu nowotworów jajnika, jednakże nasilenie właściwości cytotoksycznych tej substancji pod wpływem tlenu hiperbarycznego ostatecznie odbija się negatywnie na ogólnym stanie pacjentek [109, 110]. Bardziej obiecujące wydają się być próby łączenia HBOT z 5-fluorouracylem, w których zaobserwowano wzrost stężenia badanego związku i spadek progresji nowotworów w porównaniu z kontrolnymi grupami normooksyjnymi [111-113]. Co istotne, opisany efekt występował tylko wtedy, gdy 5-FU podawano bezpośrednio po natlenianiu hiperbarycznym. Istnieją również doniesienia dotyczące stosowania HBO w połączeniu z doksorubicyną [114] oraz artemizyniną, stosowaną także w leczeniu malarii [115]. Z kolei zestawienie działania HBO z karboplatyną lub karboplatyną i hipertermią dawało pozytywne wyniki w leczeniu mięsaka kości i nowotworów płuc [116-118].

1.3.1.3. Zastosowanie natleniania hiperbarycznego w leczeniu nowotworów glejopochodnych mózgu

Tlen hiperbaryczny wykorzystywano również w badaniach nad możliwościami leczenia nowotworów mózgu, w tym glejaka złośliwego [119]. Stosowanie HBO może poprawić stopień natlenowania tkanki nowotworowej szczególnie w przypadku guzów litych, zawierających obszary silnie niedotlenione.

http://rcin.org.pl

Bezpośrednio po oddychaniu czystym tlenem, podawanym pod zwiększonym ciśnieniem, stopień natlenowania *glioblastoma* może wzrosnąć nawet kilkukrotnie i osiągnąć poziom zbliżony do stanu zdrowej tkanki [34, 52, 120]. Efekt ten nie jest jednak trwały, co ma znaczenie w przypadku łączenia HBOT z innymi rodzajami terapii. Stosowanie monoterapii tlenem hiperbarycznym daje niejednoznaczne rezultaty. Część doniesień opisuje pozytywny efekt terapeutyczny podawania czystego tlenu oraz HBO na zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych glejaków oraz indukcję apoptozy w warunkach *in vitro* i *in vivo* [47, 54]. Inne badania jednak sugerowały, że natlenianie hiperbaryczne może zwiększać ryzyko rozwoju choroby, na przykład poprzez indukcję angiogenezy, jednakże, podobnie jak w przypadku guzów o innej lokalizacji, było to zazwyczaj związane ze stosowaniem większych dawek HBO niż rekomendowane [121, 122].

Badania nad zastosowaniem RT skojarzonej z HBOT doprowadziły do konkluzji, że prowadzenie napromieniowywania w atmosferze tlenu hiperbarycznego może dawać pozytywne efekty terapeutyczne w przypadku nowotworów glejopochodnych, ale jednocześnie zwiększa ryzyko wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych [123-125]. Ustalono, że optymalna i bezpieczna procedura medyczna powinna bazować na przeprowadzaniu radioterapii bezpośrednio po zakończeniu natleniania, nie dłużej jednak niż w ciągu 15 min [125, 126]. Po tym czasie pO_2 znów znacząco spada, co obniża efektywność takiej terapii. Dzięki zastosowaniu proponowanego podejścia udało się w badaniach eksperymentalnych uzyskać znaczące zahamowanie wzrostu oraz redukcję masy guzów, jak również wydłużyć czas przeżycia pacjentów [127]. HBOT daje obiecujące rezultaty także w połączeniu z bardziej zaawansowanymi, mniej inwazyjnymi technikami RT, na przykład z frakcjonowaną radioterapią stereotaktyczną (ang. *fractionated stereotactic radiotherapy*, FSRT) [128]. FSRT polega na podawaniu do guza kilku frakcji wysokich dawek promieniowania przy niewielkiej ingerencji w zdrową tkankę.

W celu poprawy skuteczności leczenia glejaków prowadzone są także badania nad możliwością wsparcia natlenianiem hiperbarycznym standardowej chemioterapii. Udowodniono, że HBO poprawia dystrybucję karboplatyny w prawidłowo zachowanych strukturach mózgu oraz wydłuża czas jej utrzymywania się w tkance nowotworowej glejaków [129, 130]. Niestety, nie znalazło

http://rcin.org.pl

to jednoznacznego przełożenia na poprawę stanu klinicznego leczonych pacjentów. Obiecująco przedstawia się natomiast eksperymentalna terapia kombinowana z zastosowaniem HBO i temozolomidu. Wyniki badań zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* sugerują, że wspomaganie TMZ działaniem tlenu hiperbarycznego znacząco obniża proliferację i żywotność komórek nowotworowych, zmniejsza angiogenezę oraz indukuje zmiany apoptotyczne w glejakach [131, 132]. Taka kombinowana terapia wpływa także na osłabienie mechanizmów lekooporności, wykształcanych przez te komórki. Odnosi się to zarówno do grup doświadczalnych nietraktowanych żadną terapią, jak i poddawanych działaniu samego TMZ i samego HBO. Co więcej, natlenianie hiperbaryczne zwiększa również wrażliwość komórek glejaków na działanie cytotoksyczne nimustyny (ACNU) [133]. Zastosowanie HBO/nimustyny w badaniach *in vivo* skutkowało istotnym spadkiem masy i objętości guzów glejopochodnych w stosunku do prób kontrolnych, jak i jednoczynnikowych (samo HBO lub sama ACNU) oraz obniżeniem poziomu genów, nadekspresjonowanych w stanach zapalnych.

Wśród eksperymentalnych terapii złośliwych glejaków, interesująca wydaje się proponowana terapia wieloczynnikowa, będąca połączeniem interferonu-beta, nimustyny i radioterapii (tzw. *IAR therapy*), wspomaganych dodatkowo podawaniem tlenu pod zwiększonym ciśnieniem. Dotychczas uzyskane wyniki sugerują, że terapia HBO/IAR zwiększa odpowiedź na leczenie u pacjentów ze zdiagnozowanym gwiaździakiem anaplastycznym oraz *glioblastoma* [134]. Inny rodzaj terapii wieloczynnikowej bazuje na zastosowaniu HBO, radioterapii oraz chemioterapii z użyciem prokarbazyny, nimustyny i winkrystyny [135-137]. Tutaj także obserwowano zahamowanie rozwoju choroby i poprawę przeżywalności pacjentów z glejakami, w tym z GBM (do 17,2 miesięcy). Niestety odnotowano także liczne przypadki toksycznego działania proponowanej strategii terapeutycznej. W najnowszych doniesieniach, dotyczących leczenia *glioblastoma*, natlenianie hiperbaryczne stosowano bezpośrednio przed radioterapią o zmiennej intensywności (ang. *intensity-modulated radiotherapy*, IMRT), połączonej z chemioterapią z użyciem temozolomidu lub ranimustyny+interferonu-beta [138]. Zastosowanie IMRT pozwalało na podanie pacjentom większej dawki promieniowania jonizującego niż podczas klasycznej radioterapii, bez wzrostu ryzyka wystąpienia

http://rcin.org.pl

działań niepożądanych. Uzyskane wyniki sugerują, że proponowane podejście jest bezpieczne dla pacjentów i pozwala na wydłużenie przeżycia do 22,1 miesiąca.

1.4. Pochodne izotiomocznika

Wykształcane przez nowotwory mechanizmy oporności na leczenie sprawiają, że wciąż trwają poszukiwania bardziej efektywnych chemioterapeutyków. Nową, obiecującą grupę związków cytotoksycznych stanowią pochodne izotiomocznika. Są to związki amfifilowe, posiadające silnie zasadową grupę izotiomocznikową. Ich stała dysocjacji (pK_a) wynosi około 10, co oznacza, że w fizjologicznym pH występują jako kationy [139-141]. Wykazano, że pochodne izotiomocznika posiadają zdolność do obniżania aktywności syntaz tlenku azotu (NOSs) [142-144]. NOSs katalizują w organizmie syntezę tlenku azotu (NO) poprzez oksydację L-argininy do L-cytruliny w obecności tlenu cząsteczkowego i kofaktorów: NADPH, FAD, tetrahydrobiopteryny (BH_4). Różne izoformy NOSs pośredniczą w sygnalizacji międzykomórkowej, reakcjach odpornościowych (niszczenie patogenów przez makrofagi) oraz regulacji funkcji naczyń krwionośnych. Natomiast nadmierna ekspozycja na działanie tlenku azotu może być niekorzystna i sprzyjać rozwojowi wielu stanów chorobowych, między innymi procesów neurodegeneracyjnych, depresji oraz nowotworów [145-148]. Dlatego zahamowanie aktywności syntaz tlenku azotu w przypadkach takich chorób może dawać skuteczny efekt terapeutyczny [149]. Pochodne izotiomocznika, w tym jego S-benzylopochodne, oprócz zdolności do hamowania aktywności NOSs, posiadają także właściwości antybakteryjne [144]. Co więcej, wykazano również, że S-benzylopochodne izotiomocznika mogą skutecznie hamować aktywność 2,3-dioksygenazy indoloaminy (IDO), katalizującej reakcję degradacji tryptofanu (Trp) [150]. Obniżenie stężenia Trp powoduje spadek proliferacji limfocytów T, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania odpowiedzi immunologicznej na różne patogeny i wytworzenia tzw. immunotolerancji [151, 152]. IDO jest nadekspresjonowana zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w stanach patologicznych, takich jak choroby nowotworowe i neurodegeneracyjne (np. choroba Alzheimera). Zwiększona aktywność IDO w nowotworach stanowi negatywny czynnik prognostyczny, ponieważ umożliwia komórkom nowotworowym „ucieczkę” spod kontroli systemu odpornościowego. Z tego względu trwają prace nad

http://rcin.org.pl

poszukiwaniem skutecznych inhibitorów IDO do zastosowania w terapii przeciwnowotworowej [153, 154].

W ostatnich latach ukazały się prace badawcze dokumentujące skuteczność pochodnych izotiomocznika w leczeniu nowotworów [155, 156]. Obiecujące wydają się szczególnie wyniki badań uzyskane przy zastosowaniu heterocyklicznych pochodnych izoitiomocznika [157], zwłaszcza S-benzylopochodnych, oznaczonych skrótem ZKKs. Wiele spośród ZKKs wykazuje właściwości cytotoksyczne i proapoptotyczne wobec różnych rodzajów komórek nowotworowych *in vitro*: linii komórkowych ludzkiego glejaka złośliwego - *glioblastoma,* raka prostaty oraz białaczki [139, 140, 158]. Po ekspozycji komórek nowotworowych na działanie pochodnych pentabromobenzyloizotiomocznika obserwowano zmiany morfologiczne o cechach typowych dla apoptozy w postaci obkurczenia cytoplazmy, kondensacji chromatyny jądrowej i tworzenia ciałek apoptotycznych. Apoptoza związana była z aktywacją kaspaz wykonawczych 3 i 7, a następnie proteolizą polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP), której wzmożona aktywność sprzyja procesowi nowotworzenia. Obserwowano jednocześnie depolaryzację błony mitochondrialnej, co sugeruje, że apoptoza ta przebiega według szlaku wewnętrznego, zależnego od mitochondriów [139, 140, 158]. Co więcej, S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)izotiomocznik (ZKK-1) wykazywał działanie cytotoksyczne także wobec linii komórkowych *glioblastoma* ze zmutowanymi genami supresorowymi *PTEN* i *TP53* [158]. Mutacje tych genów występują często w nowotworach glejopochodnych, a ich występowanie wiąże się ze wzrostem leko- i radiooporności. Ponadto, wybrane pochodne pentabromo-izotiomocznika indukowały śmierć komórek linii białaczki limfoblastycznej, zawierającej tzw. chromosom Philadelphia (Ph), którego obecność jest negatywnym czynnikiem prognostycznym w leczeniu ostrych białaczek limfoblastycznych [139].

Wśród początkowo przebadanych siedmiu pochodnych pentabromobenzylo-izotiomocznika, najbardziej efektywne okazały się pochodne z N-podstawioną grupą alkilową lub allilową (ZKK-2, -3, -4 i -5). Aktywność cytotoksyczną zmniejszało natomiast przyłączenie do tiomocznika dużego podstawnika N-fenylowego (ZKK-6), bądź podstawienie zamiast bromu w pierścieniu aromatycznym cząsteczek chloru lub fluoru (ZKK-7, -8) [158]. Dalsze badania pozwoliły wyodrębnić kolejne modyfikacje strukturalne o większej aktywności biologicznej. Ostatecznie, spośród wszystkich

http://rcin.org.pl

testowanych substancji, najskuteczniejsze działanie przeciwnowotworowe wykazały związki ZKK-2, ZKK-3, ZKK-9 i ZKK-13.

Budowa strukturalna pentabromobenzyloizotiomoczników jest zbliżona do związków z grupy benzotriazoli (TBB) i benzimidazoli (TBI, DMAT), które są znanymi inhibitorami kinazy kazeinowej 2 (CK2) [158]. Kinaza CK2 to białko tetraheteromeryczne, należące do rodziny kinaz serynowo/treoninowych. Składa się z dwóch podjednostek katalitycznych (α i/lub α'), połączonych dwoma podjednostkami regulatorowymi (β) [159]. CK2 fosforyluje ponad 300 różnych substratów, zaangażowanych w liczne szlaki sygnałowe, regulujące ekspresje genów i funkcje życiowe komórek [160]. Pod wpływem różnych bodźców wzrostowych dochodzi do przemieszczenia CK2 do jądra komórkowego i stymulacji wzrostu oraz proliferacji komórek. Z tego względu, kinaza ta pełni istotną rolę w rozwoju zarówno komórek prawidłowych, jak i nowotworowych. Poziom CK2 różni się w zależności od rodzaju tkanki i jest względnie stały [159, 160]. W trakcie proliferacji komórek następuje wzrost aktywności tej kinazy, a następnie jej spadek do wartości początkowej. Zaobserwowano jednak, że w zdecydowanej większości guzów nowotworowych dochodzi do utrzymującej się nadekspresji CK2 w porównaniu do tkanek zdrowych. Podwyższony poziom CK2 wiąże się z niekorzystną prognozą kliniczną w przypadku nowotworów m. in. płuc, oskrzeli, piersi, jajnika, prostaty, okrężnicy, trzustki, jak również *glioblastoma* [161, 162]. Wzmożona aktywność tej kinazy zwiększa potencjał czynników onkogennych i w efekcie sprzyja transformacji nowotworowej. Co więcej, wykazano, że poprzez regulację funkcji białek ścieżek Wnt/β-kateniny i PI3K/AKT, białek z rodziny Bcl-2, kaspaz i surwiwiny, kinaza CK2 hamuje śmierć komórek oraz obniża efektywność chemicznych i fizycznych induktorów apoptozy, w tym chemio- i radioterapii [160, 163]. Wysoki poziom CK2 wydaje się także sprzyjać inwazyjności nowotworów oraz angiogenezie [159]. Wszystko to sprawia, że zahamowanie CK2 stanowi atrakcyjny cel dla terapii przeciwnowotworowych [159, 160].

Ze względu na podobieństwo strukturalne do znanych inhibitorów CK2 oczekiwano, że ZKKs również będą efektywnie przeciwdziałały aktywności tej kinazy. Jednak badania na panelu 130 kinaz białkowych wykazały, że ZKK-3 (N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)izotiomocznik) bardzo słabo hamuje CK2, natomiast

http://rcin.org.pl

posiada zdolność do specyficznej inhibicji (o ponad 70%) innych kinaz, takich jak PKD1, ERK8, NEK2A, PIM1, PIM3, IGF-1R oraz IR [140, 141].

1.4.1. Kinazy białkowe hamowane przez ZKKs

1.4.1.1. Kinaza białkowa D1 (PKD1)

Kinaza białkowa D1 (PKD1, dawniej zwana PKCμ) należy do rodziny kinaz serynowo/treoninowych, PKD, zależnych od Ca^{2+} i kalmoduliny (CaMK, ang. *Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase*). Wyróżnić można 3 izoformy: PKD1, PKD2 i PKD3, zlokalizowane w różnych przedziałach w komórce: cytozolu, aparacie Golgi'ego, jądrze komórkowym i mitochondriach. Kinazy te zaangażowane są w wiele procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych [164]. Regulują przeżycie, proliferację, ruchliwość i inwazyjność komórek, biorą udział w angiogenezie i pośredniczą w detoksykacji reaktywnych rodników tlenowych i azotowych pochodzenia mitochondrialnego [164, 165]. Mitochondrialne reaktywne formy tlenu (mROS) powstają jako produkty uboczne w łańcuchu transportu elektronów i stanowią pewnego rodzaju wskaźnik aktywności mitochondriów. Pełnią one ważne funkcje w organizmie, biorąc udział w procesach proliferacji, naprawy DNA i programowanej śmierci komórek. Zaburzenie homeostazy mROS może prowadzić do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu komórek, a w konsekwencji do nasilenia procesów starzenia się organizmu i wielu chorób (np. choroby Parkinsona, Alzheimera), w tym rozrostu komórek nowotworowych. PKD1 reguluje mitochondrialno-jądrową ścieżkę sygnałową odpowiedzi na mROS indukując geny odpowiedzialne za ich przeciwutlenianie i w ten sposób chroni mitochondria i całe komórki przed uszkodzeniami, spowodowanymi stresem oksydacyjnym [165].

PKD1 zbudowana jest z N-końcowych domen regulatorowych, odpowiedzialnych za autoinhibicję C-końcowej domeny katalitycznej [164, 166]. Kinaza ta może być aktywowana poprzez różne mechanizmy i w zależności od tego może pełnić różne role w komórkach [164, 165]. Klasyczny mechanizm aktywacji oparty jest na translokacji nieaktywnej PKD1 z cytozolu do błony komórkowej i jej połączeniu z cząsteczką diacyloglicerolu (DAG) lub podjednostką białka błonowego G (Rycina 1a). Następnie zachodzi jej fosforylacja w pętli aktywacyjnej dwóch reszt serynowych, w której pośredniczą nowe izoformy kinazy białkowej PKC (nPKC). W ludzkiej odmianie PKD1 są to seryny Ser 738 i Ser 742, zaś w mysiej Ser 744

http://rcin.org.pl

i Ser 748. W ten sposób cząsteczka PKD1 zostaje uwolniona spod autoinhibicji i przechodzi w formę aktywną. Ostatecznie PKD1 ulega autofosforylacji na serynie Ser 910 (u człowieka, u myszy Ser 916) i w tej końcowej formie może regulować różne ścieżki sygnałowe w komórkach nowotworowych [166].

Druga ścieżka aktywacji indukowana jest wzrostem stężenia mROS w komórce (Rycina 1b) [166, 167]. Pod wpływem stresu oksydacyjnego nieaktywna PKD1 ulega translokacji do błony mitochondriów, gdzie zachodzi jej fosforylacja na reszcie Tyr 463, regulowana przez niereceptorowe kinazy tyrozynowe (c-Abl i Src). Dzięki temu powstaje miejsce mogące przyłączyć izoformę delta kinazy białkowej C (PKCδ), przy udziale której PKD1 jest ponownie fosforylowana w pętli aktywacyjnej reszt serynowych Ser 738 i Ser 742. Końcowym etapem jest autofosforylacja aktywnej PKD1 w miejscu Ser 910.

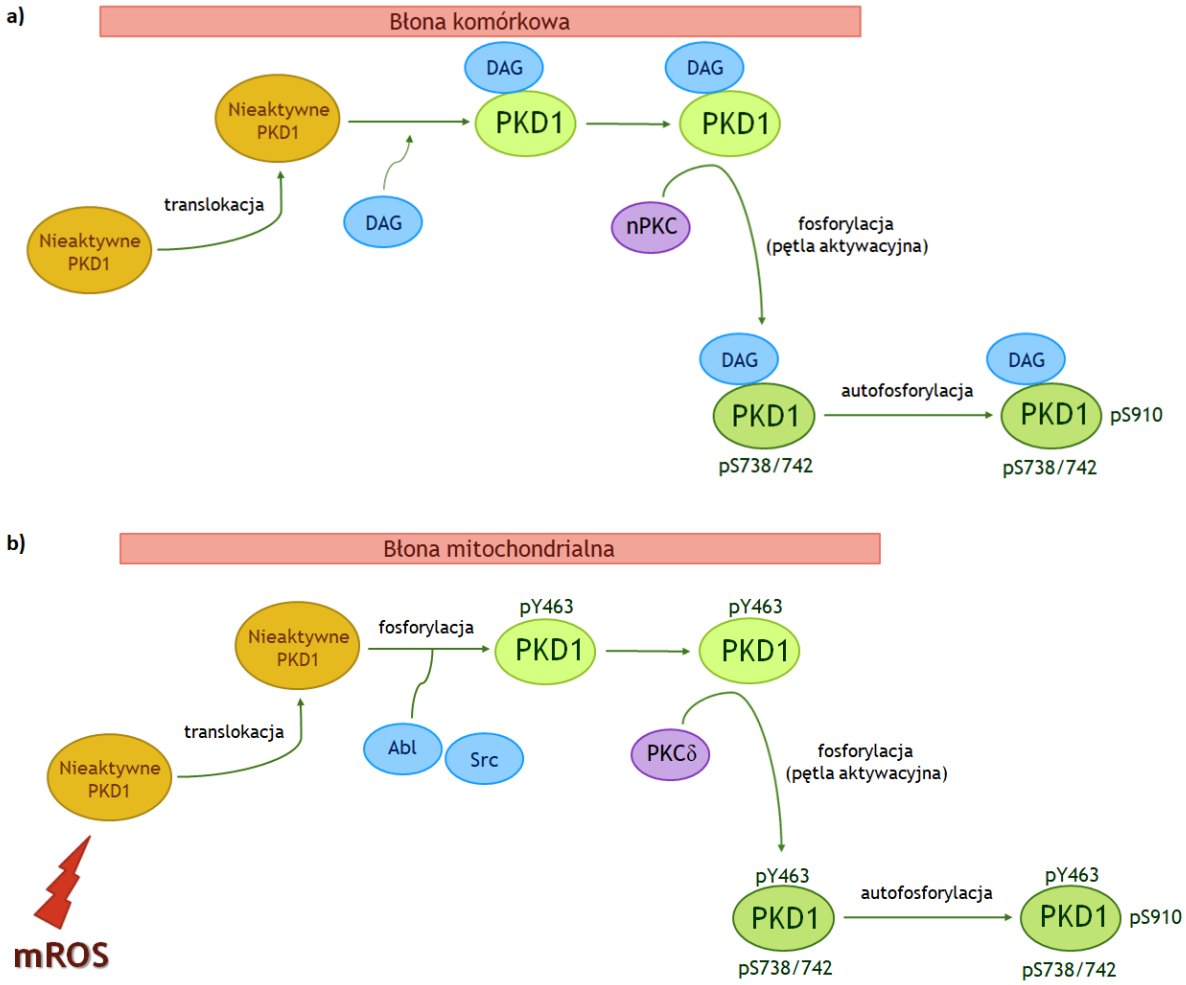
Ponadto, aktywacja PKD1 może być także spowodowana działaniem kaspazy 3 lub agonistów receptora błonowego GPCR (receptor sprzężony z białkiem G). Z kolei w kardiomiocytach poziom PKD1 zależy od zlokalizowanych na błonach komórkowych receptora α_1-adrenergicznego (ang. *alpha-1 adrenergic receptor*, α_1-AR) lub receptora endoteliny-1 [166].

Kinaza białkowa D1 reguluje wiele niezależnych lub częściowo ze sobą powiązanych szlaków sygnałowych. Dlatego jej nadekspresja, wywołana mutacjami lub związkami chemicznymi, odgrywa duża rolę w progresji wielu chorób, w tym procesów nowotworowych [164]. Jedną z kluczowych funkcji PKD1 jest bezpośrednia lub mediowana czynnikiem transkrypcyjnym NF-κB aktywacja genu *SOD2*, kodującego mangano-zależną mitochondrialną dysmutazę ponadtlenkową (MnSOD) [168]. Dysmutaza ta katalizuje reakcję detoksykacji szkodliwych nadtlenków do nadtlenku wodoru H_2O_2, który jest następnie degradowany przez białka oksydacyjne (np. peroksydazę glutationową) do bezpiecznych produktów, chroniąc w ten sposób komórki przed stresem oksydacyjnym.

PKD1 aktywuje również jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (NF-κB), przyczyniając się do degradacji kinazy inhibitora κB (IKK), co sprzyja przeżywalności i proliferacji komórek, hamuje apoptozę i zwiększa detoksykację wolnych rodników [164, 165]. Tylko PKD1 aktywowana na drodze fosforylacji reszty Tyr 463 może indukować działanie NF-κB w odpowiedzi na bezpośredni stres oksydacyjny bądź poprzez aktywację białka szoku cieplnego Hsp27. Co więcej,

http://rcin.org.pl

PKD1 regulując geny *SOD2* i *A20* (gen antyapoptotyczny) chwilowo zwiększa poziom H_2O_2 w komórce i dodatkowo stymuluje NF-κB. Niestety, wysoka aktywność NF-κB może również prowadzić do wykształcania lekooporności w obrębie nowotworów. Zahamowanie działania PKD1 zwiększa natomiast śmiertelność komórek wywołaną ROS.



Rycina 1. Ścieżki aktywacji kinazy białkowej D1 (PKD1): klasyczna (a) i indukowana mitochondrialnymi reaktywnymi formami tlenu (b). W ludzkiej odmianie PKD1 fosforylacja zachodzi na resztach Ser 738/742 oraz Ser 910, zaś w mysiej na resztach Ser 744/748 oraz Ser 916.

Z kolei pod wpływem działania agonistów receptora błonowego GPCR dochodzi do nadekspresji PKD1, aktywacji szlaku MAPK (szlak kinaz białkowych, aktywowanych mitogenami) i akumulacji białka c-Fos [164]. *c-Fos* jest protoonkogenem komórkowym, kodującym czynnik transkrypcyjny Fos. W efekcie

http://rcin.org.pl

następuje wzrost syntezy DNA, progresja cyklu komórkowego i proliferacja komórek, co z kolei prowadzi do wykształcania przez nie złośliwego fenotypu.

Co więcej, PKD1 posada zdolność do tworzenia kompleksu z kinazą JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinases*), aktywowaną stresem [165]. Pod wpływem zwiększonego stężenia H_2O_2 i tlenku azotu, kinaza JNK fosforyluje i obniża ekspresję białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-Xl. W efekcie dochodzi do uwolnienia do cytozolu nadtlenków, cytochromu c, jonów Ca^{2+} oraz do aktywacji kaspaz i ostatecznie do apoptozy komórek. Powstawanie kompleksu PKD1-JNK hamuje indukcję śmierci komórek przez JNK i ich „unieśmiertelenienie", co ma znaczenie w rozwoju nowotworów.

Poprzez fosforylację białka szoku cieplnego Hsp27, PKD1 hamuje także działanie receptora androgenowego (AR), prowadząc do niekontrolowanej proliferacji i wzrostu przeżywalności, między innymi, komórek raka prostaty [164, 169]. Ponadto, poprzez fosforylację enzymów deacetylaz histonowych obniża deacetylację histonów, co sprzyja angiogenezie i wzrostowi guzów nowotworowych.

Nadekspresja PKD1 sprzyja rearanżacji cytoszkieletu aktynowego oraz utrzymaniu epitelialnego fenotypu komórek nowotworowych i dzięki temu hamuje ich migrację i zdolność do dawania przerzutów [170]. Z drugiej strony, jej izoformy, PKD2 oraz PKD3, nasilają inwazyjność komórek nowotworowych. Wykazano, że wyciszanie aktywności PKD2 obniża migrację komórek *glioblastoma in vitro* [171].

Zmiany ekspresji kinazy białkowej D1 zaobserwowano w różnych procesach nowotworowych [164, 172]. I tak, wyraźne obniżenie poziomu PKD1 udokumentowano w raku piersi, żołądka i jelit [173, 174]. W przypadku raka prostaty uzyskano wyniki niejednoznaczne: część badań sugerowała wzrost aktywności PKD1, podczas gdy inne badania wykazały spadek aktywności tej kinazy w guzach niezależnych od androgenu. Ostatnio udokumentowano, że niski poziom ekspresji PKD1 sprzyja agresywności i inwazyjności raka prostaty [175]. Z kolei w raku trzustki i skóry poziom PKD1 jest znacznie podwyższony. Również w nowotworach glejopochodnych, w tym *glioblastoma*, ekspresja kinaz z rodziny PKD (PKD1, PKD2, PKD3) jest nasilona i zależy od stopnia złośliwości guza, a ich inhibicja obniża proliferację komórek GBM [176]. Co więcej, udowodniono,

http://rcin.org.pl

że w warunkach hipoksji dochodzi do aktywacji izoform PKD, co może wiązać się z opornością komórek nowotworowych na stosowane inhibitory PKD1 [177].

Aktywność PKD1 można badać bezpośrednio lub mierząc poziom jej formy z ufosforylowaną Ser 910. Istnieją jednak doniesienia sugerujące, że ze względu na możliwość fosforylacji Ser 910 na drodze innej niż autofosforylacja, najwłaściwszym byłoby dokonywanie także pomiarów poziomu formy PKD1 z ufosforylowanymi Ser 738/742 [166].

1.4.1.2. Inne kinazy białkowe hamowane przez ZKKs

Kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym 8 (ERK8), znana też jako kinaza białkowa aktywowana mitogenami 15 (MAPK15), to nowo odkryty członek rodziny kinaz serynowo/treoninowych ERK, wchodzących w skład rodziny kinaz MAPK [178]. Podobnie jak pozostałe kinazy ERK, zawiera ona w sekwencji aminokwasowej swojej domeny kinazowej tzw. motyw TEY, złożony z reszt aminokwasowych: treoniny - kwasu glutaminowego - tyrozyny. Aktywność ERK8 regulowana jest poprzez przyłączanie kinazy c-Src fosforylującej reszty Thr i Tyr w motywie TEY, natomiast podanie inhibitorów c-Src skutkuje spadkiem jej poziomu [178]. Kinaza ta wchodzi w skład kaskady sygnałowej regulującej procesy, takie jak proliferacja, różnicowanie i przeżywalność komórek. ERK8 nasila proliferację komórek poprzez aktywację ścieżki sygnałowej c-Jun, aktywację telomeraz oraz autofagię [179, 180]. Z tego względu nadekspresja ERK8 sprzyja transformacji nowotworowej i wykształcaniu agresywnego fenotypu komórek. Zaobserwowano, że o ile w prawidłowych tkankach poziom ERK8 jest względnie umiarkowany, to w guzach nowotworowych jest on znacznie podwyższony (np. w nowotworach tarczycy, okrężnicy, żołądka) lub obniżony (np. w nowotworach płuc czy piersi) [180]. Z kolei zahamowanie aktywności ERK8 spowalnia proliferację komórek nowotworowych, powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1/S oraz zmniejszenie rozmiarów i stopnia złośliwości histologicznej guzów. Jednocześnie jednak nasila zdolności komórek nowotworowych do migracji, co zwiększa ryzyko powstawania przerzutów [181]. Korzystna struktura przestrzenna ERK8 stwarza potencjalną możliwość zaprojektowania wysoce selektywnych inhibitorów tej kinazy i poprawę efektów leczenia [180, 182].

http://rcin.org.pl

NEK2A to skrótowa nazwa izoformy A kinazy 2 związanej z NIMA (ang. *Never in Mitosis (NIMA) related kinase 2 A*), pełniącej istotną rolę w regulacji podziałów komórkowych, w tym duplikacji i rozdziale centrosomu, organizacji i stabilizacji mikrotubul, przyłączaniu kinetochoru, organizacji wrzeciona podziałowego, kondensacji chromatyny, wyrównywaniu ułożenia chromosomów i składaniu mRNA [183, 184]. Nasila ona także odpowiedź immunologiczną poprzez pobudzanie produkcji limfocytów B. NEK2A zbudowana jest z N-końcowej domeny katalitycznej oraz C-końcowej domeny regulatorowej, w obrębie której, po dimeryzacji, zachodzi szereg transautofosforylacji, regulujących aktywność tej kinazy. Poziom NEK2A zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego: w fazie G1 jest on niski, następnie rośnie w fazach S i G2, by znów gwałtownie spaść w wyniku ubikwityncji i degradacji proteasomalnej na początku fazy podziałów komórkowych [184]. Aktywność NEK2A może być hamowana także poprzez p53 czy defosforylującą ją fosfatazę białkową 1 (PP1) lub pobudzana w wyniku działania czynnika transkrypcyjnego FoxM1, kinaz PLK1 i CDK4. Z kolei sama NEK2A reguluje działanie białek mitotycznych (np. Hec1, MAD1, MAD2), białka TRG-1, β-kateniny i SRSF1, a przez to znaczną część procesów zachodzących podczas podziałów komórkowych. W wielu typach nowotworów, w tym w *glioblastoma*, odnotowano podwyższony poziom NEK2A, co stanowi negatywny czynnik prognostyczny [184, 185]. Jej nadekspresja jest przyczyną niestabilności chromosomalnej, przez co promuje powstawanie i progresję nowotworów, proliferację komórek nowotworowych oraz tworzenie przerzutów [183, 186]. Dodatkowo przyczynia się ona do osłabienia apoptozy i wykształcania oporności na chemioterapię, głównie poprzez aktywację pomp, biorących udział w „wyrzucaniu" cząsteczek leków z komórek i eliminacji leków z organizmu [187]. Z tego względu zahamowanie aktywności NEK2A wydaje się być atrakcyjnym celem dla nowych strategii terapeutycznych.

Rodzina PIM to rodzina kinaz serynowo/treoninowych, do której należą kinazy PIM1, PIM2 oraz PIM3. Nie posiadają one domeny regulatorowej, zatem kontrola ich aktywności zachodzi wyłącznie na poziomie transkrypcji i translacji oraz poprzez degradację proteasomalną. Wyróżniamy dwie izoformy PIM1: PIM1L oraz PIM1S, różniące się rozmiarem, zakresem oddziaływania i lokalizacją wewnątrzkomórkową [188]. Transkrypcja obu izoform regulowana jest przez

http://rcin.org.pl

interleukiny (głównie IL-2, -3 i -6), które aktywują szlak sygnałowy kinaz JAK, fosforylujących następnie białka szlaku STAT. Ufosforylowane kinazy STAT3 i STAT5 indukują transkrypcję genu *PIM1*. Ekspresja *PIM1* może być też nasilona w warunkach hipoksji [189]. Kinaza PIM1 może fosforylować czynniki zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, proliferację, wzrost i śmierć komórek i w ten sposób kontrolować przebieg tych procesów [188]. Przykładowo, fosforylacja regulatorów p21 i p27 powoduje ich dysocjację i dalszą progresję cyklu komórkowego, zaś fosforylacja proapoptotycznego białka Bad skutkuje zahamowaniem jego aktywności i wzrostem przeżywalności komórek. Ponadto PIM1 spowalnia procesy starzenia zachodzące w komórkach. Nadekspresja PIM1 zwiększa ryzyko powstawania i rozwoju wysoce złośliwych nowotworów oraz dawania przerzutów. Podwyższony poziom tej kinazy odnotowano między innymi w nowotworach prostaty, chłoniakach, białaczkach oraz potrójnie ujemnych rakach piersi (ang. *triple-negative breast cancers*, TNBCs) [189, 190]. Współdziałanie *PIM1* i onkogenu *Myc* nasila proliferację i agresywność nowotworów. Co więcej, wykazano, iż kinaza ta znacząco obniża wrażliwość komórek nowotworowych na stosowaną chemioterapię, między innymi poprzez aktywację transporterów białek błonowych, „wyrzucających" leki poza komórkę oraz blokowanie receptorów aktywatorów apoptozy (np. Etk) [188]. Ponieważ PIM1 regulowana jest przez interleukiny, obiecująco zapowiada się możliwość zahamowania jej aktywności przy użyciu immunoterapii z zastosowaniem specyficznych przeciwciał np. przeciwciała monoklonalnego P9 [188]. W fazie badań przedklinicznych są również prace nad selektywnymi inhibitorami tej kinazy, takimi jak związki AZD1208 czy SGI-1776, gdyż spadek jej poziomu wydaje się być względnie bezpieczny dla organizmu, natomiast może mieć duże znaczenie w leczeniu nowotworów.

Z kolei PIM3 ekspresjonowana jest w wielu zdrowych tkankach. I tak w trzustce, jelitach i wątrobie jej poziom jest stosunkowo niski, jednak drastycznie rośnie w przypadku nowotworów tych narządów [191, 192]. Ekspresja PIM3 nie jest bezpośrednią przyczyną nowotworzenia, ale sprzyja i przyspiesza rozwój nowotworów, wywołany innymi czynnikami kancerogennymi. Kinaza ta, podobnie jak PIM1, fosforyluje i obniża aktywność Bad oraz p27, hamując w ten sposób apoptozę komórek nowotworowych i indukując progresję cyklu komórkowego [193]. Co więcej, PIM3 inaktywuje kinazę AMPK, zwiększa poziom c-Myc i PGC-1α,

http://rcin.org.pl

co skutkuje wzrostem syntezy białek i dodatkowym nasileniem procesu nowotworowego. Wysoki poziom PIM3 związany jest ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej guzów i ich unaczynienia, zdolności do migracji komórek i dawania przerzutów, a także utrzymaniem charakteru nowotworowych komórek macierzystych [193-195]. PIM3 zawiera w swej sekwencji regiony mogące przyłączać czynniki transkrypcyjne, takie jak NF-κB, STAT3, Sp1 oraz Ets1, co wskazuje, że to one mogą regulować aktywność tej kinazy [191]. Istnieją również doniesienia sugerujące zwiększenie poziomu tej kinazy pod wpływem nadekspresji białka antyapoptotycznego TCTP [192]. PIM3 jest sekwencyjnie bardzo zbliżona do innych kinaz rodziny PIM, w szczególności do PIM1, dlatego trudno zaprojektować inhibitory specyficzne jedynie wobec danego przedstawiciela tych kinaz. Tak jak w przypadku PIM1, brak ekspresji PIM3 nie niesie za sobą poważnych skutków ubocznych dla organizmu [191].

Receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1R) oraz receptor insuliny (IR) wchodzą w skład rodziny czynników wzrostu IGF/insulina. Do rodziny tej należy również trzeci receptor M-6-PR, trzy cząsteczki o charakterze ligandów: insulina, IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1) i IGF-2 (insulinopodobny czynnik wzrostu 2), a także sześć typów białek wiążących IGFs (IGFBPs) [196]. IGR-1R i IR to receptory transbłonowe o aktywności kinaz tyrozynowych, wysoce homologiczne pod względem struktury. Są heterotetramerami zbudowanymi z par zewnątrzkomórkowych podjednostek α i transbłonowych podjednostek β, połączonych wiązaniami disiarczkowymi. Przyłączenie ligandów do podjednostek α skutkuje autofosforylacją podjednostek β i aktywacją receptorów.

IGF-1R wiąże głównie IGF-1, w mniejszym stopniu IGF-2 i insulinę. Po aktywacji może fosforylować substraty receptora insulinowego (IRSs) i w ten sposób uruchamiać ścieżkę sygnalizacyjną PI3K/AKT, powodującą wzrost metabolizmu komórek, syntezę protein oraz zahamowanie apoptozy [197]. Z drugiej strony, IGF-1R może fosforylować białko SHC, co prowadzi do inicjacji ścieżki sygnałowej RAS/RAF/MEK/ERK i nasilenia proliferacji komórek. Zaobserwowano, że w wielu typach komórek nowotworowych, w tym w GBM, dochodzi do nadekspresji IGF-1R, co z kolei sprzyja proliferacji, różnicowaniu, inwazyjności i przeżywalności komórek [197-199]. Co więcej, wzrost poziomu tego receptora powiązany jest ze wzrostem oporności komórek nowotworowych, także glejaków,

http://rcin.org.pl

na radio- i chemioterapię (np. temozolomid). Z tego względu uznano go za atrakcyjny cel w projektowaniu terapii przeciwnowotworowych, przy czym oznaczanie jego poziomu pozwoliłoby wyodrębnić pacjentów podatnych na takie leczenie [200]. Terapia skierowana przeciwko IGF-1R oparta jest na zastosowaniu monoklonalnych przeciwciał neutralizujących oraz małocząsteczkowych inhibitorów aktywności kinazy tyrozynowej [196]. Związki te stosowano samodzielnie lub w połączeniu ze standardowymi chemioterapeutykami. Niestety, o ile początkowe wyniki badań *in vitro*, *in vivo* i fazy przedklinicznej wydawały się bardzo obiecujące, to ostateczne rezultaty badań klinicznych były negatywne [199, 201]. Okazuje się, że przyczyną niepowodzenia w/w terapii może być aktywność drugiego z receptorów ścieżki sygnałowej IGF, receptora insuliny (IR), również nadekspresjonowanego w komórkach nowotworowych [201, 202]. Wyróżniamy dwie izoformy receptora insuliny: krótszą IR-A oraz dłuższą IR-B [203], które różnią się budową podjednostek α i zdolnością przyłączania przez nie ligandów. Obie izoformy mogą wiązać insulinę i w ten sposób regulować metabolizm komórek poprzez szlak PI3K/AKT. IR-A wykazuje dodatkowo wysokie powinowactwo względem IGF-2, co sprzyja rozwojowi nowotworów i tworzeniu przerzutów. Szlak mitogenny zachodzi poprzez kaskadę sygnałową RAS/RAF/MEK/ERK. Jak wspomniano powyżej, IR i IGF-1R wykazują wysoką wzajemną homologię. Z tego powodu oba mogą wiązać jako ligandy insulinę, IGF-1 oraz IGF-2, choć z różnym powinowactwem. Ponadto, w warunkach nadekspresji obu receptorów może dochodzić do powstawania tzw. receptorów hybrydowych (HR), zawierających podjednostki α i β, pochodzące zarówno od IR, jak i IGF-1R [203]. Ponieważ IR występuje w dwóch izoformach, to dwa są również receptory hybrydowe: HR-A i HR-B. Tworzenie HR zwiększa powinowactwo receptorów składowych do ligandów, dzięki czemu mogą je chętniej przyłączać. W konsekwencji pronowotworowe działanie IGF-1R może zostać indukowane nawet w przypadku inhibicji IGF-1, na przykład przez insulinę. Co więcej, występowanie HRs obniża efektywność terapii selektywnych wobec IGF-1R. Wykazano, że zahamowanie działania IR powoduje spadek proliferacji komórek nowotworowych, zaburzenia w formowaniu naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz zwiększa ryzyko przerzutów [204]. Co równie istotne, obniżenie ekspresji IR skutkuje także wzrostem wrażliwości guzów na terapie skierowane przeciwko IGF-1R [202].

http://rcin.org.pl

2. Cel i założenia pracy

Celem prowadzonych badań była ocena wpływu różnych warunków tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego, na potencjał przeciwnowotworowy wybranej pochodnej izotiomocznika – ZKK-3 wobec komórek nowotworowych linii złośliwego glejaka T98G *in vitro*.

Cele szczegółowe obejmowały:

1) Porównanie proliferacji oraz żywotności komórek nowotworowych linii T98G w różnych warunkach tlenowych: normoksji, anoksji oraz hipoksji.
2) Ocenę wpływu natleniania hiperbarycznego na proces proliferacji oraz żywotność komórek nowotworowych linii T98G.
3) Ocenę wpływu HBO na poziom ekspresji białka HIF-1α w komórkach nowotworowych linii T98G.
4) Ocenę efektu cytotoksycznego pochodnej izotiomocznika ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych oraz przy zastosowaniu natleniania hiperbarycznego.
5) Ocenę wpływu ZKK-3 na poziom ekspresji kinazy białkowej PKD1 oraz poziom jej form ufosforylowanych: pPKD1 (Ser 916) i pPKD1 (Ser 744/748) w różnych warunkach tlenowych oraz przy zastosowaniu natleniania hiperbarycznego.

Przyjęta hipoteza badawcza zakładała, że podawanie tlenu hiperbarycznego pozwoli na obniżenie stopnia niedotlenienia komórek *glioblastoma* linii T98G, uwrażliwiając je tym samym na działanie wybranej pochodnej izotiomocznika, co może stanowić potencjalnie skuteczną linię działania w terapii przeciwnowotworowej. Można było przypuszczać, że hamowanie aktywności kinazy PKD1 przez ZKK-3 może spotęgować stres oksydacyjny i w związku z tym nasilić efekt antyproliferacyjny proponowanego połączenia ZKK-3/HBO.

http://rcin.org.pl

3. Materiały i metody

3.1. Model badawczy

Doświadczenia prowadzono na ludzkiej linii komórkowej złośliwego glejaka - *glioblastoma* T98G (*American Type Culture Collection*) o IV-tym stopniu złośliwości histologicznej wg klasyfikacji WHO.

Komórki linii T98G hodowano na szalkach Petriego o średnicy 10 cm w standardowych warunkach tlenowych w temp. 37°C. Jako medium hodowlanego używano pożywki MEM zawierającej 10% surowicy bydlęcej. Pożywkę MEM uzyskano poprzez zmieszanie 500 ml *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM, Sigma-Aldrich), 56,8 ml FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco), 5,7 ml mieszaniny antybiotyków *Penicillin Streptomycin* (Gibco) oraz 5,7 ml *MEM non-essential Amino Acid Solution* (Sigma-Aldrich). Wymiany pożywki dokonywano co 48 godzin w warunkach komory laminarnej. Stan hodowli monitorowano codziennie przy użyciu mikroskopu odwróconego z kamerą (*Inverted Microscope DIAPHOT-TMD*, Nikon). Po osiągnięciu przez hodowlę stanu konfluencji komórki poddawano pasażowi w warunkach komory laminarnej: usuwano starą pożywkę, dwukrotnie przemywano szalkę 3 ml roztworu PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, Gibco), a następnie podawano 1 ml trypsyny (*0,05% Trypsin-EDTA*, Gibco) i umieszczano na ok. 2 minuty w inkubatorze w temp. 37°C. Po tym czasie na szalkę podawano 1 ml pożywki MEM i odklejano komórki z dna szalki. Zawiesinę komórek umieszczano w falkonie, wirowano przez 5 min przy obrotach 1500 rpm, a następnie usuwano supernatant i zawieszano osad (pelet) w 1 ml pożywki MEM. Uzyskaną zawiesinę komórek przenoszono na świeże szalki i uzupełniano pożywką MEM do objętości 10 ml. Szalki umieszczano w inkubatorze hodowlanym w standardowych warunkach tlenowych w temp. 37°C.

Do doświadczeń używano komórek od trzeciego do siódmego pasażu.

3.1.1. Przygotowanie lizatów komórkowych

Z szalki Petriego o średnicy 10 cm, zawierającej komórki linii T98G, usuwano pożywkę MEM, dwukrotnie przemywano szalkę 3 ml PBS, a następnie podawano 1 ml trypsyny i umieszczano na ok. 2 minuty w inkubatorze w temp. 37°C. Po tym czasie na szalkę podawano 1 ml MEM i odklejano komórki

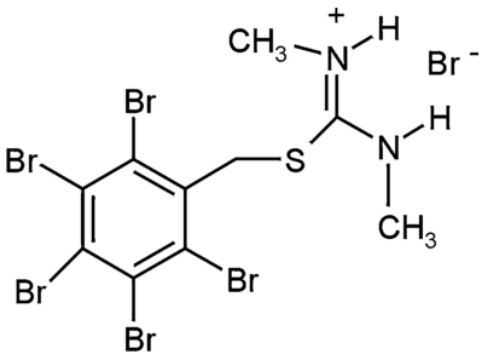
http://rcin.org.pl

z dna szalki. Zawiesinę komórek wirowano przez 5 min przy obrotach 1500 rpm, a następnie usuwano supernatant i zawieszano pelet w 2 ml pożywki MEM. Pobierano 30 µl zawiesiny komórkowej, podawano na hemocytometr i pod mikroskopem (*Inverted Microscope DIAPHOT-TMD*, Nikon) określano liczbę komórek. Komórki wysiewano na szalki Petriego o średnicy 10 cm w liczbie $1 \cdot 10^6$ komórek na szalkę i dodawano 10 ml pożywki MEM. Komórki preinkubowano w temp. 37°C w różnych warunkach tlenowych: 1/ normoksji, 2/ hipoksji, 3/ hiperbarii tlenowej, 4/ podwójnej hipoksji, 5/ hipoksji/hiperbarii tlenowej. Po 24 godzinach komórki poddawano działaniu badanego związku cytotoksycznego. Dbając o to, aby nie uszkodzić rosnących komórek, z szalek usuwano starą pożywkę i podawano 10 ml pożywki MEM, zawierającej związek ZKK-3 w stężeniach 10 µM, 25 µM i 50 µM. Następnie komórki inkubowano w temp. 37°C w odpowiednim do przypisanych warunków środowisku tlenowym. Po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3 komórki poddawano lizie roztworem lizującym *RIPA Lysis Buffer System* (Santa Cruz), będącym mieszaniną 10 ml buforu lizującego RIPA (*RIPA Lysis Buffer*), 10 µl PMSF, 10 µl ortowanadianu sodu (*Sodium Orthovanadate*) oraz 10 µl koktajlu inhibitorów proteaz (*Protease Inhibitor Cacktail*). Procedurę przeprowadzano trzymając szalki z komórkami oraz roztwory lizujące na lodzie. Z szalki usuwano pożywkę, dwukrotnie przemywano 1 ml PBS, a następnie podawano 600 µl roztworu lizującego. Zeskrobywano komórki z dna szalki i przenoszono do probówek typu Eppendorf. Gotowe lizaty przechowywano w temp. -80°C.

3.2. Badana pochodna izotiomocznika

Do badań efektu cytotoksycznego użyto modyfikowanej pochodnej izotiomocznika – N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)izotiomocznika (ZKK-3) (Rycina 2). Związek został zsyntetyzowany przez prof. dr hab. Zygmunta Kazimierczuka. Związek rozpuszczano w dimetylosulfotlenku (DMSO) (*Dimethyl sulfoxide*, AppliChem) otrzymując roztwory o stężeniach 10 µM, 25 µM i 50 µM.

http://rcin.org.pl



Rycina 2. Wzór strukturalny N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)-izotiomocznika (ZKK-3)

3.3. Stosowane warunki tlenowe

Porównywano wpływ różnych warunków tlenowych na potencjał proliferacyjny komórek linii T98G oraz efekt przeciwnowotworowy wybranego związku cytotoksycznego. Hodowle prowadzono w standardowych warunkach hodowlanych (normoksja), środowisku całkowicie pozbawionym tlenu (anoksja), środowisku o obniżonej zawartości tlenu (hipoksja) oraz w warunkach zwiększonego ciśnienia tlenu (hiperbaria tlenowa). Stosowano także warunki kombinowane: hipoksja/hipoksja oraz hipoksja/ hiperbaria tlenowa.

3.3.1. Normoksja

Normoksja odpowiadała standardowym warunkom tlenowym, jakie są zapewniane hodowlom komórkowym poprzez zastosowanie mieszaniny gazowej o składzie procentowym 21% O_2/ 5% CO_2/ 74% N_2.

Komórki linii T98G hodowane *in vitro* wysiewano na szalki Petriego lub płytki wielodołkowe, uzupełniano pożywką hodowlaną i inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze hodowlanym w standardowych warunkach tlenowych (normoksji). Następnie komórki poddawano działaniu ZKK-3 i ponownie umieszczano na 24 godziny w środowisku normoksji w temp. 37°C.

3.3.2. Anoksja

Anoksja odpowiadała warunkom tlenowym, uzyskanym poprzez zastosowanie mieszaniny gazowej o składzie procentowym 5% CO_2/ 95% N_2.

http://rcin.org.pl

Komórki linii T98G hodowane *in vitro* wysiewano na szalki Petriego lub płytki wielodołkowe, uzupełniano pożywką hodowlaną i inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze hodowlanym w standardowych warunkach tlenowych (normoksji). Po tym czasie komórki poddawano działaniu badanej pochodnej izotiomocznika ZKK-3. Następnie, w warunkach komory laminarnej, umieszczano otwarte szalki w wysterylizowanej komorze anoksyjno-hipoksyjnej (*Modular Incubator Chamber MIC-101*, Billups-Rothenberg) (Rycina 3), którą szczelnie zamykano. Przez 10 minut przez komorę przepuszczano mieszaninę azotu (przepływ 10 l/min) oraz dwutlenku węgla (przepływ 500 ml/min), po czym zamykano zawór odprowadzający, napełniano komorę gazem anoksyjnym i umieszczano na 24 godziny w temp. 37°C.

Rycina 3. Komora do hodowli komórek w warunkach anoksyjnych i hipoksyjnych *Modular Incubator Chamber MIC-101* (Billups-Rothenberg).

3.3.3. Hipoksja

Hipoksja odpowiadała warunkom tlenowym, uzyskanym poprzez zastosowanie mieszaniny gazowej o składzie procentowym 1% O_2/ 5% CO_2/ 94% N_2.

Komórki linii T98G hodowane *in vitro* wysiewano na szalki Petriego lub płytki wielodołkowe, uzupełniano pożywką hodowlaną i inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze hodowlanym w standardowych warunkach tlenowych

http://rcin.org.pl

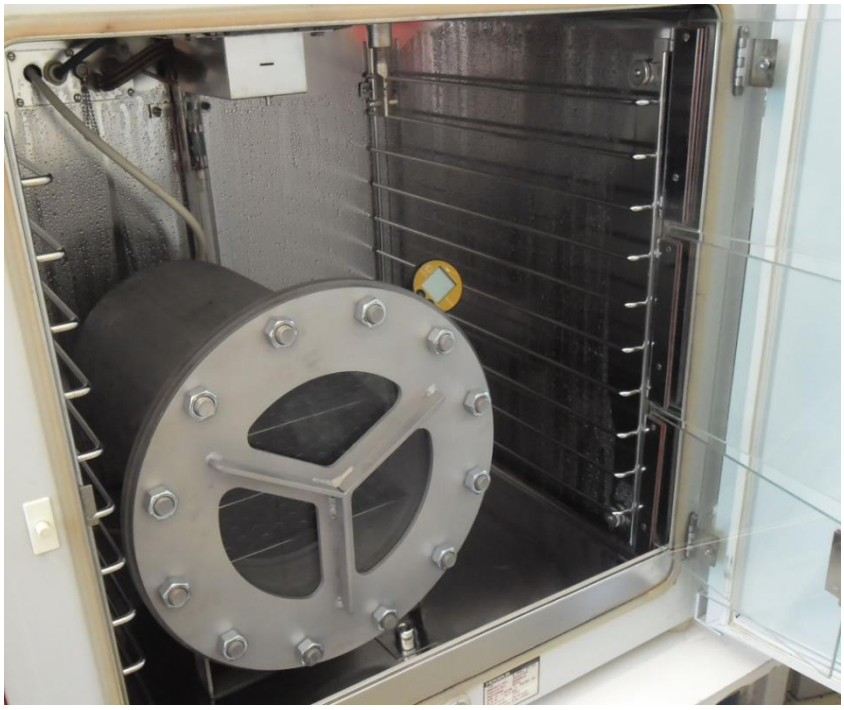
(normoksji). Po tym czasie komórki poddawano działaniu badanego związku cytotoksycznego. Następnie, w warunkach komory laminarnej, umieszczano otwarte szalki w wysterylizowanej komorze anoksyjno-hipoksyjnej (*Modular Incubator Chamber MIC-101*, Billups-Rothenberg) (Rycina 3). Dla zapewnienia optymalnej wilgotności środowiska hodowlanego na dnie komory umieszczano otwartą szalkę Petriego z wodą destylowaną i szczelnie zamykano komorę. Przez komorę przepuszczano przez 10 minut gaz hipoksyjny, po czym zamykano zawór odprowadzający, napełniano komorę gazem hipoksyjnym do ciśnienia 2 psi i umieszczano na 24 godziny w temp. 37°C.

3.3.4. Hiperbaria tlenowa

Hiperbarię tlenową uzyskiwano poprzez zastosowanie mieszaniny gazowej o składzie procentowym 97,5% O_2/2,5% CO_2 pod ciśnieniem 2 ATA.

Komórki linii T98G hodowane *in vitro* wysiewano na szalki Petriego lub płytki wielodołkowe, uzupełniano pożywką hodowlaną, a następnie inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze hodowlanym w standardowych warunkach tlenowych (normoksji). Po tym czasie komórki poddawano działaniu ZKK-3. Następnie otwarte szalki umieszczano w wysterylizowanej komorze hiperbarycznej (wykonanej na zamówienie wg. własnego projektu) (Rycina 4), ustawionej w inkubatorze o temp. 37°C. Dla zapewnienia optymalnej wilgotności środowiska hodowlanego na dnie komory umieszczano otwartą szalkę Petriego z wodą destylowaną po czym szczelnie zamykano pokrywę komory. Przez komorę przepuszczano przez 10 minut mieszaninę tlenu i dwutlenku węgla, po czym zamykano zawór odprowadzający gaz i napełniano komorę aż do osiągnięcia w jej wnętrzu ciśnienia 2 ATA (tempo napełniania komory wynosiło ok. 0,1 bar/min). Komórki inkubowano w warunkach hiperbarii tlenowej w temp. 37°C przez 1 godzinę. Następnie otwierano zawór odprowadzający w stopniu zapewniającym powolny, stopniowy wypływ gazu z wnętrza komory (tempo opróżniania komory wynosiło ok. 0,1 bar/min). Szalki z komórkami nakrywano wieczkami i umieszczano w standardowych warunkach tlenowych (normoksji) w temp. 37°C na 23 godziny.

http://rcin.org.pl



Rycina 4. Komora do hodowli komórek w warunkach hiperbarii tlenowej (wykonana na zamówienie wg. własnego projektu).

3.3.5. Hipoksja/hipoksja (podwójna hipoksja)

Podwójną hipoksją nazwano warunki, w których komórki hodowane były w atmosferze gazu hipoksyjnego (1% O_2/ 5% CO_2/ 94% N_2) zarówno po, jak i przed podaniem badanej pochodnej izotiomocznika.

Komórki linii T98G hodowane *in vitro* wysiewano na szalki Petriego lub płytki wielodołkowe, uzupełniano pożywką hodowlaną, a następnie, w warunkach komory laminarnej, umieszczano otwarte szalki w wysterylizowanej komorze anoksyjno-hipoksyjnej (*Modular Incubator Chamber MIC-101*, Billups-Rothenberg) (Rycina 3). Dla zapewnienia optymalnej wilgotności środowiska hodowlanego na dnie komory umieszczano otwartą szalkę Petriego z wodą destylowaną i szczelnie zamykano komorę. Przez komorę przepuszczano przez 10 minut gaz hipoksyjny, po czym zamykano zawór odprowadzający, napełniano komorę gazem hipoksyjnym do ciśnienia 2 psi i umieszczano na 24 godziny w temp. 37°C. Po tym czasie wyjmowano komorę z inkubatora i w warunkach komory laminarnej spuszczano z niej gaz, otwierano i wyjmowano szalki z komórkami. Następnie komórki poddawano działaniu badanego związku cytotoksycznego i ponownie umieszczano

http://rcin.org.pl

w komorze anoksyjno-hipoksyjnej. Komorę napełniano gazem hipoksyjnym do ciśnienia 2 psi i umieszczano na 24 godziny w temp. 37°C.

3.3.6. Hipoksja/hiperbaria tlenowa

Hipoksją/hiperbarią tlenowaną nazwano warunki, w których początkowo komórki były preinkubowane w atmosferze gazu hipoksyjnego (1% O_2/ 5% CO_2/ 94% N_2), natomiast po podaniu ZKK-3 inkubowano je w środowisku hiperbarii tlenowej (97,5% O2/ 2,5% CO2) pod ciśnieniem 2 ATA.

Komórki linii T98G hodowane *in vitro* wysiewano na szalki Petriego lub płytki wielodołkowe, uzupełniano pożywką hodowlaną, a następnie, w warunkach komory laminarnej, umieszczano otwarte szalki w wysterylizowanej komorze anoksyjno-hipoksyjnej (*Modular Incubator Chamber MIC-101*, Billups-Rothenberg) (Rycina 3). Dla zapewnienia optymalnej wilgotności środowiska hodowlanego na dnie komory umieszczano otwartą szalkę Petriego z wodą destylowaną i szczelnie zamykano komorę. Przez komorę przepuszczano przez 10 minut gaz hipoksyjny, po czym zamykano zawór odprowadzający, napełniano komorę gazem hipoksyjnym do ciśnienia 2 psi i umieszczano na 24 godziny w temp. 37°C. Po tym czasie wyjmowano komorę z inkubatora i w warunkach komory laminarnej spuszczano z niej gaz, otwierano i wyjmowano szalki z komórkami. Następnie komórki poddawano działaniu badanego związku cytotoksycznego. Otwarte szalki umieszczano w wysterylizowanej komorze hiperbarycznej (Rycina 4), ustawionej w inkubatorze o temp. 37°C. Dla zapewnienia optymalnej wilgotności środowiska hodowlanego na dnie komory umieszczano otwartą szalkę Petriego z wodą destylowaną po czym szczelnie zamykano pokrywę komory. Przez komorę przepuszczano przez 10 minut mieszaninę tlenu i dwutlenku węgla, po czym zamykano zawór odprowadzający gaz i napełniano komorę aż do osiągnięcia we wnętrzu komory ciśnienia 2 ATA (tempo napełniania komory wynosiło ok. 0,1 bar/min). Komórki inkubowano w warunkach hiperbarii tlenowej w temp. 37°C przez 1 godzinę. Następnie otwierano zawór odprowadzający w stopniu zapewniającym powolny, stopniowy wypływ gazu z wnętrza komory (tempo opróżniania komory wynosiło ok. 0,1 bar/min). Szalki z komórkami nakrywano wieczkami i umieszczano w standardowych warunkach tlenowych (normoksji) w temp. 37°C na 23 godziny.

http://rcin.org.pl

3.4. Metodyka badawcza

Do oceny wpływu różnych warunków tlenowych i natleniania hiperbarycznego na wzrost komórek nowotworowych linii T98G oraz na efekt cytotoksyczny pochodnej izotiomocznika ZKK-3 przeprowadzono doświadczenia, w których niezależnie od siebie porównano proliferację oraz żywotność badanych komórek w warunkach normoksja – anoksja, normoksja – hipoksja, normoksja – HBO oraz hipoksja – HBO.

3.5. Stosowane procedury

3.5.1. Ocena proliferacji komórek linii T98G

Przyrost liczby komórek określano przy użyciu licznika *Multisizer 3 Coulter Counter* (Beckman Coulter). Z szalki Petriego o średnicy 10 cm, zawierającej komórki linii T98G, usuwano pożywkę MEM, dwukrotnie przemywano szalkę 3 ml PBS, a następnie podawano 1 ml trypsyny i umieszczano na ok. 2 minuty w inkubatorze w temp. 37°C. Po tym czasie na szalkę podawano 1 ml pożywki MEM i odklejano komórki z dna szalki. Zawiesinę komórek umieszczano w falkonie, wirowano przez 5 min przy obrotach 1500 rpm, a następnie usuwano supernatant i zawieszano pelet w 2 ml pożywki MEM. Pobierano 30 µl zawiesiny komórkowej i używając hemocytometru określano pod mikroskopem odwróconym (*Inverted Microscope DIAPHOT-TMD*, Nikon) liczbę komórek. Komórki wysiewano na szalki Petriego o średnicy 6 cm w liczbie $1{,}2 \cdot 10^5$ komórek na szalkę i dodawano 3 ml pożywki MEM. Komórki inkubowano przez 24 godziny w standardowych warunkach tlenowych (normoksji) w temp. 37°C. Po tym czasie komórki poddawano działaniu badanego związku cytotoksycznego. Dbając o to, aby nie uszkodzić rosnących komórek, usuwano starą pożywkę. Podawano 3 ml pożywki MEM, zawierającej związek ZKK-3 w stężeniach 10 µM, 25 µM i 50 µM. Następnie komórki inkubowano w badanych warunkach tlenowych w temp. 37°C. Materiał kontrolny stanowiły hodowle utrzymywane w badanych warunkach tlenowych bez podania badanego związku.

Przyrost liczby komórek określano po 24 godzinach inkubacji. Dbając o to, aby nie uszkodzić rosnących komórek, usuwano pożywkę zawierająca ZKK-3, przemywano szalkę 3 ml PBS, a następnie podawano 0,5 ml trypsyny i umieszczano

http://rcin.org.pl

na ok. 2 minuty w inkubatorze w temp. 37°C. Po tym czasie na szalkę podawano 1 ml pożywki MEM i odklejano komórki z dna szalki. Zawiesinę komórek umieszczano w falkonie, wirowano przez 10 min przy obrotach 1300 rpm, a następnie usuwano supernatant i zawieszano pelet w 1 ml pożywki MEM. Do falkonu podawano 4 ml *Coulter® Isoton® II Diluent* (Beckman Coulter), całość przenoszono do naczynka pomiarowego i dokonywano analizy w liczniku *Multisizer 3 Coulter Counter* (Beckman Coulter).

3.5.2. Ocena żywotności komórek linii T98G

Żywotność komórek badano przy użyciu modyfikowanego testu MTS (*CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega). Z szalki Petriego o średnicy 10 cm, zawierającej komórki linii T98G, usuwano pożywkę MEM, dwukrotnie przemywano szalkę 3 ml PBS, a następnie podawano 1 ml trypsyny i umieszczano na ok. 2 minuty w inkubatorze w temp. 37°C. Po tym czasie na szalkę podawano 1 ml pożywki MEM i odklejano komórki z dna szalki. Zawiesinę komórek umieszczano w falkonie, wirowano przez 5 min przy obrotach 1500 rpm, a następnie usuwano supernatant i zawieszano pelet w 2 ml pożywki MEM. Pobierano 30 µl zawiesiny komórkowej i używając hemocytometru określano pod mikroskopem odwróconym (*Inverted Microscope DIAPHOT-TMD*, Nikon) liczbę komórek. Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w liczbie $5 \cdot 10^3$ komórek na studzienkę i dodawano po 100 µl pożywki MEM. Komórki inkubowano przez 24 godziny w standardowych warunkach tlenowych (normoksji) w temp. 37°C. Po tym czasie komórki poddawano działaniu badanego związku cytotoksycznego. Dbając o to, by nie uszkodzić rosnących komórek, ze studzienek usuwano starą pożywkę. Podawano po 100 µl pożywki MEM, zawierającej związek ZKK-3 w stężeniach 10 µM, 25 µM i 50 µM. Następnie komórki inkubowano w badanych warunkach tlenowych w temp. 37°C. Materiał kontrolny stanowiły hodowle utrzymywane w badanych warunkach tlenowych bez podania badanego związku.

Żywotność komórek badano po 24 i 48 godzinach od podania ZKK-3. Za punkt odniesienia (tzn. 100% żywotności) przyjęto żywotność odnotowaną dla komórek hodowanych w warunkach normoksji bez dodatku badanego związku cytotoksycznego.

http://rcin.org.pl

Dla testów 24-godzinnych, po 24 godzinach inkubacji do studzienek podawano po 20 µl odczynnika barwiącego *CellTiter 96®AQueous One Solution Reagent* (Promega), inkubowano 3 godziny w temp. 37°C, po czym mierzono absorbancję przy analitycznej długości fali λ = 490 nm.
Dla testów 48-godzinnych, po 24 godzinach inkubacji ze studzienek usuwano starą pożywkę, a następnie podawano po 100 µl nowej pożywki MEM, zawierającej ZKK-3 w odpowiednich stężeniach. Do studzienek kontrolnych podawano pożywkę bez dodatku badanego związku. Komórki inkubowano odpowiednio w środowisku normoksji lub anoksji w temp. 37°C przez kolejne 24 godziny. Następnie do studzienek podawano po 20 µl odczynnika barwiącego *CellTiter 96®AQueous One Solution Reagent* (Promega), inkubowano 3 godziny w temp. 37°C, po czym mierzono absorbancję przy analitycznej długości fali λ = 490 nm.

3.5.3. Oznaczanie całkowitego poziomu białka w lizatach komórkowych

Całkowity poziom białka w lizatach komórkowych oznaczano przy użyciu zestawu *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific). Na płytkę 96-dołkową podawano standardy (*Diluted Albumin (BSA) Standards*) oraz próbki lizatów w objętości 25 µl na dołek (każde w trzech powtórzeniach). Dodawano po 200 µl roztworu roboczego BCA (*BCA Working Reagent*), wytrząsano 30 sekund na wytrząsarce, nakrywano płytkę i inkubowano 30 minut w temp. 37°C. Studzono płytkę i mierzono absorbancję przy analitycznej długości fali λ = 562 nm. Wartości absorbancji uzyskane dla standardów oraz próbek lizatów skorelowano o wartość absorbancji uzyskaną dla ślepej próby. W oparciu o wartości uzyskane dla standardów wykonano krzywą standardową i na jej podstawie odczytano stężenia całkowite białka w badanych próbkach.

3.5.4. Oznaczanie ekspresji białka HIF-1α przy użyciu testu ELISA

Ekspresję HIF-1α w komórkach linii T98G oceniano oznaczając jego poziom w lizatach komórkowych metodą testu ELISA przy użyciu zestawu *HIF-1A ELISA Kit* (Thermo Scientific). Na płytkę 96-dołkową (*Anti-HIF-1A Precoated 96-well Strip Plate*) podawano standardy (*Lyophilized Recombinant HIF-1A Standard* rozpuszczane w *Standard Diluent*) oraz próbki lizatów w objętości 50 µl na dołek (każde w trzech powtórzeniach), delikatnie mieszano, nakrywano folią nakrywkową

http://rcin.org.pl

i inkubowano 2 godziny na wytrząsarce w temperaturze pokojowej. Usuwano zawartość dołków i trzykrotnie płukano roztworem płuczącym (*Wash Buffer*). Dodawano po 50 µl *Biotinylated Antibody Reagent*, nakrywano folią nakrywkową i inkubowano 1 godzinę na wytrząsarce w temperaturze pokojowej. Usuwano zawartość dołków i trzykrotnie płukano roztworem płuczącym. Dodawano po 50 µl roztworu streptawidyny-HRP (*Streptavidin-HRP Solution*), nakrywano folią nakrywkową i inkubowano 30 minut na wytrząsarce w temperaturze pokojowej. Usuwano zawartość dołków i trzykrotnie płukano roztworem płuczącym. Dodawano po 100 µl *TMB Substrate Solution*. Odkrytą płytkę inkubowano w ciemności na wytrząsarce w temperaturze pokojowej. Po 30 minutach zatrzymywano reakcję dodając po 100 µl *STOP Solution*. Mierzono absorbancję przy analitycznych długościach fali λ_1 = 450 nm oraz λ_2 = 550 nm. W celu wyeliminowania wpływu interferencji optycznych na wyniki oznaczenia w dalszej analizie posługiwano się wartościami różnicy absorbancji (λ_1- λ_2). Wartości absorbancji uzyskane dla standardów oraz próbek lizatów poprawiono o wartość absorbancji uzyskaną dla ślepej próby. W oparciu o wartości uzyskane dla standardów wykonano krzywą standardową i na jej podstawie odczytano stężenia białka HIF-1α w badanych próbkach.

3.5.5. Oznaczanie ekspresji kinazy białkowej PKD1 i poziomu jej form ufosforylowanych przy użyciu techniki Western Blot

Ekspresję kinazy PKD1 oraz poziom jej form ufosforylowanych: pPKD1 (Ser 916) i pPKD1 (Ser 744/748) w komórkach linii T98G oznaczano w lizatach komórkowych przy użyciu techniki Western Blot.

3.5.5.1. Oznaczanie ekspresji kinazy białkowej PKD1

Lizaty komórkowe mieszano w stosunku 1:1 z buforem obciążającym Laemmli (*Sample Buffer, Laemmli 2x Concentrate*, Sigma-Aldrich), a następnie gotowano 5 minut w łaźni wodnej w temp. 95°C i studzono na lodzie. Na żel do elektroforezy (*Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels*, Bio-Rad) podawano 5 µl standardu wielkości białek (*BlueEye Prestained Protein Marker*, Jena Bioscience) oraz próbki w objętościach odpowiadających 20 µg całkowitego białka. Przy użyciu aparatu *Mini-PROTEAN Tetra cell* (Bio-Rad) przeprowadzano elektroforezę żelową

http://rcin.org.pl

(napięcie 200 V, czas 40 minut). Następnie żel namaczano przez 15 minut w buforze do transferu i przy użyciu aparatu *Mini Trans-Blot*® (Bio-Rad) wykonywano transfer elektroforetyczny na błonę nitrocelulozową (*Nitrocellulose Membranes*, 0.45μm) (napięcie 100 V, czas 75 minut). Błonę po transferze płukano przez 5 minut w temp. 4°C w roztworze PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, Gibco), a następnie blokowano przez 60 minut w buforze blokującym na bazie mleka w temp. 4°C. Błonę inkubowano przez noc w temp. 4°C z przeciwciałem pierwszorzędowym *PKD/PKCμ Antibody* (Cell Signaling, 1:500), rozcieńczonym w buforze do przeciwciał na bazie mleka. Następnie zlewano przeciwciało pierwszorzędowe, płukano błonę trzykrotnie przez 10 minut w rozcieńczonym buforze płuczącym TBS (tTBS) w temperaturze pokojowej i inkubowano przez 2 godziny z przeciwciałem drugorzędowym *Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody* (Cell Signaling, 1:1000) w temp. 4°C. Zlewano przeciwciało drugorzędowe, płukano błonę trzykrotnie przez 10 minut w buforze tTBS, a następnie dwukrotnie przez 1 minutę w buforze płuczącym TBS w temperaturze pokojowej. Usuwano z błony roztwór płuczący i podawano 6 ml odczynnika wywołującego *Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare). Błonę przenoszono do kasety wywołującej, umieszczano na niej kliszę fotograficzną (*Carestream Medical X-ray Blue/MXBE Film*, Carestream) i zamykano kasetę. Wyjmowano kliszę z kasety, wywoływano przez 5 minut w wywoływaczu (*Carestream Dental X-ray Developer*, Carestream Dental), płukano w wodzie destylowanej i utrwalano przez 5 minut w utrwalaczu (*Carestream Dental X-ray Fixer*, Carestream Dental). Następnie kliszę płukano w wodzie destylowanej i suszono.

W celu oznaczenia β-aktyny błonę nitrocelulozową po wywoływaniu poddawano strippingowi w buforze strippującym przez 30 minut w temp. 50°C. Następnie błonę płukano dwukrotnie przez 10 minut w rozcieńczonym buforze płuczącym TBS (tTBS) w temperaturze pokojowej i blokowano przez 60 minut w buforze blokującym na bazie mleka. Błonę inkubowano przez noc z przeciwciałem pierwszorzędowym *Monoclonal Anti-β-Actin Clone AC-15* (Sigma Aldrich, 1:20000) w temp. 4°C. Następnie zlewano przeciwciało, płukano błonę trzykrotnie przez 10 minut w buforze płuczącym tTBS w temperaturze pokojowej i inkubowano przez 2 godziny z przeciwciałem drugorzędowym *Chicken anti-mouse IgG-HRP* (Santa

http://rcin.org.pl

Cruz, 1:5000) w temp. 4°C. Następnie powtarzano procedurę płukania i wywoływania opisaną powyżej.

Stopień zaczernienia prążków widocznych na kliszach obliczano przy użyciu programu *ImageJ 1.50i*.

3.5.5.2. Oznaczanie poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 916)

W celu oznaczenia poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 916) postępowano według procedury opisanej w podpunkcie 3.5.5.1 z tą różnicą że:

- bufor blokujący i bufor do przeciwciał przygotowywane były na bazie albuminy surowicy bydlęcej BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich),
- jako przeciwciała pierwszorzędowego użyto przeciwciała Phospho-PKD/PKCμ (Ser 916) Antibody (Cell Signaling, 1:1000).

3.5.5.3. Oznaczanie poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 744/748)

W celu oznaczenia poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 744/748) postępowano według procedury opisanej w podpunkcie 3.5.5.1 z tą różnicą że:

- bufor blokujący i bufor do przeciwciał przygotowywane były na bazie albuminy surowicy bydlęcej BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich),
- jako przeciwciała pierwszorzędowego użyto przeciwciała Phospho-PKD/PKCμ (Ser 744/748) Antibody (Cell Signaling, 1:1000).

3.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post hoc Tukey'a. Za wartość graniczną p, od której wynik uznawano za statystycznie istotny, przyjęto $p<0,05$.

Oznaczenia w ocenie proliferacji oraz żywotności komórek: * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$ w odniesieniu do kontroli w normoksji lub hipoksji; # - $p<0,05$; ## - $p<0,01$; ### - $p<0,001$ w odniesieniu do kontroli w anoksji, hipoksji lub HBO; † - $p<0,05$; † † - $p<0,01$; † † † - $p<0,001$ porównanie tych samych stężeń ZKK-3 dla różnych warunków tlenowych.

http://rcin.org.pl

Oznaczenia w ocenie ekspresji HIF-1α: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 w odniesieniu do danego stężenia ZKK-3 w normoksji; # - p<0,05; ## - p<0,01; ### - p<0,001 porównanie hipoksji vs. HBO oraz podwójnej hipoksji vs. hipoksja/HBO.

Oznaczenia w ocenie poziomu różnych form PKD1: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w danych warunkach tlenowych; # - p<0,05; ## - p<0,01; ### - p<0,001 w odniesieniu do danego stężenia ZKK-3 w normoksji.

http://rcin.org.pl

4. Wyniki

4.1. Ocena proliferacji komórek linii T98G po podaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych

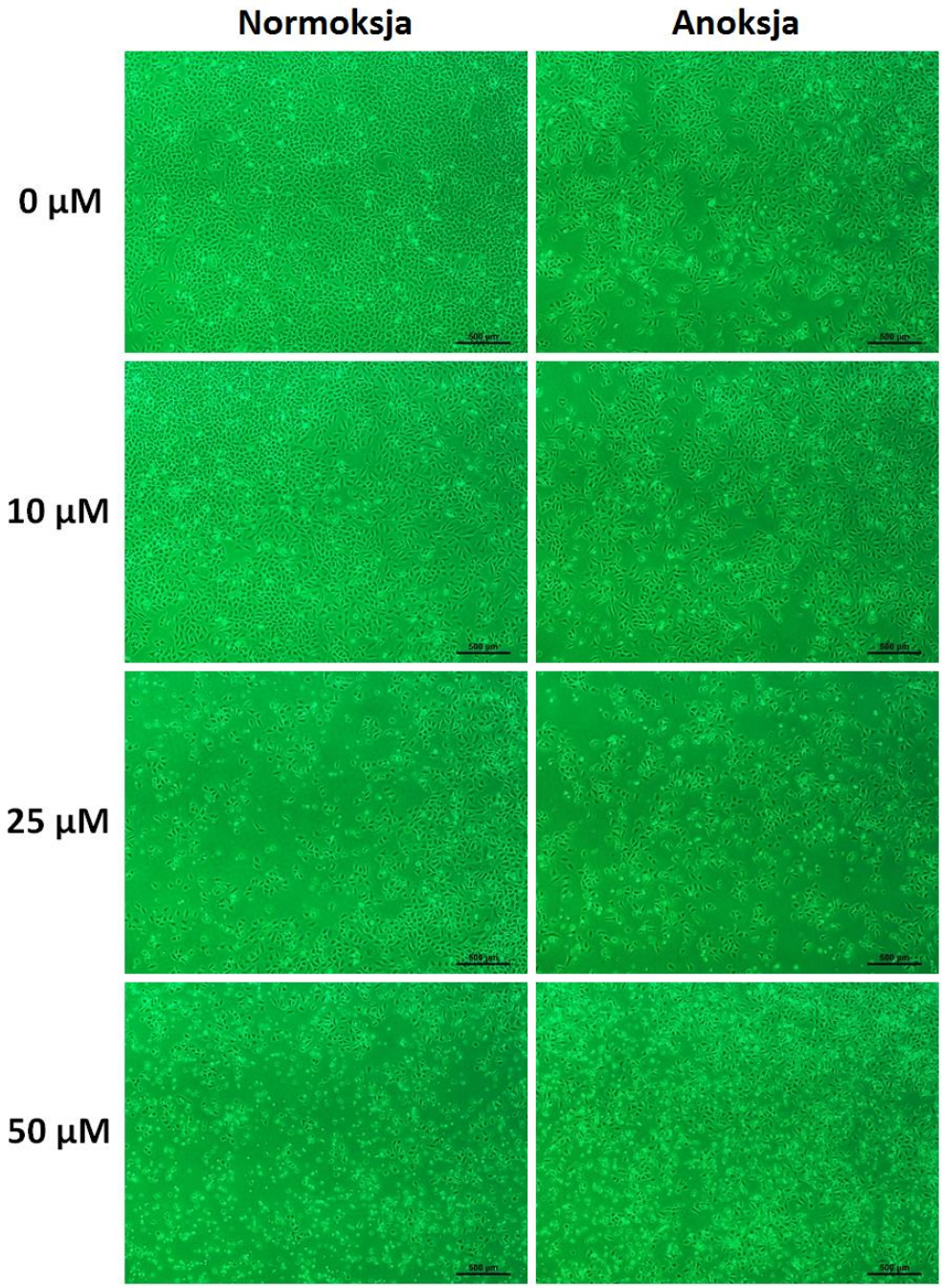
4.1.1. Normoksja vs. anoksja

Analiza zdjęć z mikroskopu odwróconego pozwala stwierdzić, że podanie ZKK-3 w stężeniu 25 μM i 50 μM skutkuje spadkiem proliferacji komórek linii T98G, zarówno w warunkach normoksji, jak i w warunkach całkowitego niedotlenienia (Rycina 5). Z kolei w grupach bez dodatku badanego związku oraz po podaniu 10 μM ZKK-3 liczba komórek jest wyraźnie niższa w warunkach anoksji niż w warunkach standardowych.

Dane uzyskane z licznika *Multisizer 3 Coulter Counter* (Beckman Coulter) pokazują, że zarówno w warunkach normoksji, jak i anoksji, proliferacja komórek linii *glioblastoma* znacząco maleje wraz ze wzrostem stężenia badanego związku (Rycina 6). Niezależnie od stosowanych warunków tlenowych spadek liczby komórek jest istotny statystycznie po zastosowaniu 25 μM i 50 μM ZKK-3 i wynosi odpowiednio 41% i 80% dla normoksji oraz 31% i 75% dla anoksji.

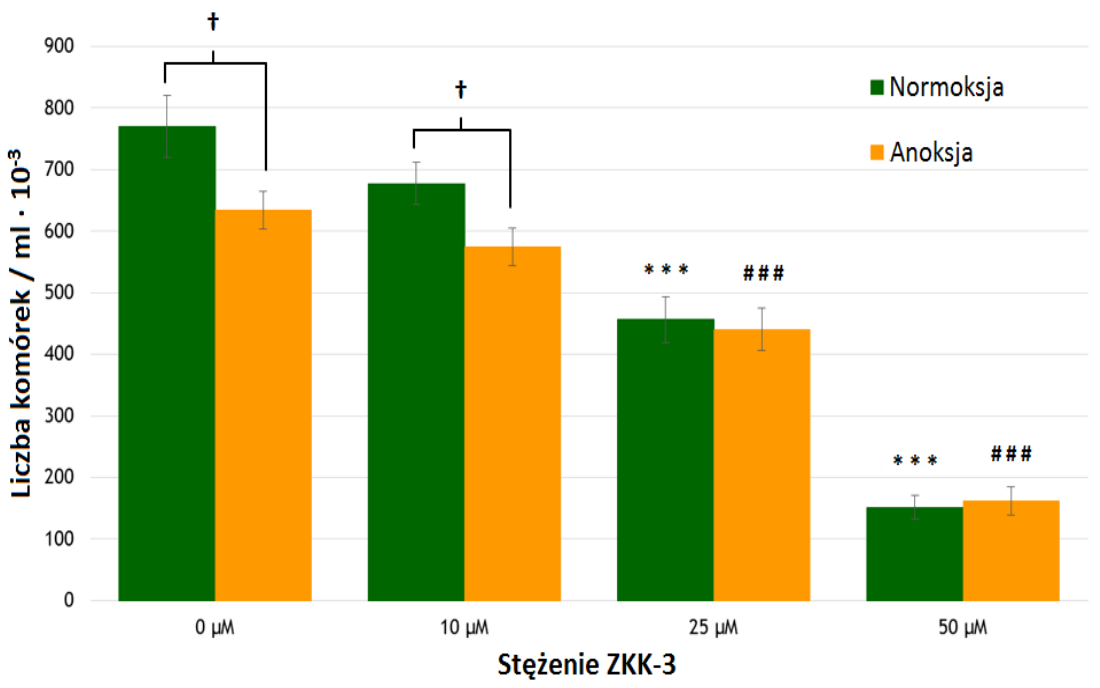
Sama anoksja, bez dodatku ZKK-3, powoduje istotne spowolnienie tempa proliferacji o niemal 20% w porównaniu do warunków standardowych. W anoksji można zaobserwować o 15% mniej komórek niż w normoksji także po podaniu 10 μM badanego związku. Przy wyższych stężeniach ZKK-3 proliferacja komórek jest zbliżona w obu warunkach.

http://rcin.org.pl



Rycina 5. Obraz mikroskopowy linii T98G po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3 w warunkach normoksji i anoksji. Długość odcinka (ang. *bar*) = 500 µm.

http://rcin.org.pl



Rycina 6. Wpływ normoksji i anoksji na proliferację komórek linii T98G po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3. Oznaczenia: *** - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w normoksji; ### - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w anoksji; † - p<0,05 porównanie tych samych stężeń ZKK-3 dla różnych warunków tlenowych.

4.1.2. Normoksja vs. hipoksja

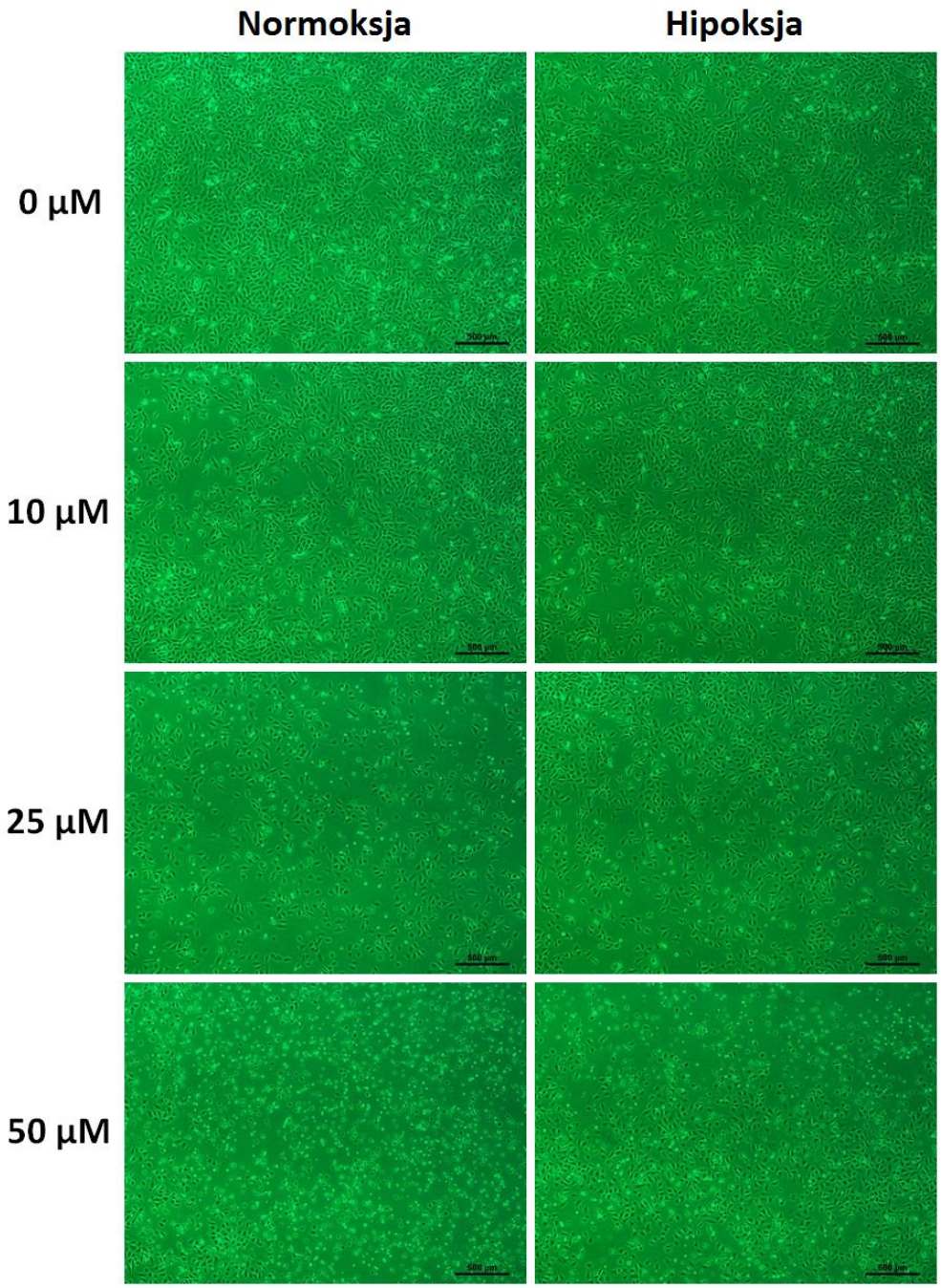
Obraz mikroskopowy pokazuje, że o ile w warunkach normoksji dochodzi do zmniejszenia liczby prawidłowych komórek linii *glioblastoma* T98G wraz ze wzrostem stężenia badanej pochodnej izotiomocznika, to w warunkach hipoksji proliferacja nie ulega znaczącemu zahamowaniu (Rycina 7).

Z kolei wyniki testu proliferacji pokazują, że zastosowanie niskiego (10 µM) stężenia ZKK-3 nie powoduje większych zmian w proliferacji komórek linii T98G, niezależnie od warunków tlenowych (Rycina 8). Istotne statystycznie zmniejszenie liczby komórek następuje dopiero po podaniu ZKK-3 w stężeniu 25 µM i 50 µM i jest wyraźnie większe w normoksji (odpowiednio 32% i 63%) niż w hipoksji (odpowiednio 20% i 48%).

Sama hipoksja nie zmienia tempa proliferacji komórek linii T98G w porównaniu do warunków normoksji. Przy stężeniach 10 µM i 25 µM ZKK-3 również nie obserwuje się różnic istotnych statystycznie, jednakże po zastosowaniu ZKK-3 w stężeniu 25 µM liczba komórek w warunkach hipoksji jest nieznacznie większa niż

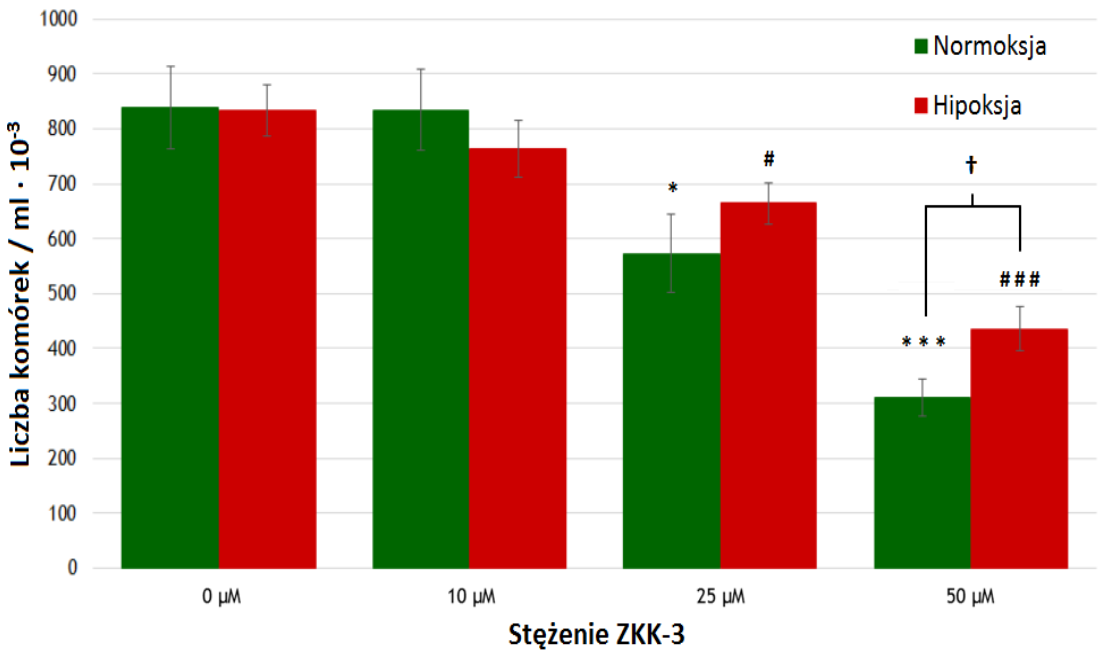
http://rcin.org.pl

w normoksji (o 16%). Istotna statystycznie różnica w proliferacji komórek glejaka występuje natomiast po podaniu ZKK-3 w stężeniu 50 µM i wynosi ponad 40%.



Rycina 7. Obraz mikroskopowy linii T98G po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3 w warunkach normoksji i hipoksji. Długość odcinka (ang. *bar*) = 500 µm.

http://rcin.org.pl



Rycina 8. Wpływ normoksji i hipoksji na proliferację komórek linii T98G po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3. Oznaczenia: * - p<0,05; *** - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w normoksji; # - p<0,05; ### - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w hipoksji; † - p<0,05 porównanie tych samych stężeń ZKK-3 dla różnych warunków tlenowych.

4.1.3. Normoksja vs. hiperbaria tlenowa

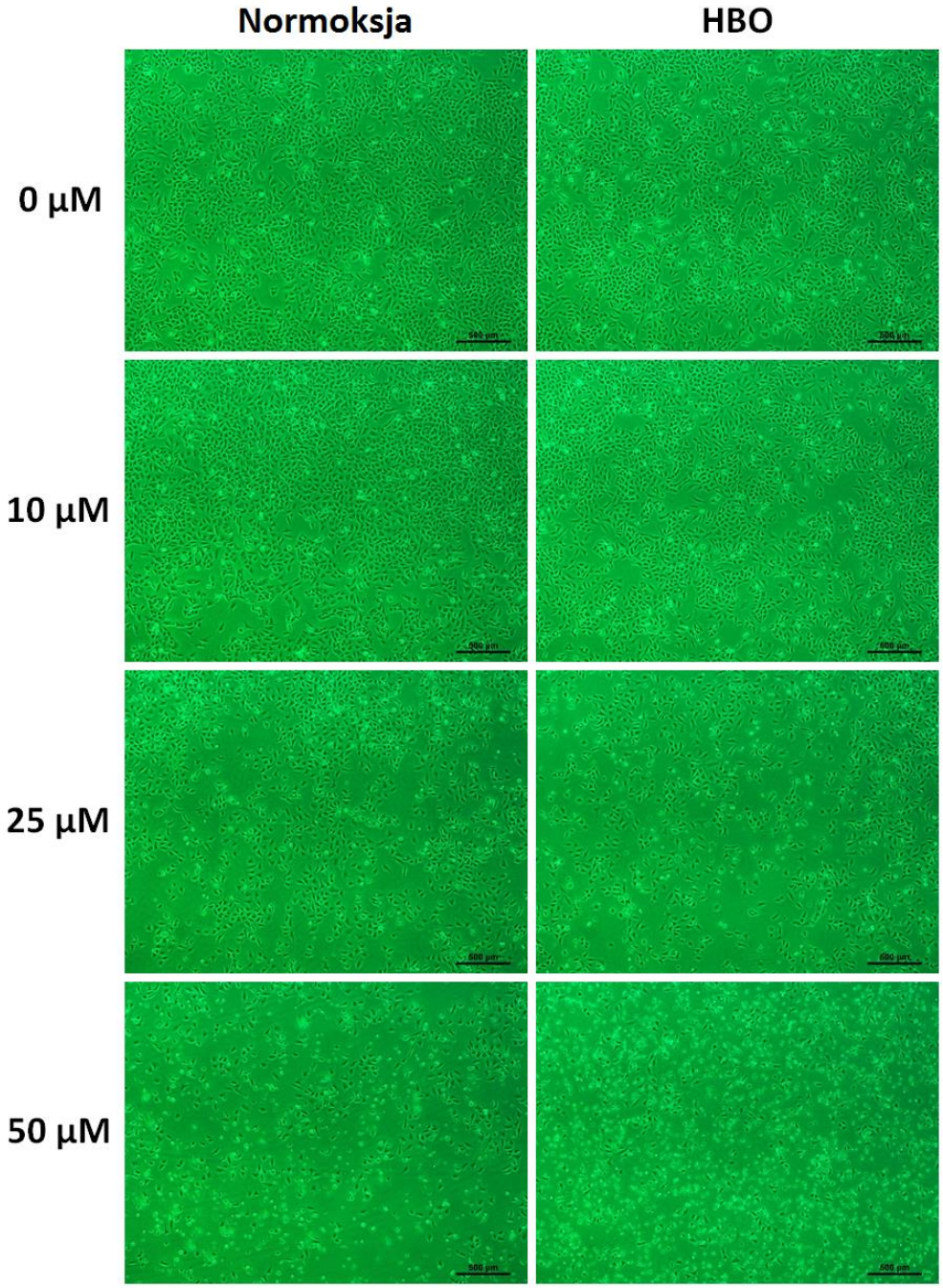
Na zdjęciach z mikroskopu odwróconego widać, że liczba komórek linii złośliwego glejaka niepoddanych działaniu ZKK-3 lub w hodowlach eksponowanych na działanie ZKK-3 w niskim stężeniu (10 µM) w warunkach HBO jest porównywalna z warunkami standardowymi (Rycina 9). Z kolei zastosowanie ZKK-3 w stężeniu 25 µM i 50 µM skutkuje widocznym zmniejszeniem proliferacji komórek. Spadek ten jest szczególnie nasilony po podaniu tlenu hiperbarycznego.

Analiza przy użyciu licznika *Multisizer 3 Coulter Counter* (Beckman Coulter) także pokazuje, że wraz ze wzrostem stężenia ZKK-3 liczba komórek linii T98G znacząco maleje (Rycina 10). Po podaniu badanej pochodnej izotiomocznika w stężeniu 25 µM i 50 µM spadek ten jest istotny statystycznie, zarówno w warunkach normoksji (odpowiednio 34% i 67%), jak i hiperbarii tlenowej (odpowiednio 30% i 80%).

Przy niskich stężeniach ZKK-3 (10 µM i 25 µM) komórki proliferują w porównywalnym tempie niezależnie od warunków tlenowych. Jednak obniżenie tempa proliferacji komórek obserwowane po zastosowaniu badanego związku

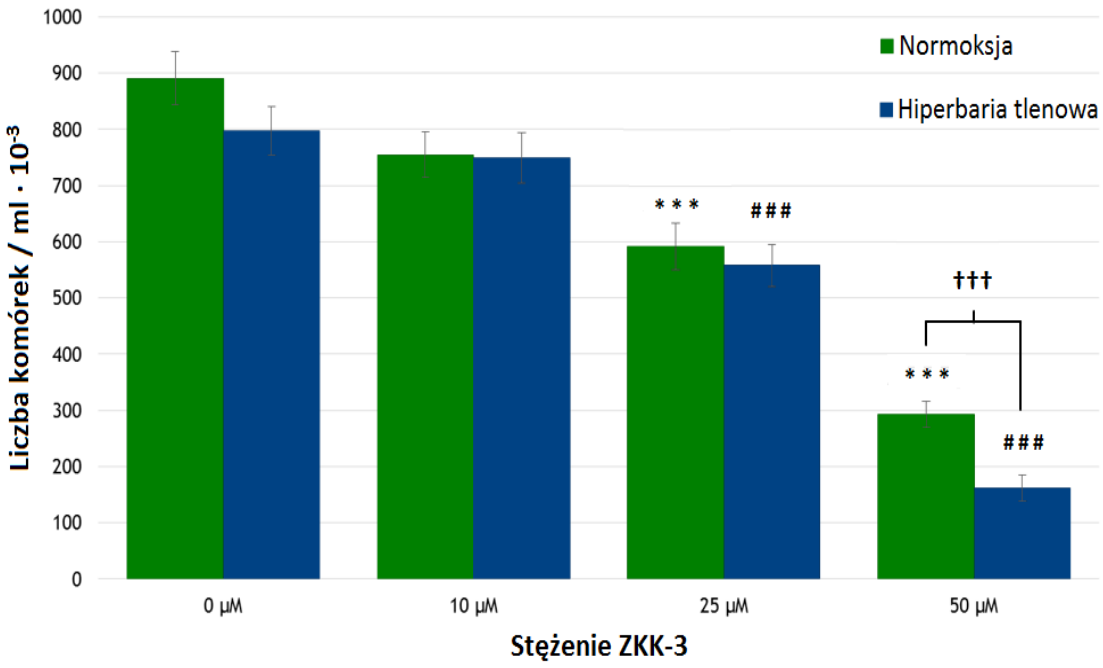
http://rcin.org.pl

w stężeniu 50 µM jest istotnie statystycznie większe dla HBO niż dla normoksji (różnica pomiędzy warunkami wynosi 45%).



Rycina 9. Obraz mikroskopowy linii T98G po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3 w warunkach normoksji i hiperbarii tlenowej. Długość odcinka (ang. *bar*) = 500 µm.

http://rcin.org.pl

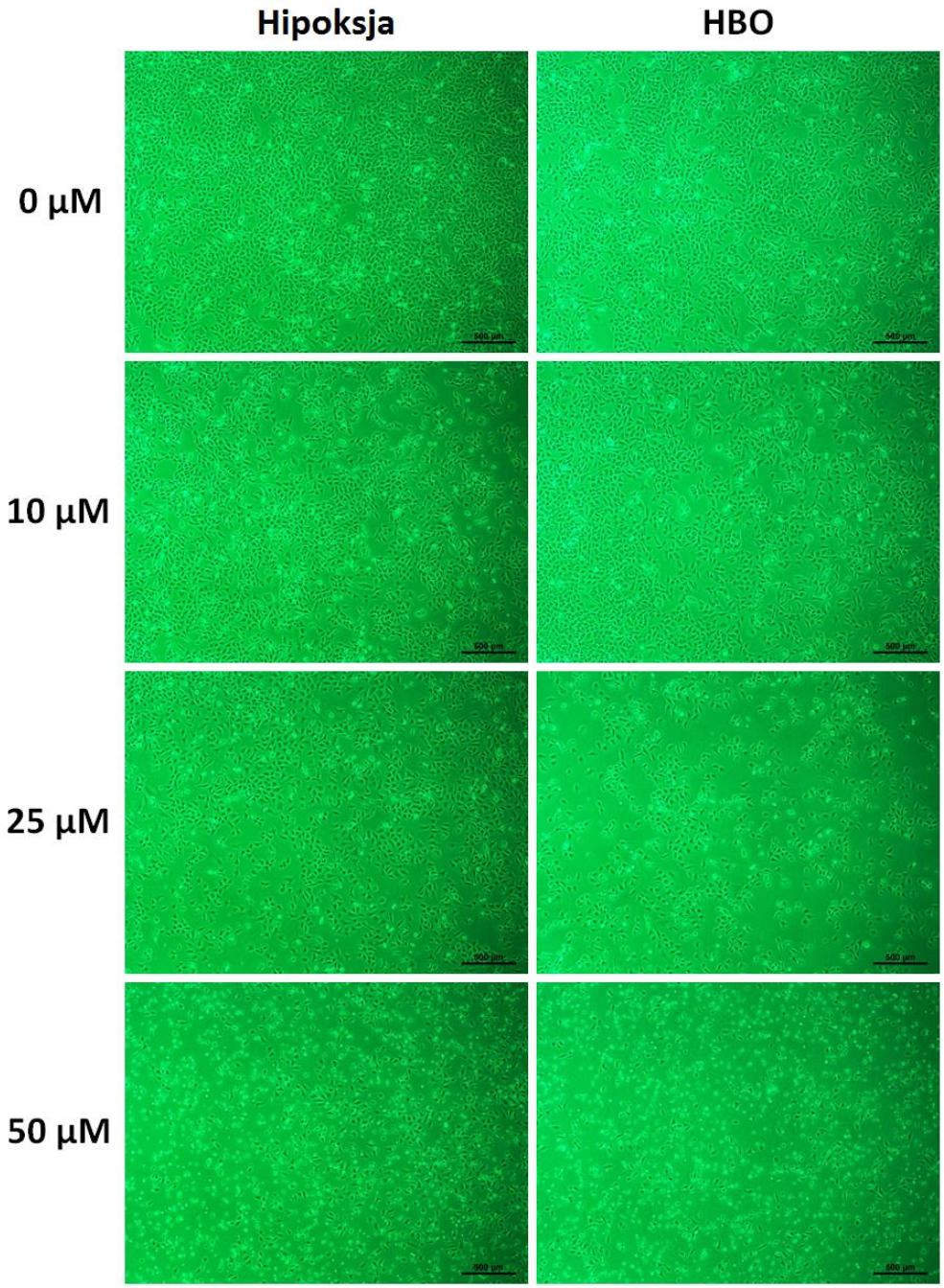


Rycina 10. Wpływ normoksji i natleniania hiperbarycznego na proliferację komórek linii T98G po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3. Oznaczenia: *** - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w normoksji; ### - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w HBO; † † † - p<0,001 porównanie tych samych stężeń ZKK-3 dla różnych warunków tlenowych.

4.1.4. Hipoksja vs. hiperbaria tlenowa

Obserwacje mikroskopowe pokazują, że po natlenianiu hiperbarycznym na szalkach traktowanych ZKK-3 w stężeniu 25 µM i 50 µM liczba komórek linii *glioblastoma*, wykazujących prawidłową morfologię, jest zdecydowanie mniejsza niż w warunkach hipoksji (Rycina 11). W hodowlach kontrolnych oraz po podaniu ZKK-3 w stężeniu 10 µM proliferacja komórek w obu warunkach jest zbliżona.

http://rcin.org.pl

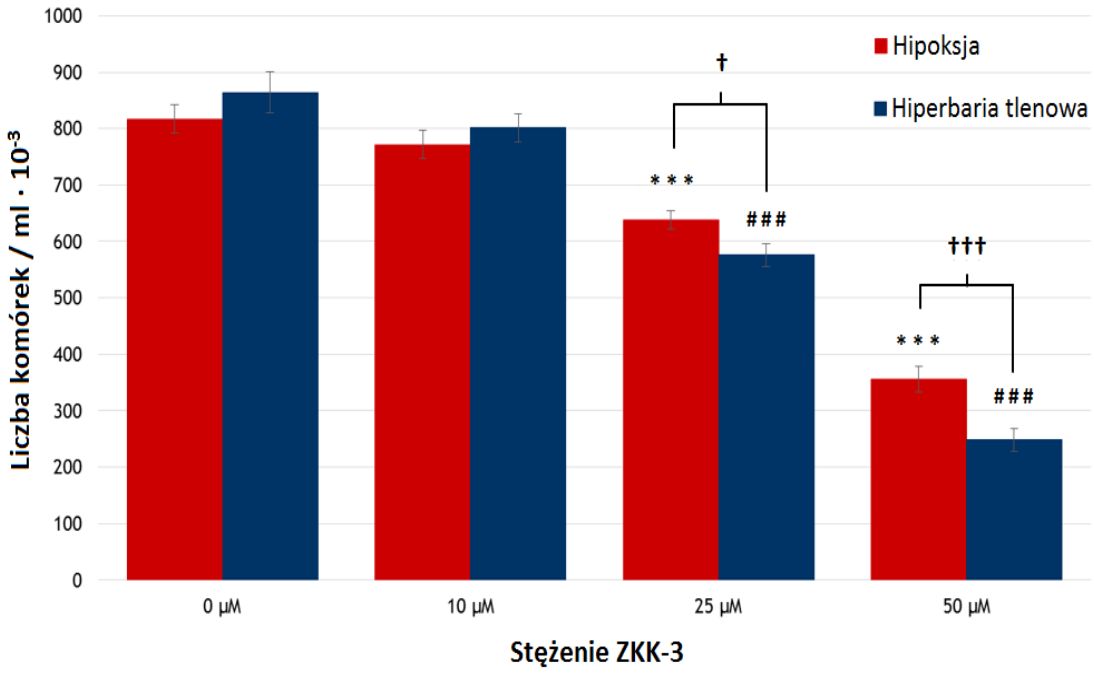


Rycina 11. Obraz mikroskopowy linii T98G po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3 w warunkach hipoksji i hiperbarii tlenowej. Długość odcinka (ang. *bar*) = 500 µm.

Wyniki uzyskane z pomiaru liczby komórek wykazują również, że zarówno w warunkach obniżonego dostępu tlenu, jak i w hiperbarii tlenowej dochodzi do istotnego statystycznie spadku proliferacji komórek linii T98G po podaniu ZKK-3 w stężeniach 25 µM i 50 µM (Rycina 12). W hipoksji redukcja liczby komórek wynosi 22% dla 25 µM oraz 57% dla 50 µM ZKK-3, natomiast po natlenianiu hiperbarycznym tempo proliferacji maleje o odpowiednio 33% i 71%.

http://rcin.org.pl

W przypadku obu w/w stężeń, obserwowany spadek liczby komórek glejaka jest istotnie statystycznie większy po podaniu HBO niż po zastosowaniu hipoksji i wynosi 10% i 30% dla odpowiednich stężeń 25 µM i 50 µM ZKK-3. Nie odnotowuje się znaczących różnic w proliferacji komórek eksponowanych jedynie na działanie różnych warunków tlenowych lub traktowanych jednocześnie ZKK-3 w stężeniu 10 µM.



Rycina 12. Wpływ hipoksji i natleniania hiperbarycznego na proliferację komórek linii T98G po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3. Oznaczenia: *** - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w hipoksji; ### - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w HBO; † - p<0,05; † † † - p<0,001 porównanie tych samych stężeń ZKK-3 dla różnych warunków tlenowych.

http://rcin.org.pl

4.2. Badanie żywotności komórek linii T98G po podaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych.

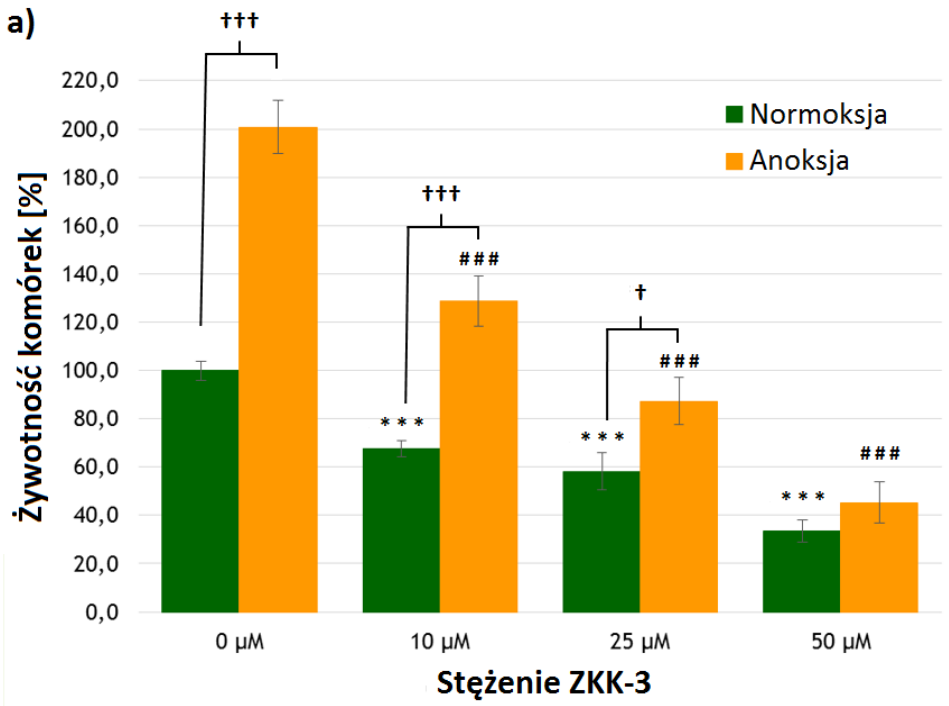
4.2.1. Normoksja vs. anoksja

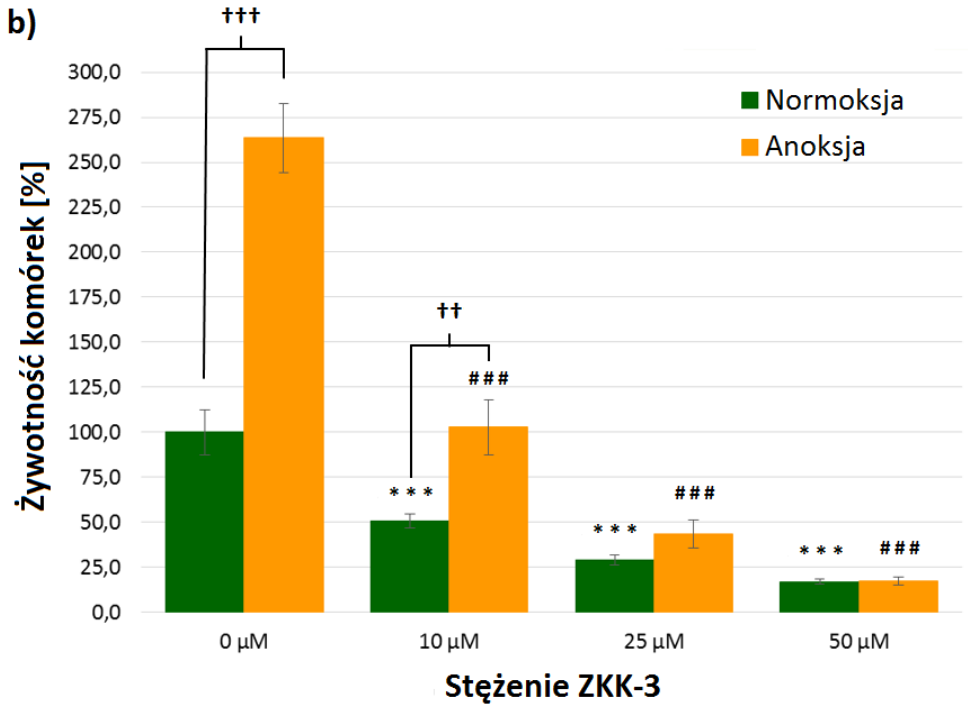
Niezależnie od stosowanych warunków tlenowych oraz czasu inkubacji, żywotność komórek linii T98G istotnie maleje po podaniu badanego związku, przy czym im większa dawka ZKK-3 tym obserwowany spadek jest większy (Rycina 13).

Po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3 (Rycina 13a) w warunkach normoksji liczba żywych komórek wynosi 68%, 58% i 33% odpowiednio dla 10 μM, 25 μM i 50 μM, zaś w anoksji odpowiednio 64%, 43% oraz 23% (w odniesieniu do grupy kontrolnej w danych warunkach). Żywotność komórek glejaka wystawionych na działanie samej anoksji jest dwukrotnie wyższa niż dla warunków standardowych. Po podaniu pochodnej izotiomocznika liczba żywych komórek również jest wyższa w anoksji niż w normoksji, a różnice wynoszą odpowiednio 90% dla stężenia 10 μM i 50% dla 25 μM.

Po 48 godzinach hodowli żywotność komórek linii T98G, traktowanych ZKK-3 w stężeniach 10 μM, 25 μM i 50 μM, wynosi odpowiednio 51%, 29% i 17% dla normoksji oraz 39%, 17% i 7% dla anoksji (w odniesieniu do grupy kontrolnej w danych warunkach) (Rycina 13b). Jednakże liczba żywych komórek w warunkach anoksji jest istotnie statystycznie większa niż w warunkach normoksji, zarówno w grupie kontrolnej (o 164%), jak i po podaniu 10 μM ZKK-3 (o ponad 100%). Przy wyższych stężeniach badanego związku brak jest różnic istotnych statystycznie.

http://rcin.org.pl





Rycina 13. Wpływ normoksji i anoksji na żywotność komórek linii T98G po 24 (a) i 48 (b) godzinach inkubacji z ZKK-3. Oznaczenia: *** - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w normoksji; ### - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w anoksji; † - p<0,05; † † - p<0,01; † † † - p<0,001 porównanie tych samych stężeń ZKK-3 dla różnych warunków tlenowych.

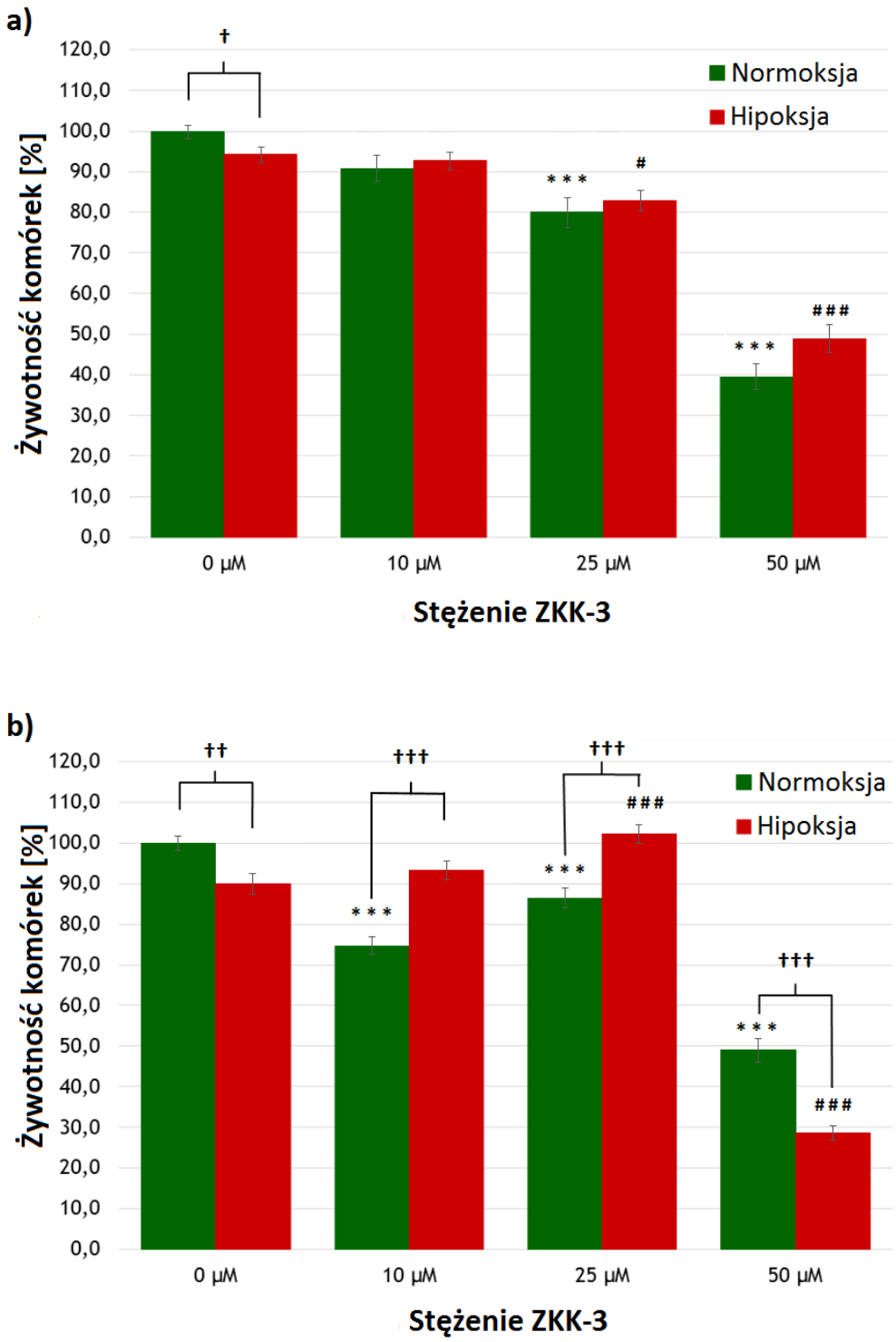
http://rcin.org.pl

4.2.2. Normoksja vs. hipoksja

Po 24 godzinach inkubacji żywotność komórek linii złośliwego glejaka *in vitro* maleje wraz ze wzrostem stężenia ZKK-3 (Rycina 14a). Spadek liczby żywych komórek jest istotny statystycznie dla stężenia 25 μM i 50 μM badanego związku, zarówno w warunkach normoksji (o odpowiednio 20% i 60%), jak i hipoksji (o odpowiednio 12% i 48%). Sama hipoksja obniża żywotność komórek o niecałe 6%. Po podaniu ZKK-3 różnica ta ulega zatarciu, z tendencją do odwrócenia proporcji i niewielkiego wzrostu żywotności w warunkach hipoksji.

48-godzinna inkubacja z wybraną pochodną izotiomocznika w warunkach standardowych skutkuje istotnym statystycznie spadkiem żywotności komórek linii T98G, wynoszącym 25%, 13% i 51% dla odpowiednio 10 μM, 25 μM i 50 μM ZKK-3 (Rycina 14b). Z kolei w warunkach hipoksji korzystny efekt cytotoksyczny ZKK-3 obserwowany jest dopiero przy zastosowaniu stężenia 50 μM, gdzie żywotność wynosi 32%. W grupach kontrolnych liczba żywych komórek jest istotnie statystycznie niższa w warunkach niedotlenienia niż w standardowych warunkach hodowlanych (o 10%). Podobna zależność występuje po podaniu 50 μM ZKK-3, a odnotowany spadek wynosi 41%. Natomiast po zastosowaniu ZKK-3 w stężeniu 10 μM i 25 μM żywotność komórek w warunkach hipoksji jest wyższa niż w normoksji o odpowiednio 25% i 18%.

http://rcin.org.pl



Rycina 14. Wpływ normoksji i hipoksji na żywotność komórek linii T98G po 24 (a) i 48 (b) godzinach inkubacji z ZKK-3. Oznaczenia: *** - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w normoksji; # - p<0,05; ### - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w hipoksji; † - p<0,05; † † - p<0,01; † † † - p<0,001 porównanie tych samych stężeń ZKK-3 dla różnych warunków tlenowych.

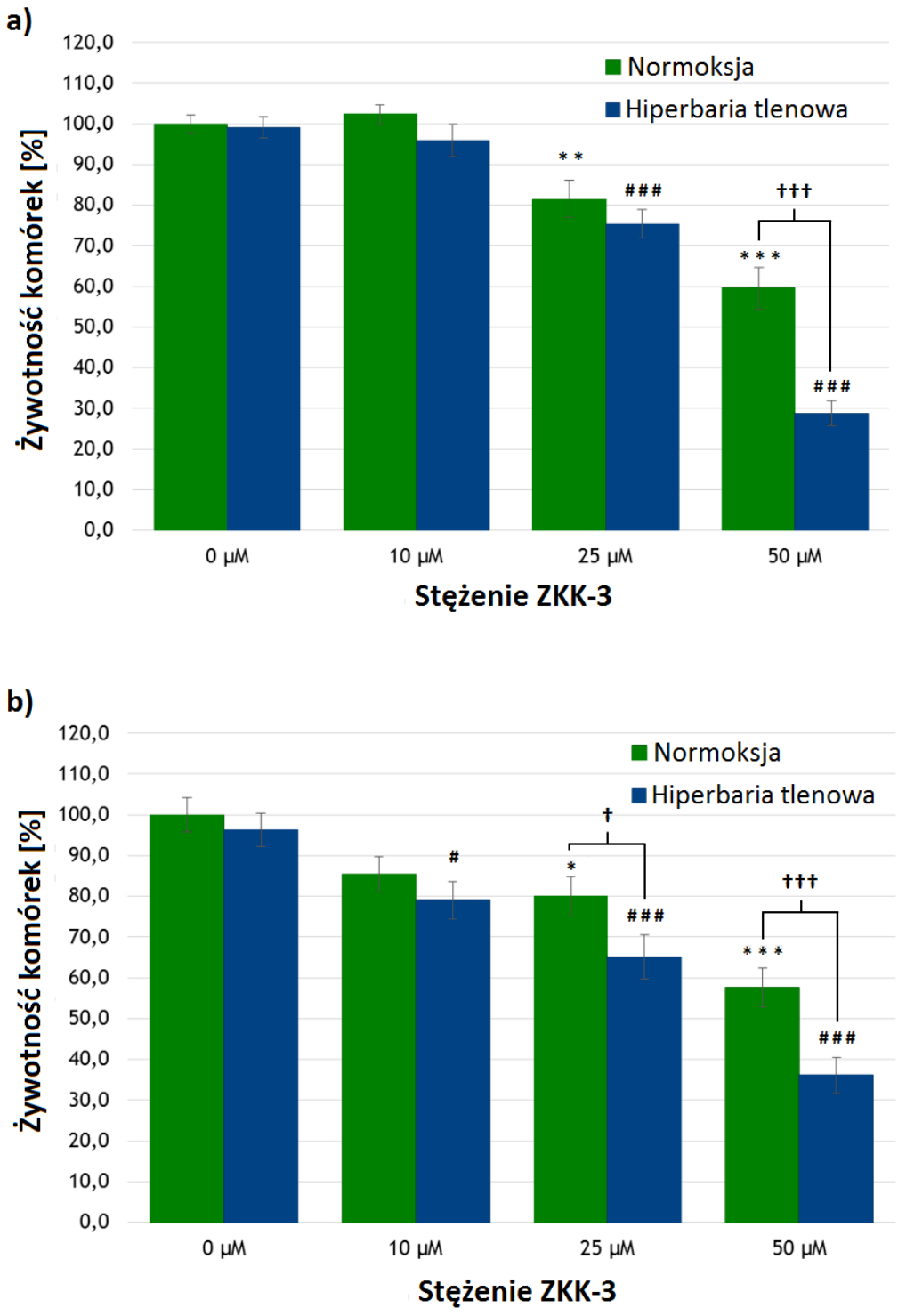
http://rcin.org.pl

4.2.3. Normoksja vs. hiperbaria tlenowa

Jednodniowa inkubacja komórek linii T98G z badaną pochodną izotiomocznika w stężeniach 25 μM i 50 μM w warunkach standardowych skutkuje istotnym statystycznie spadkiem liczby żywych komórek do odpowiednio 81% i 60% (Rycina 15a). Żywotność komórek glejaka, poddanych działaniu HBO również istotnie maleje po podaniu w/w stężeń ZKK-3 i wynosi odpowiednio 76% i 29%. Tlen hiperbaryczny, aplikowany osobno lub w połączeniu z niskimi stężeniami ZKK-3, nie powoduje istotnych statystycznie zmian w żywotności komórek w porównaniu do warunków normoksji. Po 24 godzinach hodowli istotna różnica obserwowana jest jedynie przy stężeniu 50 μM ZKK-3 i wynosi 52%.

Po 48 godzinach hodowli w warunkach normoksji liczba żywych komórek istotnie maleje pod wpływem eskpozycji na działanie ZKK-3 w stężeniach 25 μM i 50 μM (odpowiednio o 20% i 42%) (Rycina 15b). Z kolei w warunkach natleniania hiperbarycznego istotne statystycznie zmniejszenie żywotności komórek linii T98G występuje także przy niższych stężeniach badanego związku i wynosi 18%, 32% i 63% dla odpowiednio 10 μM, 25 μM i 50 μM ZKK-3. Po zastosowaniu ZKK-3 w stężeniu 25 μM i 50 μM żywotność komórek jest niższa w warunkach HBO niż w normoksji odpowiednio o 19% i 37%.

http://rcin.org.pl



Rycina 15. Wpływ normoksji i natleniania hiperbarycznego na żywotność komórek linii T98G po 24 (a) i 48 (b) godzinach inkubacji z ZKK-3. Oznaczenia: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w normoksji; # - p<0,05; ### - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w HBO; † - p<0,05; † † † - p<0,001 porównanie tych samych stężeń ZKK-3 dla różnych warunków tlenowych.

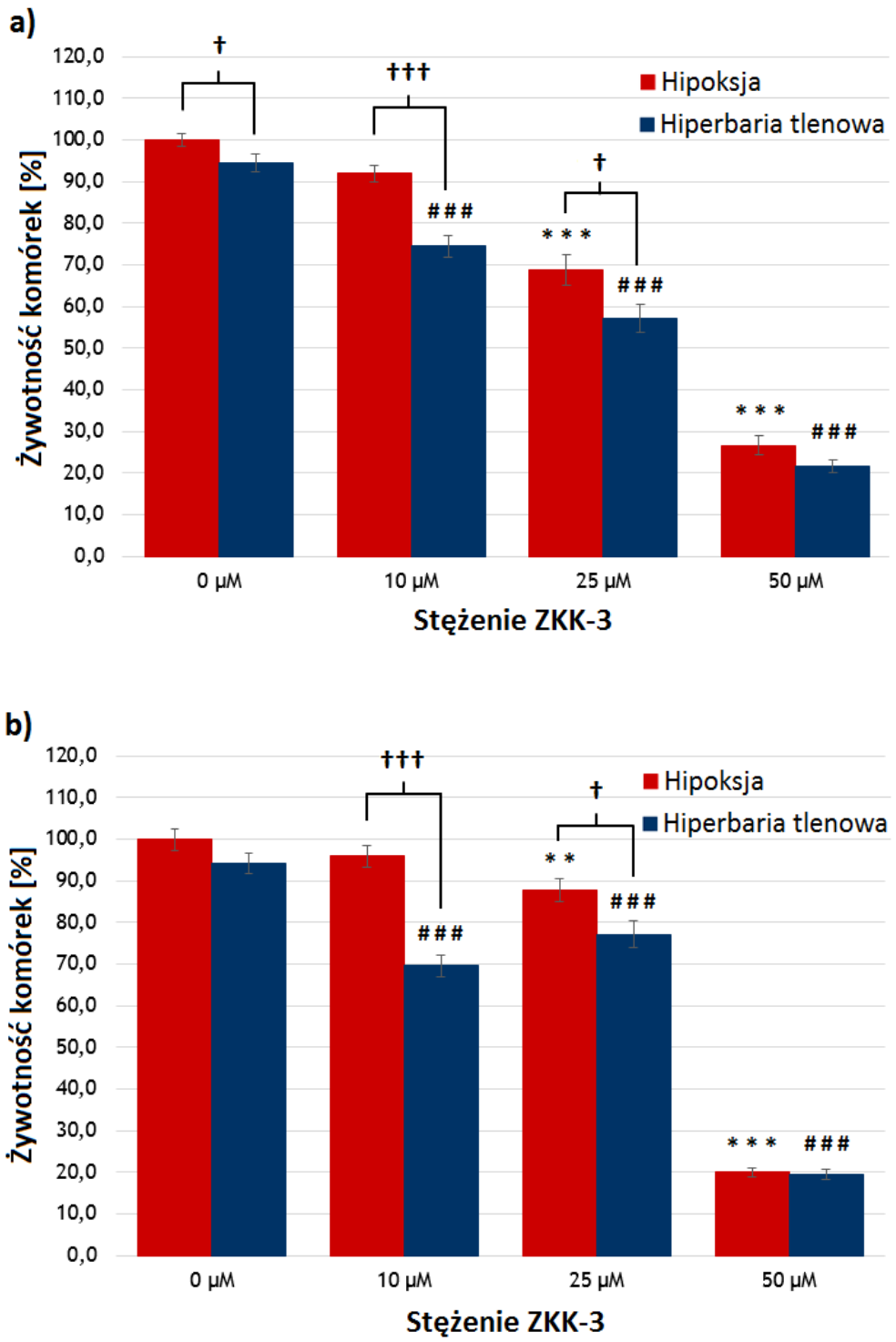
http://rcin.org.pl

4.2.4. Hipoksja vs. hiperbaria tlenowa

W warunkach hipoksji żywotność komórek złośliwego glejaka *in vitro* znacząco maleje po 24 godzinach inkubacji przy zastosowaniu badanego związku w stężeniach 25 μM i 50 μM odpowiednio o 31% i 73% (Rycina 16a). Po podaniu tlenu hiperbarycznego istotny statystycznie spadek liczby żywych komórek obserwowany jest zarówno przy 10 μM, jak i 25 μM oraz 50 μM ZKK-3 i wynosi odpowiednio 21%, 40% oraz 77% . Żywotność komórek w warunkach HBO jest zdecydowanie niższa niż w przypadku hipoksji. Dla grup kontrolnych różnica wynosi 6%, dla 10 μM 19% a dla 25 μM 17%. Przy wysokim stężeniu 50 μM, ZKK-3 wykazuje jednakową toksyczność wobec komórek nowotworowych, niezależnie od warunków tlenowych.

Po 48 godzinach hodowli w warunkach hipoksji liczba żywych komórek linii T98G jest istotnie statystycznie niższa po podaniu ZKK-3 w stężeniu 25 μM i 50 μM i wynosi odpowiednio 88% i 20% (Rycina 16b). Zastosowanie badanego związku w połączeniu z HBO skutkuje istotnym obniżeniem żywotności komórek do 74%, 82% i 21% dla stężeń 10 μM, 25 μM i 50 μM ZKK-3. Redukcja liczby żywych komórek pod wpływem natleniania hiperbarycznego jest istotnie statystycznie większa w porównaniu z warunkami niedotlenienia po podaniu ZKK-3 w stężeniu 10 μM i 25 μM (o odpowiednio 28% i 12%). Przy stężeniu pochodnej izotiomocznika 50 μM brak jest różnic istotnych statystycznie.

http://rcin.org.pl



Rycina 16. Wpływ hipoksji i natleniania hiperbarycznego na żywotność komórek linii T98G po 24 (a) i 48 (b) godzinach inkubacji z ZKK-3. Oznaczenia: ** - p<0,01; *** - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w hipoksji; ### - p<0,001 w odniesieniu do kontroli w HBO; † - p<0,05; † † † - p<0,001 porównanie tych samych stężeń ZKK-3 dla różnych warunków tlenowych.

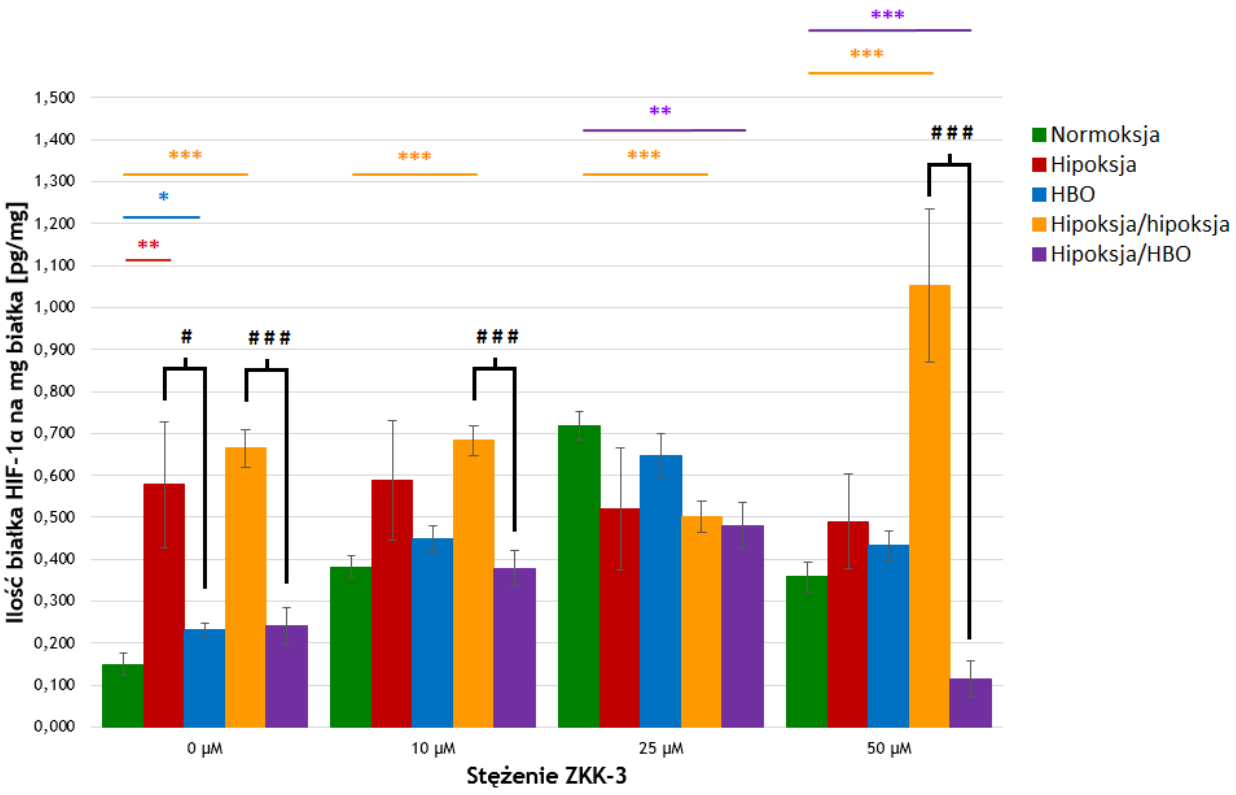
http://rcin.org.pl

4.3. Oznaczanie ekspresji białka HIF-1α po podaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych

W warunkach hipoksji bez podania ZKK-3 dochodzi do niemal czterokrotnego zwiększenia poziomu badanego białka w porównaniu do warunków normoksji (Rycina 17). Z kolei sama hiperbaria tlenowa powoduje wzrost ekspresji HIF-1α o 56% w porównaniu do warunków standardowych. Po podaniu testowanej pochodnej izotiomocznika, niezależnie od stężenia, nie obserwuje się różnic istotnych statystycznie zarówno w hipoksji, jak i w warunkach HBO. Istotny statystycznie wzrost poziomu białka HIF-1α występuje również w komórkach rosnących w warunkach podwójnej hipoksji – zarówno samej (4,5-krotny wzrost), jak i połączonej z podaniem ZKK-3 w stężeniach 10 μM (wzrost o 78%) i 50 μM (3-krotny wzrost). Po podaniu ZKK-3 w stężeniu 25 μM ekspresja białka maleje o 30% w porównaniu do warunków standardowych. W warunkach hipoksja/HBO poziom HIF-1α jest istotnie statystycznie niższy niż w normoksji, przy podaniu ZKK-3 w stężeniu 25 μM i 50 μM i wynosi odpowiednio 67% i 32%.

Bezpośrednie porównanie warunków hipoksji i hiperbarii tlenowej pokazuje, że w grupach kontrolnych ekspresja białka HIF-1α jest o 60% niższa po ekspozycji na działanie HBO niż w warunkach o niskiej zawartości tlenu. Poziom badanego białka jest mniejszy w warunkach HBO również po zastosowaniu ZKK-3 w stężeniu 10 μM i 50 μM, jednak nie są to różnice istotne statystycznie. Także w grupach preinkubowanych w warunkach hipoksji, natlenianie hiperbaryczne powoduje istotne statystycznie obniżenie poziomu badanego białka o 64%. Z kolei po podaniu ZKK-3 w stężeniach 10 μM i 50 μM ekspresja HIF-1α jest niższa o odpowiednio 45% i 89% w warunkach hipoksji/HBO w porównaniu do warunków podwójnej hipoksji.

http://rcin.org.pl



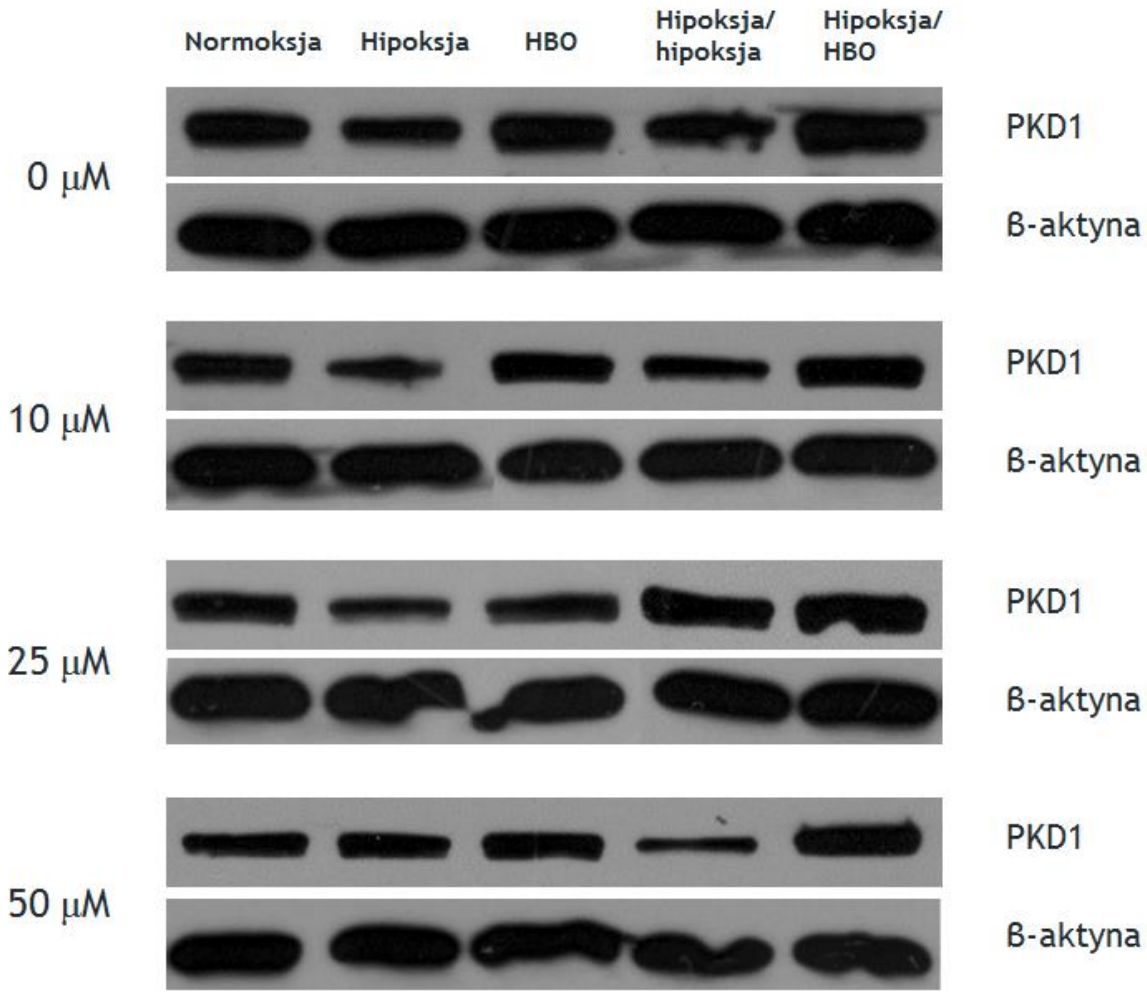
Rycina 17. Wpływ różnych warunków tlenowych na poziom ekspresji białka HIF-1α w komórkach linii T98G. Test ELISA. Oznaczenia: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 w odniesieniu do danego stężenia ZKK-3 w normoksji; # - p<0,05; ### - p<0,001 porównanie hipoksji vs. HBO oraz podwójnej hipoksji vs. hipoksja/HBO.

4.4. Oznaczanie ekspresji kinazy białkowej PKD1 i poziomu jej form ufosforylowanych po podaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych

4.4.1. Oznaczanie ekspresji kinazy białkowej PKD1

W oparciu o wyniki analizy Western Blot można stwierdzić, że w warunkach krótko-, jak i długotrwałego niedotlenienia, poziom PKD1 jest zbliżony lub lekko obniżony w stosunku do normoksji, zarówno w grupach kontrolnych, jak i traktowanych ZKK-3. (Rycina 18). Z drugiej strony natlenianie hiperbaryczne (HBO lub hipoksja/HBO) skutkuje nasileniem ekspresji badanej kinazy. Traktowanie komórek linii T98G pochodną izotiomocznika ZKK-3 obniża poziom PKD1 w porównaniu z grupami kontrolnymi bez podania badanego związku.

http://rcin.org.pl

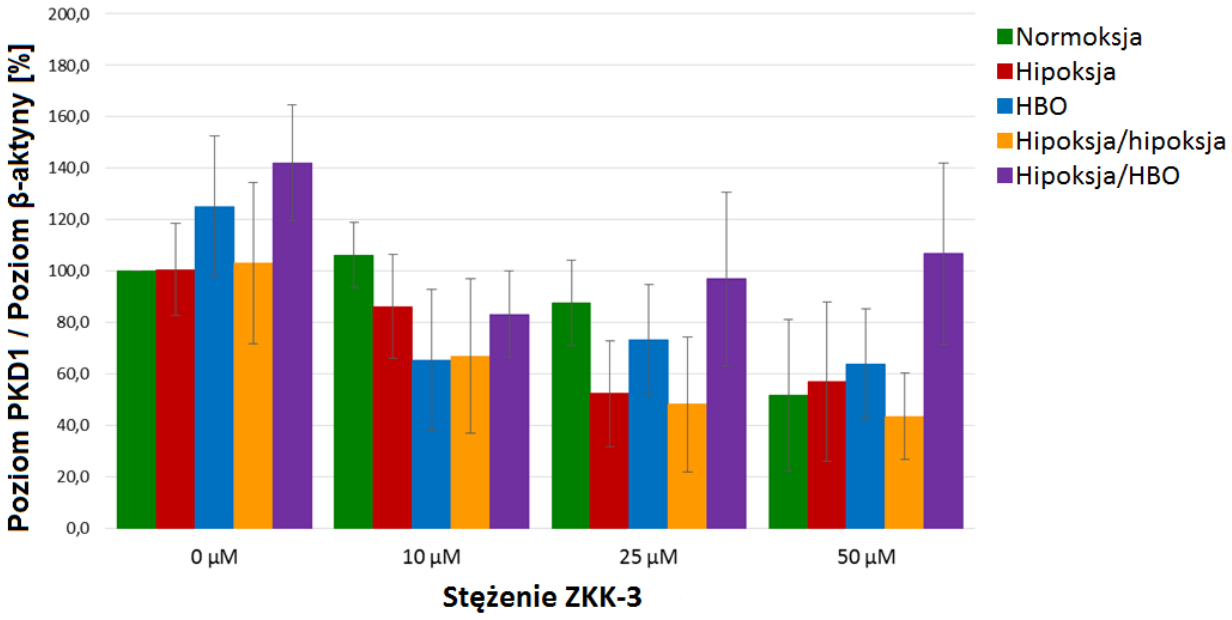


Rycina 18. Ekspresja kinazy PKD1 w komórkach linii T98G traktowanych pochodną izotiomocznika ZKK-3 oraz hodowanych w różnych warunkach tlenowych. Analiza Western Blot.

Analiza ilościowa wyników uzyskanych techniką Western Blot pokazuje, że ekspresja PKD1 w komórkach poddanych działaniu hipoksji oraz podwójnej hipoksji bez podania ZKK-3 jest identyczna jak w warunkach standardowych (Rycina 19). Z kolei po ekspozycji na działanie tlenu hiperbarycznego następuje niewielki wzrost poziomu tej kinazy, zarówno w grupie HBO (o 25%), jak i w grupie hipoksja/HBO (o 42%), jednak w obu przypadkach zmiany nie są istotne statystycznie. Po inkubacji z ZKK-3 poziom kinazy białkowej D1 w różnych warunkach tlenowych ulega nieznacznemu obniżeniu w stosunku do warunków kontrolnych. Bezpośrednie porównanie ze sobą poziomu PKD1 w grupach preinkubowanych w analogicznych warunkach tlenowych, a następnie poddanych działaniu hipoksji lub HBO, również nie wykazuje różnic znaczących pod względem statystycznym.

http://rcin.org.pl

Po podaniu pochodnej izotiomocznika obserwuje się tendencję do osłabienia ekspresji badanej kinazy niezależnie od ciśnienia cząstkowego tlenu, jednak zmiany te nie są istotne statystycznie.

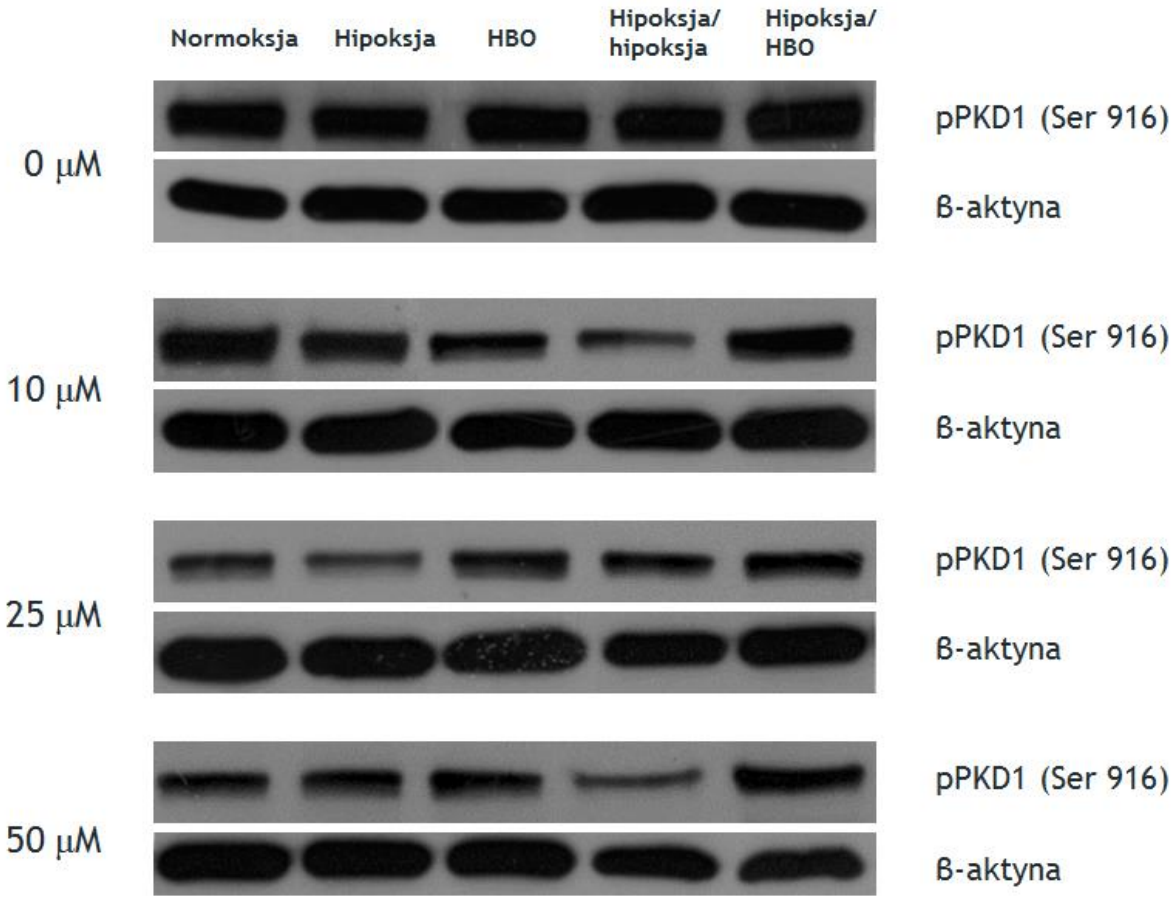


Rycina 19. Wpływ pochodnej izotiomocznika ZKK-3 oraz różnych warunków tlenowych na poziom ekspresji kinazy PKD1 w komórkach linii T98G. Analiza Western Blot.

4.4.2. Oznaczanie poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 916)

Analiza Western Blot sugeruje znaczące obniżenie poziomu ufosforylowanej formy kinazy białkowej D1 - pPKD1 (Ser 916) pod wpływem wzrastającego stężenia ZKK-3, niezależnie od warunków tlenowych (Rycina 20). W grupach, które nie były inkubowane z ZKK-3, poziom kinazy wydaje się być niezmieniony w stosunku do normoksji. Z kolei po podaniu ZKK-3 następuje spadek poziomu pPKD1 (Ser 916) w warunkach podwójnej hipoksji i niewielki wzrost w grupie hipoksji/HBO.

http://rcin.org.pl



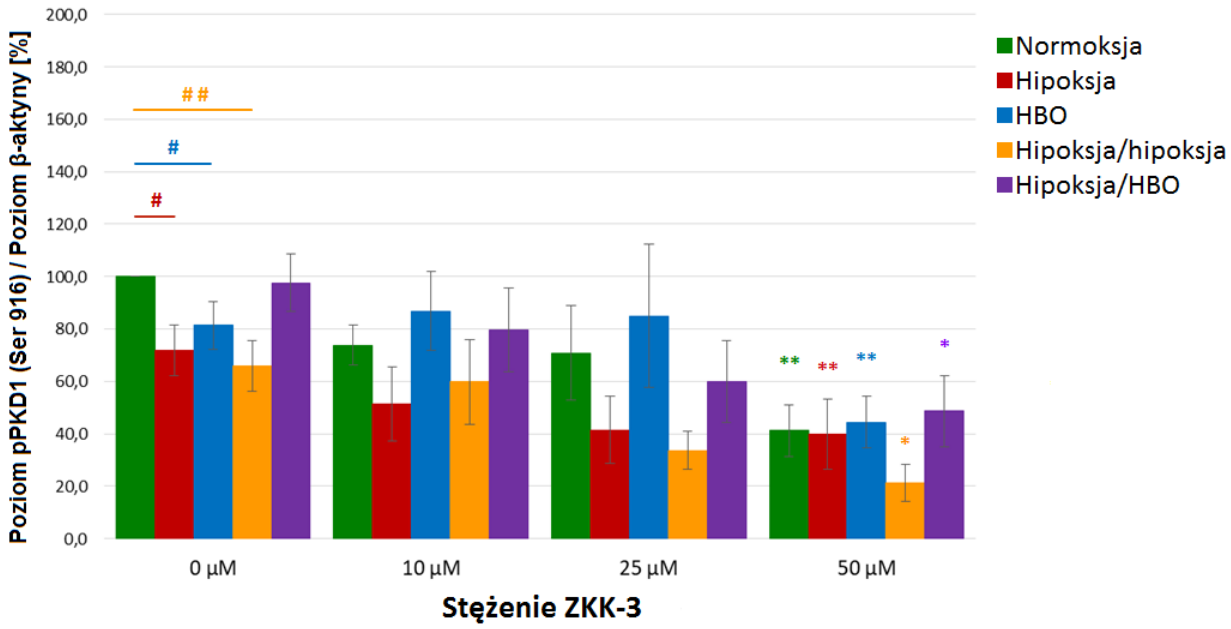
Rycina 20. Poziom kinazy pPKD1 (Ser 916) w komórkach linii T98G traktowanych pochodną izotiomocznika ZKK-3 oraz hodowanych w różnych warunkach tlenowych. Analiza Western Blot.

Dane ilościowe uzyskane z analizy Western Blot pokazują, że w grupach, którym nie podano ZKK-3, poziom formy pPKD1 (Ser 916) ulega znaczącemu obniżeniu w niemal wszystkich warunkach tlenowych w stosunku do warunków standardowych (Rycina 21). Jedynie w grupie hipoksja/HBO poziom pPKD1 pozostaje niezmieniony. Różnice te obserwuje się także po zastosowaniu badanej pochodnej izotiomocznika, jednak nie są one istotne statystycznie. Choć mogłoby się wydawać, że pod wpływem natleniania hiperbarycznego poziom pPKD1 (Ser 916) jest podwyższony w porównaniu do warunków hipoksji, to jednak analiza statystyczna poziomu pPKD1 w grupach preinkubowanych w analogicznych warunkach tlenowych tego nie potwierdza.

Wraz ze wzrostem stężenia podawanej pochodnej izotiomocznika obserwuje się tendencję do obniżenia poziomu ufosforylowanej formy PKD1 niezależnie od warunków tlenowych. Po zastosowaniu ZKK-3 w stężeniu 50 μM zmniejszenie

http://rcin.org.pl

poziomu badanej kinazy jest istotne statystycznie i wynosi 59% dla normoksji, 44% dla hipoksji, 45% dla HBO, 68% dla podwójnej hipoksji oraz 50% dla hipoksji/HBO.

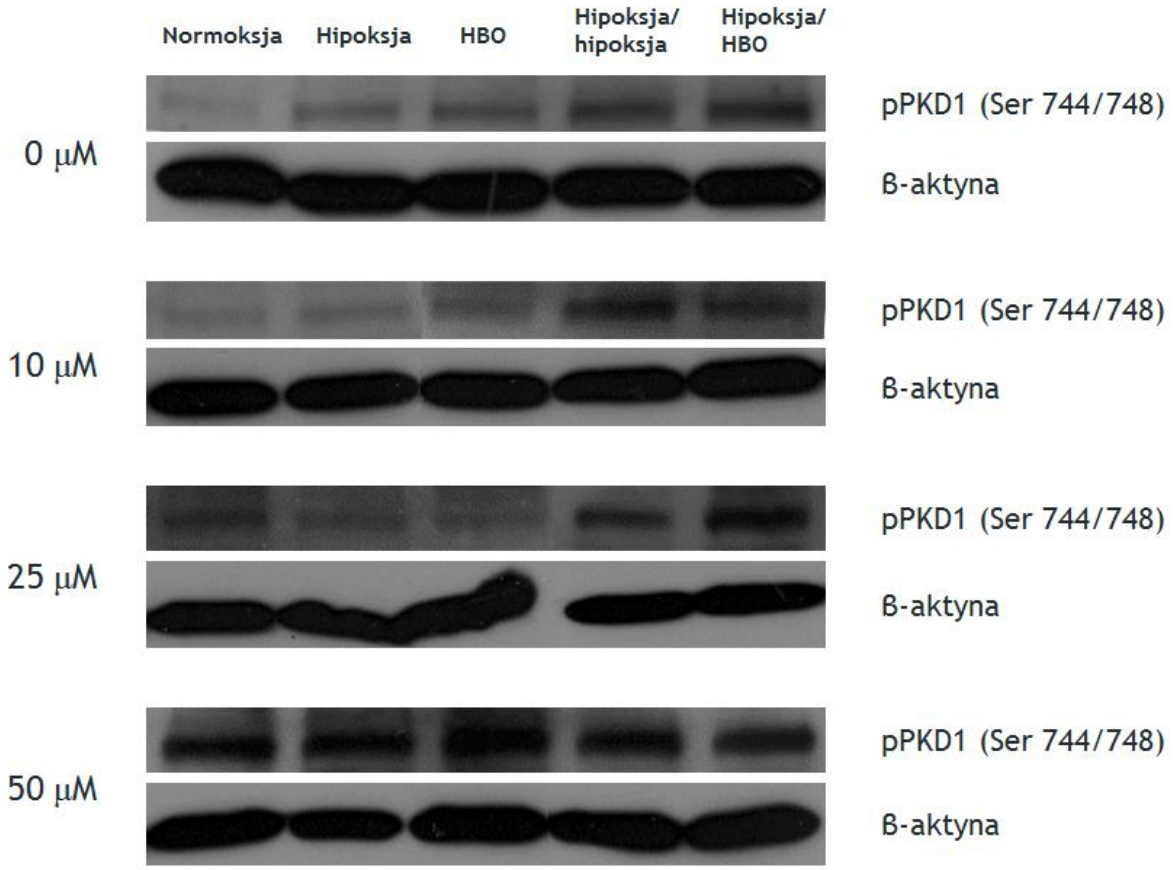


Rycina 21. Wpływ pochodnej izotiomocznika ZKK-3 oraz różnych warunków tlenowych na poziom kinazy pPKD1 (Ser 916) w komórkach linii T98G. Analiza Western Blot. Oznaczenia: * - p<0,05; ** - p<0,01 w odniesieniu do kontroli w danych warunkach tlenowych; # - p<0,05; ## - p<0,01 w odniesieniu do danego stężenia ZKK-3 w normoksji.

4.4.3. Oznaczanie poziomu kinazy białkowej pPKD1 (Ser 744/748)

Analiza Western Blot pokazuje, że hodowanie komórek linii T98G w warunkach niskiego lub wysokiego stężenia tlenu skutkuje podwyższeniem poziomu formy ufosforylowanej kinazy PKD1 (Ser 744/748) w stosunku do warunków normoksji (Rycina 22). Wzrost ten obserwuje się zarówno w grupach poddanych działaniu ZKK-3, jak i w grupach inkubowanych bez badanego związku. Przy niskich stężeniach ZKK-3 (10 µM i 25 µM) ilość kinazy wydaje się być niezmieniona w porównaniu do hodowli kontrolnych. Jednak po zastosowaniu ZKK-3 w stężeniu 50 µM dochodzi do wyraźnego wzrostu poziomu badanej kinazy niezależnie od warunków tlenowych.

http://rcin.org.pl



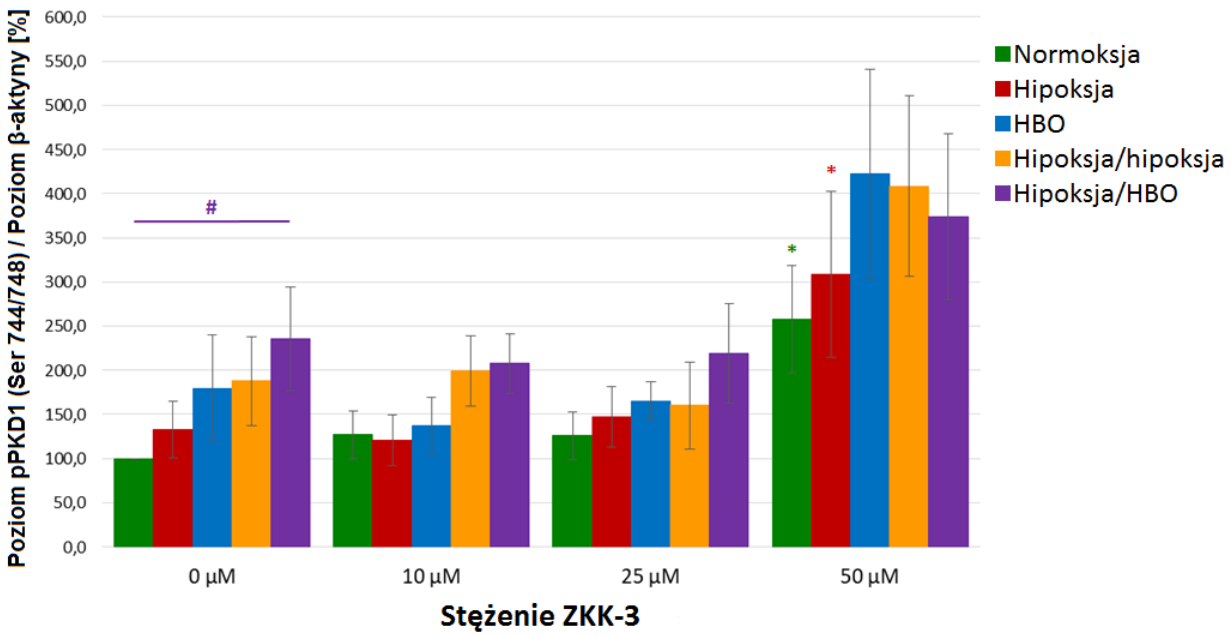
Rycina 22. Poziom kinazy pPKD1 (Ser 744/748) w komórkach linii T98G traktowanych pochodną izotiomocznika ZKK-3 oraz hodowanych w różnych warunkach tlenowych. Analiza Western Blot.

Analiza densytometryczna uzyskanych prążków pozwala stwierdzić, że w porównaniu do warunków kontrolnych poziom pPKD1 (Ser 744/748) rośnie pod wpływem zmian ciśnienia cząstkowego tlenu (Rycina 23). Jednak zmiany te są istotne statystycznie jedynie dla warunków hipoksji/HBO, gdzie odnotowuje się niemal 2,5-krotny wzrost poziomu badanej kinazy. Zbliżone zależności obserwowane są także w grupach traktowanych ZKK-3, lecz nie wykazują one istotności statystycznej dla poszczególnych warunków tlenowych. Nie odnotowuje się zmian poziomu pPKD1 (Ser 744/748) pomiędzy grupami preinkubowanymi w analogicznych warunkach tlenowych.

Inkubacja linii T98G z ZKK-3 w stężeniu 10 μM i 25 μM nie powoduje różnic w poziomie badanej formy ufosforylowanej kinazy PKD1, niezależnie od stosowanych warunków tlenowych. Z kolei po podaniu 50 μM testowanego związku następuje wzrost poziomu pPKD1 (Ser 744/748) we wszystkich badanych

http://rcin.org.pl

warunkach. Jest on jednak istotny statystycznie jedynie dla warunków normoksji (o 158%) oraz hipoksji (o 133%).



Rycina 23. Wpływ pochodnej izotiomocznika ZKK-3 oraz różnych warunków tlenowych na poziom kinazy pPKD1 (Ser 744/748) w komórkach linii T98G. Analiza Western Blot. Oznaczenia: * - $p<0,05$ w odniesieniu do kontroli w danych warunkach tlenowych; # - $p<0,05$ w odniesieniu do danego stężenia ZKK-3 w normoksji.

http://rcin.org.pl

5. Dyskusja

Glioblastoma jest najczęściej występującym nowotworem pierwotnym OUN o najwyższym, IV stopniu złośliwości histologicznej. Pomimo rozwoju nowoczesnych technik stosowanych w diagnostyce i leczeniu glejaków, prognoza kliniczna dla pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą wciąż pozostaje niekorzystna, a średnie przeżycie nie przekracza 16 miesięcy. Powszechnie stosowany chemioterapeutyk, jakim jest temozolomid, pozwala na wydłużenie czasu przeżycia pacjentów zaledwie o kilka miesięcy [11, 23, 24]. Mutacje zachodzące w komórkach nowotworów złośliwych sprawiają, że guzy te szybko rozwijają oporność na leczenie. Z tego względu zachodzi konieczność ciągłego opracowywania bardziej skutecznych strategii terapeutycznych.

Wydaje się, że S-benzylopochodne izotiomocznika (ZKKs) stanowią nową klasę potencjalnych związków przeciwnowotworowych. Związki tej grupy były przedmiotem badań zespołu Koronkiewicz i wsp., którzy potwierdzili ich działanie proapoptotyczne i cytotoksyczne względem różnych komórek nowotworowych hodowanych *in vitro*. Doświadczenia prowadzone na ludzkich liniach komórkowych białaczki HL-60 oraz K-562 wykazały, że jednym z efektywniej działających ZKKs jest N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)izotiomocznik (ZKK-3) [139]. Skuteczność działania tej pochodnej izotiomocznika była jednak zależna od badanej linii komórkowej. W przypadku linii ostrej białaczki promielocytowej HL-60 nasilenie apoptozy obserwowano już przy ekspozycji na działanie ZKK-3 w stężeniu 5 μM i 8 μM, natomiast w przypadku linii przewlekłej białaczki szpikowej K-562 podobny efekt proapoptotyczny uzyskano przy podaniu ZKK-3 w stężeniu 10 μM i 20 μM. Niemniej jednak podanie ZKK-3 powodowało wzrost liczby komórek apoptotycznych o 42-77% po 24 godzinach oraz o 73-93% po 48 godzinach. Doświadczenia z wykorzystaniem linii ludzkiej ostrej białaczki szpikowej KG-1 dawały zbliżone rezultaty: podanie 10 μM i 20 μM badanego związku zwiększało apoptozę komórek odpowiednio o około 38% i 82% po 24 godzinach inkubacji oraz o 48% i 92% po 48 godzinach [141]. Dalsze badania udokumentowały również działanie proapoptotyczne ZKK-3 wobec linii komórkowej ludzkiego raka prostaty [140]. 24-godzinna inkubacja ze związkiem w stężeniach 10 μM, 20 μM i 50 μM skutkowała wzrostem liczby komórek apoptotycznych odpowiednio o 3%, 13%

http://rcin.org.pl

i 68%. Z kolei po 48 godzinach inkubacji apoptozie ulegało odpowiednio 13%, 31% i 87% komórek. Co więcej, Kamińska i wsp. ocenili efekt cytotoksyczny pentabromobenzyloizotiomocznika (ZKK-1) i jego pochodnych względem linii komórkowych glejaków o różnym stopniu złośliwości, w tym linii komórkowej ludzkiego *glioblastoma* T98G [158]. Zaobserwowano spadek żywotności komórek linii T98G po 24 godzinach inkubacji z ZKK-1 do 60%, 55% i 55% odpowiednio dla stężeń 10 μM, 25 μM i 50 μM badanego związku. Dla linii komórkowej ludzkiego *astrocytoma* LN229 zależność ta była zbliżona i wynosiła odpowiednio 70%, 55% i 50%. Niestety w badaniach tych nie oceniano skuteczności ZKK-3 wobec ludzkich linii glejaka, a jedynie wobec szczurzej linii *glioblastoma* C6. Po 24-godzinnym traktowaniu ZKK-3 w stężeniu 10 μM i 50 μM liczba żywych komórek linii C6 wynosiła odpowiednio 30% i 10%, zaś po 48 godzinach 35% i 20%. Z kolei proliferacja komórek linii C6, poddanych działaniu 50 μM ZKK-1, spadła po 24 godzinach o około 40%. Badania nad skutecznością działania pochodnych pentabromobenzylizotiomocznika wobec ludzkiej lini komórkowej *glioblastoma* (T98G) oraz linii wyprowadzonej z gwiaździaka podwyściółkowego olbrzymiokomórkowego (ang. *subependymal giant cell astrocytoma*, SEGA) wykazały, że związki ZKK-2, ZKK-3, TRIM, a w szczególności ZKK-13 już przy niskich stężeniach skutecznie obniżają proliferację oraz żywotność komórek nowotworowych [205]. Po 24-godzinnej inkubacji z ZKK-3 w stężeniu 10 μM liczba komórek T98G i SEGA była mniejsza o 20% i 45%, zaś ich żywotność spadała o 60% i 70%. Co ważne, ocena właściwości przeciwnowotworowych temozolomidu pokazała, że związek ten istotnie obniżał proliferację oraz liczbę żywych komórek linii T98G dopiero w stężeniu 100 μM po 48 godzinach. ZKKs (w tym ZKK-3) wykazywały także silne działanie cytotoksyczne względem prawidłowych ludzkich astrocytów *in vitro*. Jest to poważny problem związany ze stosowaniem większości chemioterapeutyków, któremu można by przeciwdziałać stosując nowoczesne metody precyzyjnego dostarczania związków bezpośrednio do tkanki nowotworowej [206-210].

Wyniki uzyskane w ramach przedstawianych obecnie badań korespondują z powyżej przytoczonymi doniesieniami. W warunkach normoksji obserwowano istotny statystycznie spadek proliferacji komórek ludzkiej linii *glioblastoma* T98G traktowanych ZKK-3 w stężeniach 25 μM i 50 μM. Wraz ze wzrostem stężenia

http://rcin.org.pl

badanej pochodnej izotiomocznika istotnie maleje także żywotność komórek linii T98G po 24 i 48 godzinach inkubacji.

5.1. Wpływ warunków niedotlenienia na proliferację oraz żywotność komórek linii T98G poddanych działaniu ZKK-3

Liczne badania dowodzą, że wysoki poziom niedotlenienia tkanki nowotworowej odgrywa znaczącą rolę w progresji zarówno złośliwych glejaków, jak i innych typów nowotworów oraz zwiększa oporność komórek nowotworowych na radio- i chemoterapię [27, 33, 43].

Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że w warunkach beztlenowych liczba komórek znacząco spada wraz ze wzrostem stężenia ZKK-3, podobnie jak ma to miejsce w warunkach standardowych. Co więcej, sama anoksja powoduje istotne spowolnienie proliferacji nawet bez dodatku ZKK-3 w porównaniu do warunków normoksyjnych. Jednakże żywotność komórek w anoksji jest zdecydowanie wyższa niż w warunkach standardowych, zarówno w grupach kontrolnych, jak i doświadczalnych po 24 i 48 godzinach inkubacji z ZKK-3 w stężeniu 10 μM i 25 μM. Znaczący efekt cytotoksyczny testowanego związku w warunkach anoksji obserwowany jest dopiero przy wyższych stężeniach i przedłużonej ekspozycji na działanie ZKK-3. Otrzymane wyniki wskazują, że niedobór tlenu wpływa hamująco na właściwości cytotoksyczne testowanej pochodnej izotiomocznika.

Badania Liang i wsp. również pokazały, że w warunkach beztlenowych komórki *glioblastoma* hodowane *in vitro* wykazywały zwiększoną oporność na działanie niektórych chemioterapeutyków [211]. W tym wypadku brak tlenu nie powodował obniżenia żywotności monitorowanych kultur. Natomiast Papandreou i wsp. zaobserwowali spadek żywotności mysich fibroblastów oraz nasilenie apoptozy komórek różnych linii nowotworowych w warunkach anoksji, w porównaniu z warunkami normoksji, przy 21% stężeniu tlenu [212].

Obecnie przeprowadzone badania dokumentują, że sama hipoksja nie zmienia tempa proliferacji komórek *glioblastoma* w porównaniu do warunków normoksji. Również efekt cytotoksyczny ZKK-3 wobec komórek nowotworowych złośliwego glejaka w warunkach standardowych i niedoboru tlenu nie wykazuje istotnych statystycznie różnic przy stężeniu 10 μM. Dopiero podanie ZKK-3 w stężeniu

http://rcin.org.pl

25 μM wywołuje istotny statystycznie spadek liczby komórek po 24 godzinach inkubacji w warunkach hipoksji i normoksji. Natomiast przy zastosowaniu 50 μM ZKK-3 liczba komórek w warunkach obniżonego stężenia tlenu jest istotnie wyższa niż w warunkach standardowych. Sama hipoksja znacząco obniża natomiast żywotność komórek GBM *in vitro* w porównaniu do normoksji zarówno po 24, jak i 48 godzinach. Co więcej, w hipoksji tylko przy stężeniu 50 μM badany związek wywołuje spadek żywotności komórek linii T98G w sposób istotny statystycznie, zarówno po jedno-, jak i dwudniowej ekspozycji. Natomiast po 48 godzinach inkubacji z badaną pochodną izotiomocznika w stężeniu 10 μM i 25 μM żywotność komórek jest wyższa w warunkach obniżonego stężenia tlenu niż w warunkach standardowych. Uzyskane dane pozwalają więc stwierdzić, że hipoksja przy wydłużonym czasie ekspozycji znacząco obniża wrażliwość komórek nowotworowych na testowany związek cytotoksyczny tylko w określonym przedziale stężeń. Przy długotrwałej inkubacji z ZKK-3 w stężeniu 50 μM nie obserwuje się zahamowania efektu cytotoksycznego w warunkach niedotlenienia.

Podobnie badania Osawy i wsp. nie wykazały różnic we wzroście komórek *glioblastoma* linii T98G poddanych działaniu jedynie warunków hipoksji w stosunku do normoksji [213]. Wcześniejsze doniesienia dokumentowały, że wrażliwość komórek GBM *in vitro* oraz *in vivo* na radioterapię malała niezależnie od rodzaju niedotlenienia, przy czym najniższa była w przypadku hipoksji cyklicznej [35]. Papandreou i wsp. także stwierdzili, że w warunkach hipoksji (0,5-2% O_2) liczba żywych fibroblastów była identyczna jak w warunkach standardowych. Co więcej, zmianie nie ulegała również zdolność komórek nowotworowych *in vitro* do tworzenia kolonii [212]. W najnowszych badaniach Riffle i wsp. udowodnili, że w sferoidach nowotworowych (rak płuca lub mięsak) wysoki potencjał proliferacyjny wykazywały nie tylko komórki zlokalizowane w zewnętrznych warstwach struktur trójwymiarowych, ale także te, położone głębiej, w obszarach silnie niedotlenionych [214]. Proliferacja komórek tworzących sferoidy była zbliżona, niezależnie od warunków w jakich były one hodowane (normoksja lub hipoksja). Z drugiej strony hipoksja przyspieszała wzrost sferoidów raka piersi [215]. Odmienne wyniki uzyskano z kolei w badaniach przeprowadzonych na linii komórkowej raka prostaty, w których odnotowano istotny statystycznie spadek liczby żywych komórek oraz ich migracji pod wpływem samej hipoksji [216]. Niemniej jednak, podobnie jak w obecnie przeprowadzonych badaniach, pod

http://rcin.org.pl

wpływem obniżonego poziomu tlenu dochodziło do wzrostu oporności komórek na testowane chemioterapeutyki. Identyczną zależność zaobserwowali w swoich najnowszych badaniach Qian i wsp. [217]. Analogiczne wyniki uzyskano również w badaniach przeprowadzonych na komórkach raka okrężnicy *in vitro* [218]. Udowodniono w nich także, że wszczepienie komórek nowotworowych, uprzednio hartowanych w warunkach hipoksji, przyspieszało wzrost guzów *in vivo*.

Niedobór tlenu sprzyja wykształcaniu oporności na niektóre chemioterapeutyki, może jednak wykazywać działanie przeciwne wobec innych związków cytotoksycznych i uwrażliwiać komórki nowotworowe na ich działanie. Dokumentują to badania Strese i wsp., w których porównano efektywność przeciwnowotworową 19 związków, powszechnie stosowanych w chemioterapii, wobec różnych linii komórek nowotworowych hodowanych w warunkach standardowych, niedoboru (hipoksji) lub braku tlenu (anoksji) [219]. Co więcej, okazało się, że obserwowane efekty zależą również od wybranej linii nowotworowej. Podobne wyniki uzyskali Yao i wsp. w badaniach z użyciem cisplatyny [218]. Niektóre leki bioredukcyjne są tak projektowane, aby anoksja i hipoksja mogły nasilać ich działanie cytotoksyczne [220].

5.2. Wpływ natleniania hiperbarycznego na proliferację oraz żywotność komórek linii T98G poddanych działaniu ZKK-3

Jak już wspominano, występowanie licznych obszarów hipoksji w obrębie guzów nowotworowych zmniejsza wrażliwość komórek na stosowane terapie. Postuluje się, że jedną z atrakcyjnych metod uzyskania poprawy stanu natlenowania tkanki nowotworowej może być zastosowanie hiperbarii tlenowej (HBO) [47, 91, 92]. Podawanie tlenu pod zwiększonym ciśnieniem pozwala na wydłużenie dystansu dyfuzji i dotarcia O_2 do głębszych, często źle ukrwionych partii guza. Istnieją jednak doniesienia sugerujące, że HBO może nasilać proces nowotworowy i sprzyjać progresji choroby. Doguchi i wsp. odnotowali wzrost proliferacji komórek nowotworowych i przyspieszenie kancerogenezy w mysim modelu nowotworu skóry pod wpływem zwiększonego ciśnienia tlenu [94]. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy, którzy porównywali wzrost glejaków *in vivo* w warunkach standardowych oraz przy zastosowaniu hiperbarii tlenowej [121, 122]. Pomimo szybszego wzrostu masy guza po podaniu HBO nie odnotowali oni różnic w czasie przeżywalności

http://rcin.org.pl

zwierząt pomiędzy badanymi warunkami. Należy jednak zauważyć, że w przypadku zdecydowanej większości tych badań stosowane procedury natleniania były bardziej agresywne niż normy rekomendowane jako bezpieczne dla pacjentów (wydłużony czas natleniania, większe ciśnienie tlenu, częstsze i liczniejsze serie). Z drugiej strony, Tang i wsp. nie odnotowali rozbieżności w proliferacji oraz wzroście nowotworów pod wpływem HBO w porównaniu do warunków normoksji [221]. Podobne obserwacje dotyczyły szczurzego modelu glejaka, w którym różnice proliferacji komórek w warunkach normoksji, hiperoksji oraz hiperbarii tlenowej nie były istotne statystycznie [54]. Co więcej, badania *in vitro,* przeprowadzone przez zespół Granowitz i wsp., sugerują obniżenie proliferacji komórek nowotworowych inkubowanych w warunkach HBO [222]. Korzystny efekt HBO zaobserwowano również w modelu *in vivo* raka piersi. U szczurów hodowanych w warunkach standardowych następowała znaczna progresja nowotworu, zaś u osobników poddanych działaniu natleniania hiperbarycznego objętość guzów ulegała redukcji [98].

Wyniki uzyskane przeze mnie również pokazują, że sama hiperbaria tlenowa nie zmienia proliferacji oraz żywotności komórek linii T98G, zarówno w porównaniu do warunków standardowych, jak i niedotlenienia.

Pomimo, że zastosowanie samego natleniania hiperbarycznego nie przynosi zadowalających efektów, to podawanie HBO może znacząco zwiększyć skuteczność innych standardowych procedur terapeutycznych [47, 119]. Tlen hiperbaryczny pomaga między innymi uwrażliwić komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyków. Istotne statystycznie nasilenie efektu antyproliferacyjnego substancji leczniczych (melfalanu, gemcytabiny i paklitakselu) pod wpływem HBO udokumentowano względem linii komórkowych wyprowadzonych z różnego rodzaju nowotworów piersi [222]. W warunkach podwyższonego ciśnienia tlenu wzrastało również działanie przeciwnowotworowe karboplatyny względem mięsaka kości *in vitro* i *in vivo* [116]. Rolę natleniania hiperbarycznego udokumentowano także w nasileniu efektu cytotoksycznego artemizyniny [115]. Związek ten znacząco obniżał liczbę komórek linii białaczki, jednak jego działanie było bardziej efektywne po aplikacji w warunkach HBO. Badania *in vivo* na szczurzym modelu raka piersi wykazały, że bezpośrednio po natlenianiu hiperbarycznym zwiększała się przyswajalność 5-fluorouracylu przez komórki nowotworowe, co skutkowało spowolnieniem wzrostu guzów [113]. Wyniki uzyskane przez Stuhr i wsp.

http://rcin.org.pl

na podobnym modelu badawczym pokazały, że podawanie samego HBO lub w połączeniu z 5-FU pozwalało zmniejszyć pierwotne rozmiary nowotworu, zarówno w stosunku do grupy kontrolnej, jak i traktowanej samym lekiem [112]. Nie zawsze jednak połączenie chemioterapii i HBO daje jednoznacznie pozytywny efekt. Selvendiran i wsp. zaobserwowali spadek objętości guzów w mysim modelu nowotworu jajnika pod wpływem HBO i cisplatyny, jednak towarzysząca temu utrata masy ciała zwierząt świadczyła o nadmiernej toksyczności proponowanej terapii kombinowanej [110].

Połączenie tlenu hiperbarycznego z chemioterapią wydaje się być obiecujące w leczeniu złośliwych glejaków. Sun i wsp. pokazali, że już samo zwiększenie zawartości procentowej tlenu przy ciśnieniu normobarycznym w badaniach *in vitro* może wywołać wzrost wrażliwości komórek *glioblastoma* na powszechnie stosowany temozolomid [55]. Badania cytotoksyczności TMZ względem komórek GBM *in vitro* w warunkach hiperbarii tlenowej wykazały, że TMZ zarówno sam, jak i w połączeniu z HBO, powodował istotne zahamowanie wzrostu komórek [132]. Terapia kombinowana TMZ+HBO znacząco nasilała również apoptozę komórek nowotworowych. Istotny wzrost właściwości antyproliferacyjnych temozolomidu pod wpływem HBO zaobserwowali także Dagistan i wsp. w badaniach *in vivo* [131]. Lu i wsp. zaproponowali stosowanie nimustyny połączonej z natlenianiem hiperbarycznym w terapii guzów glejopochodnych [133]. W swoich badaniach udokumentowali spadek masy guza u myszy leczonych nimustyną/HBO, nie tylko w porównaniu do grupy kontrolnej, ale również do zwierząt, którym podawano tylko HBO lub tylko nimustynę.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań, oceniających wpływ natleniania hiperbarycznego na działanie ZKK-3, są zbieżne z przedstawionymi powyżej doniesieniami literaturowymi. Wzrost stężenia testowanej pochodnej izotiomocznika skutkuje istotnym statystycznie obniżeniem proliferacji komórek *glioblastoma in vitro*, zarówno w warunkach normoksji, jak i po podaniu tlenu hiperbarycznego. Jednakże po podaniu ZKK-3 w stężeniu 50 μM i jednoczesnej ekspozycji na działanie HBO, spadek liczby komórek jest znacząco większy niż w warunkach standardowych. Żywotność komórek linii T98G traktowanych ZKK-3 również ulega zmniejszeniu pod wpływem natleniania hiperbarycznego. Po 24-godzinnej inkubacji z ZKK-3, spadek liczby żywych komórek w warunkach HBO jest znacząco większy w porównaniu do normoksji jedynie po podaniu

http://rcin.org.pl

badanego związku w stężeniu 50 μM. Jednak po 48 godzinach istotne statystycznie różnice pomiędzy warunkami HBO i normoksji obserwuje się także przy niższych stężeniach ZKK-3. Uzyskane wyniki wskazują, że tlen hiperbaryczny nasila przeciwnowotworowe właściwości badanego pentabromobenzyloizotiomocznika. Najbardziej korzystny efekt obserwowano przy wyższych stężeniach lub przedłużonym czasie ekspozycji na działanie ZKK-3/HBO.

Warto zaznaczyć, że bezpośrednie porównanie proliferacji komórek glejaka *in vitro* w warunkach hiperbarii tlenowej i hipoksji, analogicznej do warunków niedotlenienia tkanki nowotworowej *in vivo*, potwierdza pozytywną rolę HBO jako postępowania wspomagającego chemioterapię. Co prawda w obu warunkach tlenowych wzrost komórek linii T98G jest znacząco spowolniony po podaniu ZKK-3 w stężeniach 25 μM i 50 μM, jednakże istotnie statystycznie silniejszy efekt cytotoksyczny uzyskuje się po zastosowaniu HBO. ZKK-3 w połączeniu z tlenem hiperbarycznym wykazuje znaczący wpływ również na obniżenie żywotności komórek linii T98G. Pod wpływem tlenu, podawanego pod zwiększonym ciśnieniem, badana pochodna izotiomocznika redukuje liczbę żywych komórek nowotworowych w sposób istotny statystycznie już przy stężeniu 10 μM. Wrażliwość komórek na działanie ZKK-3 jest zdecydowanie wyższa w warunkach HBO niż w przypadku hipoksji, niezależnie od czasu ekspozycji na działanie testowanego związku. Jedynie po podaniu ZKK-3 w stężeniu 50 μM, niezależnie od warunków tlenowych oraz czasu inkubacji, nie obserwuje się różnic istotnych statystycznie. Otrzymane rezultaty pokazują, że podawanie tlenu pod zwiększonym ciśnieniem nasila właściwości cytotoksyczne testowanej pochodnej izotiomocznika w stosunku do warunków hipoksji, odpowiadających warunkom fizjologicznym tkanki nowotworowej. Biorąc pod uwagę fakt, że związek ten stosowany pojedynczo wydaje się być dużo bardziej efektywny w leczeniu komórek *glioblastoma in vitro* niż używany aktualnie w klinice temozolomid [205], można domniemywać, że połączenie działania ZKK-3 i natleniania hiperbarycznego może stanowić obiecujące podejście terapeutyczne względem nowotworów mózgu o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej.

Pozytywne wyniki w eksperymentalnym leczeniu niektórych nowotworów, w tym glejaków, uzyskano także wykorzystując hiperbarię tlenową jako terapię wspomagającą radioterapię [47]. Niezwykle istotne jest stosowanie napromieniowania bezpośrednio po natlenianiu, w przeciwnym razie mogą wystąpić

http://rcin.org.pl

działania niepożądane i uszkodzenia popromienne. Kohshi i wsp. stosując RT nie później niż 15 minut po HBO odnotowali redukcję rozmiarów guzów glejopochodnych oraz wzrost przeżywalności pacjentów bez obserwowanych efektów ubocznych [125, 126]. Obiecujące wydają się być również badania kliniczne, w których natlenianie hiperbaryczne stanowiło jeden z elementów terapii wieloczynnikowej w leczeniu glejaków. Jednoczesne połączenie HBO, radioterapii i chemioterapii powodowało regresję wzrostu nowotworu oraz wydłużenie czasu przeżycia pacjentów. W przeprowadzonych badaniach używano różnych chemioterapeutyków: interferonu-beta/nimustyny [134], prokarbazyny/nimustyny/ winkrystyny [135-137], jak również temozolomidu [138].

5.3. Wpływ różnych warunków tlenowych na ekspresję białka HIF-1α

Wyniki licznych badań naukowych dowodzą, że w warunkach niewystarczającego zaopatrzenia w tlen, w komórkach nowotworowych dochodzi do szeregu niekorzystnych zmian metabolicznych, nasilenia angiogenezy oraz zaburzenia procesu apoptozy [46]. Głównym czynnikiem transkrypcyjnym, zaangażowanym w regulację procesów adaptacyjnych, jest indukowany hipoksją heterodimer HIF-1 [33, 36, 61]. Poziom podjednostki α (HIF-1α), a przez to aktywność cząsteczki HIF-1, jest ściśle zależny od poziomu natlenowania komórek. Zespół Zhou i wsp. zbadał stopień ekspresji HIFs w komórkach nowotworów różnego pochodzenia, w tym glejaków, hodowanych *in vitro* w zróżnicowanych warunkach tlenowych [223]. Zaobserwowano, że poziom HIFs różnił się w zależności od linii komórkowej. Niemniej jednak stopniowe obniżanie ciśnienia cząstkowego pO_2 skutkowało mniej lub bardziej gwałtownym wzrostem ekspresji HIF niezależnie od pochodzenia komórek. Podwyższenie poziomu HIF-1α, jak również genów przez niego regulowanych (m.in. *VEGF*, *GLUT1*, *GLUT3*, *PDHK1*), w warunkach hipoksji, w porównaniu z warunkami standardowymi, odnotowali również inni badacze [218, 224]. Co więcej, Liu i wsp. wykazali, że nasilona ekspresja HIF-1α sprzyjała wykształcaniu lekooporności przez komórki linii nowotworowych oraz ich przeżywalności [225]. Było to związane z faktem, iż pod wpływem HIF-1α dochodziło do wzrostu poziomu białka oporności wielolekowej 1 (ang. *multidrug resistance-associated protein 1*, MRP1) i genów antyapoptotycznych (*Bcl-2*), a z drugiej strony odnotowano osłabienie ekspresji

http://rcin.org.pl

białka proapoptotycznego Bax. Ponadto zarówno powyższe badania, jak i inne eksperymenty przeprowadzone na modelach trójwymiarowych *in vitro* wykazały, że wzrost ekspresji HIF-1α korelował z nasiloną ekspresją transportera oporności lekowej P-gp (ang. *P-glycoprotein*) [226].

W przypadku *glioblastoma* zaobserwowano, że zarówno w warunkach hipoksji przewlekłej, jak i cyklicznej, dochodziło do wzrostu poziomu mRNA oraz białka HIF-1α w komórkach *in vitro* [35]. Joseph i wsp. potwierdzili wzrost ekspresji HIF-1α oraz HIF-2α w komórkach różnych linii GBM pod wpływem obniżonej zawartości tlenu [66]. Co więcej, liczne publikacje sugerują, że w *glioblastoma* aktywność białek z rodziny HIF jest podwyższona już w warunkach normoksyjnych, a hipoksja dodatkowo ją nasila [29, 33, 223].

Zahamowanie aktywności czynników z rodziny HIF wydaje się być atrakcyjną strategią terapeutyczną. Prowadzone są badania, mające na celu opracowanie inhibitorów specyficznych wobec HIF-1 oraz wyciszanie jego aktywności przy użyciu siRNA. Jednym ze związków obniżających ekspresję HIF-1 jest topotecan, będący inhibitorem topoizomerazy I, który był testowany na liniach komórkowych GBM oraz w próbach przedklinicznych [227, 228]. Najnowsze badania sugerują, że supresję aktywności HIF-1α można osiągnąć także poprzez podawanie propofolu [217].

Skutecznym sposobem obniżania ekspresji HIF-1α wydaje się być również zastosowanie tlenu hiperbarycznego. Wykazano, że podawanie HBO powodowało obniżenie poziomu mRNA i białka HIF-1α w modelach *in vivo* w przypadku uszkodzenia rdzenia kręgowego [229], niedokrwienia mózgu [230] i w ostrym zapaleniu trzustki [231]. Natomiast przeciwny efekt uzyskiwano podczas stosowania tlenu pod zwiększonym ciśnieniem w leczeniu trudno gojących się ran [232] oraz w regeneracji wątroby [233], gdzie dochodziło do wzrostu poziomu HIF-1α. Niestety, tylko niewielka liczba dostępnych publikacji dotyczy wpływu natleniania hiperbarycznego na ekspresję białek z rodziny HIF w komórkach nowotworowych. Lu i wsp. zaobserwowali istotne statystycznie zahamowanie aktywności tego czynnika transkrypcyjnego w mysim modelu ludzkiego glejaka po ekspozycji na działanie HBO [133]. Połączenie działania HBO i nimustyny niemal całkowicie hamowało aktywność HIF-1α. Stuhr i wsp. po zastosowaniu normobarycznego natleniania (100% O_2, 1 bar) wobec innego modelu glejaka *in vivo* odnotowali ponad 7-krotny spadek ekspresji izoformy HIF-2α w odniesieniu do warunków kontrolnych

http://rcin.org.pl

- normoksji [54]. Z drugiej strony, istnieją również doniesienia mówiące o braku wpływu HBO na poziom HIF-1α lub o nasileniu jego ekspresji po podaniu czystego tlenu pod normalnym lub zwiększonym ciśnieniem [110, 122, 234]. Zatem kwestia ta wciąż pozostaje nie do końca rozstrzygnięta.

Wyniki obecnie przeprowadzonych badań otrzymanych przy użyciu testu ELISA pokazują, że poziom białka HIF-1α w komórkach linii T98G zależy ściśle od warunków tlenowych w jakich są one hodowane. W komórkach utrzymywanych w hipoksji ekspresja HIF-1α jest znacząco wyższa w porównaniu z warunkami standardowymi. Wydłużenie czasu niedotlenienia (preinkubacja w warunkach hipoksji przed podaniem ZKK-3) sprawia, że wzrost poziomu HIF-1α jest jeszcze większy. Z drugiej strony, ekspozycja na działanie HBO nie powoduje istotnych zmian w poziomie HIF-1α w porównaniu do normoksji. Wyjątek stanowią lizaty z grupy hipoksja/HBO traktowane wyższymi stężeniami ZKK-3, w których odnotowuje się znaczące obniżenie poziomu badanego białka. Najistotniejszym celem powyższego doświadczenia było sprawdzenie, w jaki sposób HBO wpływa na poziom ekspresji HIF-1α w odniesieniu do grupy preinkubowanej w analogicznych warunkach tlenowych, a następnie poddanej działaniu ZKK-3 w warunkach hipoksji. W grupach utrzymywanych wstępnie w normoksji, a następnie w warunkach hipoksji lub hiperbarii tlenowej, obserwuje się statystycznie istotny spadek poziomu HIF-1α pod wpływem HBO w grupach kontrolnych. Z kolei porównanie ze sobą grup preinkubowanych w warunkach hipoksji pokazuje, że podanie HBO prowadzi do znaczącego zahamowania ekspresji HIF-1α, widocznego zarówno w grupach kontrolnych, jak i przy większości stosowanych stężeń ZKK-3. Otrzymane wyniki sugerują, że ekspozycja na działanie HBO w znaczący sposób wpływa na obniżenie poziomu HIF-1α, którego poziom jest szczególnie podwyższony w warunkach hipoksji.

Niewątpliwą zaletą zastosowania natleniania hiperbarycznego w leczeniu nowotworów jest fakt, że HBO powoduje istotne zahamowanie aktywności HIF-1α, a jednocześnie wykazuje znikomą toksyczność w porównaniu z innymi proponowanymi inhibitorami tego białka.

http://rcin.org.pl

5.4. Wpływ pochodnej izotiomocznika ZKK-3 oraz różnych warunków tlenowych na ekspresję kinazy białkowej PKD1 i poziom jej form ufosforylowanych

Kinaza białkowa D1 pełni istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych. Odpowiada między innymi za regulację detoksykacji reaktywnych form tlenu, powstających w mitochondriach i w ten sposób chroni komórki i ich organelle przed stresem oksydacyjnym [165]. Zaburzenia ekspresji PKD1 sprzyjają rozwojowi licznych procesów patologicznych, w tym także chorób nowotworowych. Można przypuszczać, że poprzez regulację poziomu PKD1 można wpływać na rozwój tych schorzeń oraz proces ich leczenia. I tak Nickkholgh i wsp. opisali ścieżkę sygnałową β-kateniny/Myc/Max, odpowiedzialną za obniżanie ekspresji kinazy białkowej D1 w nowotworach prostaty. Autorzy zasugerowali, że poprzez inhibicję poszczególnych elementów tej kaskady można zwiększyć aktywność PKD1, a tym samym odpowiedź komórek raka prostaty na leczenie [175]. Trwają liczne badania nad opracowaniem supresorów, skutecznych wobec badanej kinazy [172]. Niestety wadą większości z nich okazała się ich niska selektywność. Zmniejszenie poziomu białek z rodziny PKD wydaje się być pożądane także w leczeniu glejaków. W tym celu podejmowano próby wykorzystania dostępnych inhibitorów oraz badano wyciszenie ekspresji PKD2 w komórkach linii *glioblastoma* przy użyciu specjalnie zaprojektowanych siRNA [171, 176].

Koronkiewicz i wsp. wykazali, że N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromo-benzylo)izotiomocznik (ZKK-3), podawany w stężeniu 10 μM, hamował aktywność kinazy PKD1 w komórkach raka prostaty *in vitro* o około 70% [140]. Identyczną zależność zaobserwowano także w przypadku linii komórkowej ludzkiej ostrej białaczki szpikowej [141]. W doniesieniach tych nie podano jednak po jakim czasie inkubacji z badanym związkiem oceniana była ekspresja PKD1. Nie sprecyzowano także, czy uzyskane wyniki odnoszą się do całkowitego poziomu tej kinazy (tzn. niezależnie od jej formy), czy jedynie poziomu formy nieufosforylowanej. Dokładniejsze badania przeprowadzone na linii komórkowej *glioblastoma* T98G wykazały, że ZKK-3 w stężeniu 10 μM po 48-godzinnej inkubacji nie wywołuje znaczących zmian w ekspresji PKD1, natomiast powoduje istotny, ponad 66%, spadek poziomu ufosforylowanej formy tej kinazy: pPKD1 (Ser 916) [205].

http://rcin.org.pl

Obecnie przeprowadzone badania z użyciem linii złośliwego glejaka T98G pokazują jedynie tendencję do obniżania ekspresji kinazy białkowej D1 pod wpływem testowanej pochodnej izotiomocznika, jednak nawet po zastosowaniu ZKK-3 w stężeniu 50 µM obserwowane różnice nie są istotne statystycznie. 24-godzinna inkubacja z najwyższym stężeniem badanego związku skutkuje natomiast znaczącym spadkiem (o 45-70%) poziomu formy ufosforylowanej pPKD1 (Ser 916) niezależnie od stosowanych warunków tlenowych. Sugeruje to, że ZKK-3 wykazuje działanie hamujące wobec aktywności tej formy badanej kinazy. Inaczej przedstawiają się wyniki uzyskane dla innej formy pPKD1 (Ser 744/748). Przy niskich stężeniach testowanego związku cytotoksycznego poziom tej kinazy nie ulega większym zmianom. Jednak pod wpływem inkubacji z ZKK-3 w stężeniu 50 µM dochodzi do niespodziewanego wzrostu jej aktywności, istotnego statystycznie w warunkach standardowych, hipoksji oraz HBO. Podejmując próby wyjaśnienia zachodzącej zależności, warto zwrócić uwagę na fakt, że w procesie aktywacji kinazy białkowej D1, wywołanej stresem oksydacyjnym po uprzedniej translokacji oraz fosforylacji na reszcie Tyr 463, zachodzi ponowna fosforylacja tego białka w pętli aktywacyjnej na resztach Ser 744/748, a dopiero na końcu fosforylacja na Ser 916 (Rycina 1b) [166]. Wysoce prawdopodobnym wydaje się zatem, że podawanie ZKK-3 w stężeniu 50 µM zapobiega fosforylacji PKD1 właśnie na reszcie Ser 916, co skutkuje obniżeniem poziomu pPKD1 (Ser 916), przy jednoczesnym nagromadzeniu pPKD1 (Ser 744/748).

W badaniach *in vitro* wykazano, że w hipoksji zachodzi fosforylacja i aktywacja PKD1, indukowana melatoniną lub białkiem rhBMP-2 (rekombinowane ludzkie białko morfogenetyczne kości), która w połączeniu ze ścieżką sygnałową MAPK sprzyja różnicowaniu osteoblastów [235, 236]. Fleegal i wsp. oznaczali poziom izoform kinaz z rodziny PKC w warunkach niskiego stężenia tlenu i po reoksygenacji w modelach *in vitro* i *in vivo* [237]. Okazało się, że o ile w liniach komórkowych ekspresja kinazy PKCµ (pierwotna nazwa kinazy PKD1) znacząco rosła pod wpływem hipoksji i pozostawała podwyższona po reoksygenacji, o tyle w modelu szczurzym nie obserwowano istotnych zmian jej poziomu. Niezmienioną w wyniku niedotlenienia (10% O_2) ekspresję PKCµ w pniu mózgu szczurów odnotowali wcześniej także Gozal i wsp. [238]. Z drugiej strony wykazano, że wzrost poziomu fosforylacji PKD1 na resztach Ser 744/748 oraz Ser 916

http://rcin.org.pl

w odpowiedzi na stres oksydacyjny skutkował obniżeniem apoptozy komórek w modelu *in vitro* choroby Parkinsona [239].

Równie skomplikowana jest kwestia wpływu stopnia natlenowania na poziom kinaz białkowych D w nowotworach. Spowodowane jest to faktem, iż zarówno niedobór tlenu, jak i jego nadmiar w organizmie nasila stres oksydacyjny i produkcję ROS [46, 92]. Należałoby się zatem spodziewać pobudzenia aktywności PKD1 w komórkach nowotworowych w warunkach hipoksji oraz pod wpływem HBO. Azoitei i wsp. zaobserwowali, że w warunkach obniżonego dostępu tlenu dochodziło do aktywacji kinazy PKD2 w linii komórkowej nowotworu trzustki [177]. Wykazano, że pod wpływem zwiększonego stężenia mitochondrialnych reaktywnych form tlenu (np. H_2O_2) następował wzrost zarówno całkowitej ekspresji kinazy białkowej D, jak i jej form ufosforylowanych na resztach Ser 738/742 oraz Tyr 463 [167, 168].

Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że poziom PKD1 nie różni się zbytnio pomiędzy badanymi warunkami tlenowymi. Po zastosowaniu ZKK-3 ekspresja kinazy białkowej D1 nieznacznie maleje w warunkach hipoksji oraz podwójnej hipoksji. Z kolei natlenianie hiperbaryczne powoduje wzrost ekspresji PKD1. Wszystkie te zmiany nie są jednak istotne statystycznie. Zbliżone zależności obserwuje się także dla form ufosforylowanych kinazy PKD1. W hodowlach, którym nie podano związku cytotoksycznego, następuje znaczący spadek poziomu pPKD1 (Ser 916) w hipoksji, HBO oraz podwójnej hipoksji. W warunkach zwiększonego ciśnienia tlenu poziom tej formy kinazy wydaje się być wyższy niż w warunkach niedotlenienia, jednak różnice nie są istotne statystycznie. Z kolei w przypadku pPKD1 (Ser 744/748) jedynie w grupie kontrolnej dochodzi do znaczącego wzrostu aktywności w warunkach hipoksja/HBO w stosunku do normoksji. Nieistotne statystycznie różnice w ekspresji PKD1 oraz poziomie jej ufosforylowanych form w warunkach hipoksji i HBO mogą jedynie sugerować, że pod wpływem tlenu hiperbarycznego może dochodzić do nieco większych zaburzeń homeostazy oksydacyjnej niż ma to miejsce w wyniku niedoboru O_2 w komórkach. Być może należałoby wydłużyć okres niedotlenienia oraz powtórzyć natlenianie hiperbaryczne, aby uzyskać bardziej jednoznaczne wyniki.

http://rcin.org.pl

5.5. Podsumowanie

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę wpływu różnych warunków tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego, na potencjał przeciwnowotworowy nowej pochodnej pentabromobeznyloizotiomocznika - ZKK-3 wobec komórek nowotworowych linii złośliwego glejaka T98G. Uzyskane wyniki dowodzą, że zarówno warunki braku (anoksja), jak i niedoboru tlenu (hipoksja) osłabiają aktywność antyproliferacyjną testowanego związku wobec komórek badanej linii *glioblastoma*. Aby osiągnąć zadowalający efekt cytotoksyczny w warunkach niedotlenienia konieczne jest stosowanie ZKK-3 w wysokim stężeniu lub przedłużenie ekspozycji na jego działanie. Z kolei podanie HBO uwrażliwia komórki linii T98G na działanie badanej pochodnej izotiomocznika, zarówno w odniesieniu do normoksji, jak i hipoksji, odpowiadającej warunkom *in situ*. W porównaniu z warunkami hipoksji, żywotność komórek glejaka znacząco maleje pod wpływem natleniania hiperbarycznego już przy niskich stężeniach związku oraz po krótkim czasie ekspozycji na ZKK-3/HBO. Wzrost poziomu białka HIF-1α w warunkach hipoksji oraz jego obniżenie pod wpływem natleniania hiperbarycznego wyraźnie sugeruje, że zastosowanie HBO może zmniejszać oporność komórek nowotworowych na leczenie, spowodowaną niedotlenieniem tkanki nowotworowej. Otrzymane wyniki pokazują, że pod wpływem działania ZKK-3 nie dochodzi do obniżenia poziomu PKD1 oraz jej ufosforylowanej formy pPKD1 (Ser 744/748), następuje jednak spadek poziomu formy pPKD1 (Ser 916). Brak znaczących różnic w poziomie PKD1 i jej ufosforylowanych form w komórkach poddawanych działaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego sugeruje, że hamowanie aktywności kinazy białkowej D1 nie jest wiodącym mechanizmem działania cytotoksycznego ZKK-3/HBO. Warto jednak podkreślić, że pod wpływem tlenu hiperbarycznego dochodzi do zniesienia ochronnego wpływu HIF-1α na komórki linii T98G i uwrażliwienia komórek nowotworowych na efekt cytotoksyczny ZKK-3, co może stanowić podstawę do rozważań nad możliwością zastosowania połączenia ZKK-3/HBO w leczeniu złośliwych nowotworów glejopochodnych.

http://rcin.org.pl

6. Wnioski

- Brak tlenu (anoksja) oraz warunki obniżonego poziomu tlenu (hipoksja) osłabiają efekt cytotoksyczny pochodnej izotiomocznika ZKK-3 i sprzyjają lepszej przeżywalności komórek *glioblastoma* w warunkach *in vitro*.
- Podanie tlenu hiperbarycznego istotnie obniża proliferację komórek linii złośliwego glejaka T98G oraz zwiększa ich wrażliwość na testowaną pochodną izotiomocznika – ZKK-3. Korzystny efekt cytotoksyczny ZKK-3/HBO można uzyskać przy niższych stężeniach badanego związku oraz po krótszym czasie ekspozycji.
- Poziom białka HIF-1α w komórkach linii T98G wzrasta w warunkach hipoksji, natomiast ulega obniżeniu pod wpływem natleniania hiperbarycznego. Może to sugerować, że HBO zmniejszając niedotlenienie i poziom markerów hipoksji, obniży oporność komórek nowotworowych na działanie cytostatyków.
- Spadek poziomu pPKD1 (Ser 916) po podaniu ZKK-3 wskazuje, że badana pochodna pentabrombenzyloizotiomocznika wykazuje właściwości inhibitora względem tej formy kinazy białkowej D1.
- Brak znaczących różnic w poziomie PKD1 i jej ufosforylowanych form w komórkach *glioblastoma* poddawanych działaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego, sugeruje, że hamowanie aktywności kinazy białkowej D1 nie jest wiodącym mechanizmem działania cytotoksycznego ZKK-3/HBO.
- Połączenie pochodnej izotiomocznika ZKK-3 i natleniania hiperbarycznego można rozważać jako obiecujące podejście terapeutyczne w leczeniu nowotworów mózgu o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej.

http://rcin.org.pl

Bibliografia

1. *Cancer. Fact sheet.;* February 2017; Dostępne na stronie: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/ (dostęp z dnia 06.09.2017);
2. Ferlay J. i wsp., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012;* Int J Cancer, 2015, 136(5), s. E359-E386.
3. Didkowska J. i Wojciechowska U.; *Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce.;* Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie.; Dostępne na stronie: http://onkologia.org.pl/k/epidemiologia/ (dostęp z dnia 06.09.2017);
4. Ervik M. i wsp.; Cancer Today; 2016, Lyon, France; International Agency for Research on Cancer. Cancer Today; Dostępne na stronie: http://gco.iarc.fr/today (dostęp z dnia 06.09.2017);
5. Schneider T. i wsp., *Gliomas in adults;* Dtsch Arztebl Int, 2010, 107(45), s. 799-808.
6. Agnihotri S. i wsp., *Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies;* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013, 61(1), s. 25-41.
7. Zong H., Verhaak R. G. i Canoll P., *The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements;* Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(4), s. 383-394.
8. Maher E. A. i wsp., *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter;* Genes Dev, 2001, 15(11), s. 1311-1333.
9. Stupp R. i wsp., *High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up;* Ann Oncol, 2010, 21 Suppl 5, s. v190-v193.
10. Hanif F. i wsp., *Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment;* Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(1), s. 3-9.
11. Davis M. E., *Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment;* Clin J Oncol Nurs, 2016, 20(5), s. S2-S8.
12. Biernat W. i Liberski P. P., *Glejak wielopostaciowy (glioblastoma multiforme)*, in *Neuropatologia Mossakowskiego*, P.P. Liberski and W. Papierz, Editors. 2005, CZELEJ Sp. z o. o.: Lublin. s. 701-713.
13. Jawhari S., Ratinaud M. H. i Verdier M., *Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone 'menage-a-trois';* Cell Death Dis, 2016, 7(10), s. e2434.
14. Noroxe D. S., Poulsen H. S. i Lassen U., *Hallmarks of glioblastoma: a systematic review;* ESMO Open, 2016, 1(6), s. e000144.
15. Louis D. N. i wsp., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary;* Acta Neuropathol, 2016, 131(6), s. 803-820.
16. Potemski P., *Molekularne uwarunkowania leczenia glejaków;* Onkol. Prak. klin, 2010, 6(2), s. 73-78.
17. Verhaak R. G. i wsp., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1;* Cancer Cell, 2010, 17(1), s. 98-110.

http://rcin.org.pl

18. Aldape K. i wsp., *Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers;* Acta Neuropathol, 2015, 129(6), s. 829-848.
19. Schwartzbaum J. A. i wsp., *Epidemiology and molecular pathology of glioma;* Nat Clin Pract Neurol, 2006, 2(9), s. 494-503.
20. Bigos E. i wsp., *Glejak wielopostaciowy mózgu – problem coraz bardziej aktualny;* Medycyna Paliatywna, 2014, 6(1), s. 7-13.
21. Stupp R. i wsp., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma;* N Engl J Med, 2005, 352(10), s. 987-996.
22. Stupp R. i wsp., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial;* Lancet Oncol, 2009, 10(5), s. 459-466.
23. Lee S. Y., *Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme;* Genes & Diseases, 2016, 3(3), s. 198-210.
24. Hegi M. E. i wsp., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma;* N Engl J Med, 2005, 352(10), s. 997-1003.
25. Stupp R. i wsp., *Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial;* JAMA, 2015, 314(23), s. 2535-2543.
26. Taphoorn M. J. B. i wsp., *Influence of Treatment With Tumor-Treating Fields on Health-Related Quality of Life of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial;* JAMA Oncol, 2018, 4(4), s. 495-504.
27. Hockel M. i Vaupel P., *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects;* J Natl Cancer Inst, 2001, 93(4), s. 266-276.
28. Vaupel P. i Mayer A., *Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome;* Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(2), s. 225-239.
29. Mendichovszky I. i Jackson A., *Imaging hypoxia in gliomas;* Br J Radiol, 2011, 84 Spec No 2, s. S145-S158.
30. Wang J. i wsp., *Detection of hypoxia in human brain tumor xenografts using a modified comet assay;* Neoplasia, 2003, 5(4), s. 288-296.
31. Jensen R. L., *Hypoxia in the tumorigenesis of gliomas and as a potential target for therapeutic measures;* Neurosurg Focus, 2006, 20(4), s. E24.
32. Spence A. M. i wsp., *Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival;* Clin Cancer Res, 2008, 14(9), s. 2623-2630.
33. Jensen R. L., *Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target;* J Neurooncol, 2009, 92(3), s. 317-335.
34. Carreau A. i wsp., *Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia;* J Cell Mol Med, 2011, 15(6), s. 1239-1253.
35. Hsieh C. H. i wsp., *Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity;* Oncol Rep, 2010, 24(6), s. 1629-1636.
36. Vaupel P., *The role of hypoxia-induced factors in tumor progression;* Oncologist, 2004, 9 Suppl 5, s. 10-17.
37. Kizaka-Kondoh S. i wsp., *Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy;* Cancer Sci, 2003, 94(12), s. 1021-1028.

http://rcin.org.pl

38. Kayama T. i wsp., *Intratumoral oxygen pressure in malignant brain tumor;* J Neurosurg, 1991, 74(1), s. 55-59.
39. Cruickshank G. S., Rampling R. P. i Cowans W., *Direct measurement of the PO2 distribution in human malignant brain tumours;* Adv Exp Med Biol, 1994, 345, s. 465-470.
40. Onishi M. i wsp., *Angiogenesis and invasion in glioma;* Brain Tumor Pathol, 2011, 28(1), s. 13-24.
41. Szala S. i wsp., *„Błędne koła" glejaków: unaczynienie i inwazyjność;* Postepy Hig Med Dosw (Online), 2012, 66, s. 888-900.
42. Rockwell S. i wsp., *Hypoxia and radiation therapy: past history, ongoing research, and future promise;* Curr Mol Med, 2009, 9(4), s. 442-458.
43. Muz B. i wsp., *The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy;* Hypoxia (Auckl), 2015, 3, s. 83-92.
44. Gardner L. B. i wsp., *Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression;* J Biol Chem, 2001, 276(11), s. 7919-7926.
45. Goda N. i wsp., *Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia;* Mol Cell Biol, 2003, 23(1), s. 359-369.
46. Daruwalla J. i Christophi C., *Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: a review;* World J Surg, 2006, 30(12), s. 2112-2131.
47. Stepien K., Ostrowski R. P. i Matyja E., *Hyperbaric oxygen as an adjunctive therapy in treatment of malignancies, including brain tumours;* Med Oncol, 2016, 33(9), s. 101.
48. Biesaga B., *Regulacja ekspresji białka HIF 1 jako nowa strategia celowanej terapii nowotworów złośliwych;* Nowotwory. Journal of Oncology, 2008, 58(3), s. 255-259.
49. Henkel-Honke T. i Oleck M., *Artificial oxygen carriers: a current review;* AANA J, 2007, 75(3), s. 205-211.
50. Keyhanian S., Ebrahimifard M. i Zandi M., *Investigation on artificial blood or substitute blood replace the natural blood;* Iran J Ped Hematol Oncol, 2014, 4(2), s. 72-77.
51. Brizel D. M. i wsp., *The mechanisms by which hyperbaric oxygen and carbogen improve tumour oxygenation;* Br J Cancer, 1995, 72(5), s. 1120-1124.
52. Beppu T. i wsp., *Change of oxygen pressure in glioblastoma tissue under various conditions;* J Neurooncol, 2002, 58(1), s. 47-52.
53. Huang Z. i wsp., *Hyperoxygenation enhances the tumor cell killing of photofrin-mediated photodynamic therapy;* Photochem Photobiol, 2003, 78(5), s. 496-502.
54. Stuhr L. E. i wsp., *Hyperoxia retards growth and induces apoptosis, changes in vascular density and gene expression in transplanted gliomas in nude rats;* J Neurooncol, 2007, 85(2), s. 191-202.
55. Sun S. i wsp., *Hyperoxia resensitizes chemoresistant human glioblastoma cells to temozolomide;* J Neurooncol, 2012, 109(3), s. 467-475.
56. Huang W. J., Chen W. W. i Zhang X., *Glioblastoma multiforme: Effect of hypoxia and hypoxia inducible factors on therapeutic approaches;* Oncol Lett, 2016, 12(4), s. 2283-2288.
57. Teicher B. A., Lazo J. S. i Sartorelli A. C., *Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells;* Cancer Res, 1981, 41(1), s. 73-81.

http://rcin.org.pl

58. Kizaka-Kondoh S., Tanaka S. i Hiraoka M., *Imaging and Targeting of the Hypoxia-inducible Factor 1-active Microenvironment;* J Toxicol Pathol, 2009, 22(2), s. 93-100.
59. Błaszczak-Świątkiewicz K., Olszewska P. i Mikiciuk-Olasik E., *Wpływ hipoksji na zmiany metabolizmu komórek nowotworowych;* Nowotwory. Journal of Oncology, 2012, 62(4), s. 283-290.
60. Eales K. L., Hollinshead K. E. i Tennant D. A., *Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells;* Oncogenesis, 2016, 5, s. e190.
61. Yang L. i wsp., *Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications;* Exp Cell Res, 2012, 318(19), s. 2417-2426.
62. Semenza G. L., *HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia;* J Appl Physiol (1985), 2000, 88(4), s. 1474-1480.
63. Li Z. i Rich J. N., *Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance;* Curr Top Microbiol Immunol, 2010, 345, s. 21-30.
64. Mayer A. i wsp., *Differential expression of HIF-1 in glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma;* Int J Oncol, 2012, 41(4), s. 1260-1270.
65. Kaynar M. Y. i wsp., *Expression of hypoxia inducible factor-1α in tumors of patients with glioblastoma multiforme and transitional meningioma;* J Clin Neurosci, 2008, 15(9), s. 1036-1042.
66. Joseph J. V. i wsp., *Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1alpha-ZEB1 axis;* Cancer Lett, 2015, 359(1), s. 107-116.
67. Gos M., Miloszewska J. i Przybyszewska M., *Rola przejścia epitelialno-mezenchymalnego w progresji nowotworu. [Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression]*. Postepy Biochem, 2009, 55(2), s. 121-128.
68. Jamieson D. i Vandenbrenk H. A., *Measurement of Oxygen Tensions in Cerebral Tissues of Rats Exposed to High Pressures of Oxygen;* J Appl Physiol, 1963, 18, s. 869-876.
69. Gill A. L. i Bell C. N., *Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes;* QJM, 2004, 97(7), s. 385-395.
70. Jain K. K., *Physical, Physiological, and Biochemical Aspects of Hyperbaric Oxygenation*, in *Textbook of Hyperbaric Medicine*. 2009, Hogrefe & Huber Publishers: Germany. s. 9-20.
71. Tibbles P. M. i Edelsberg J. S., *Hyperbaric-oxygen therapy;* N Engl J Med, 1996, 334(25), s. 1642-1648.
72. Chaves J. C. i wsp., *Hyperbaric oxygen therapy protects the liver from apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury in rats;* Microsurgery, 2009, 29(7), s. 578-583.
73. Ilhan H. i wsp., *Hyperbaric oxygen therapy alleviates oxidative stress and tissue injury in renal ischemia/reperfusion injury in rats;* Ren Fail, 2012, 34(10), s. 1305-1308.
74. Losada D. M. i wsp., *Effects of hyperbaric oxygen therapy as hepatic preconditioning in rats submitted to hepatic ischemia/reperfusion injury;* Acta Cir Bras, 2014, 29 Suppl 2, s. 61-66.
75. Murphy B. P., Harford F. J. i Cramer F. S., *Cerebral air embolism resulting from invasive medical procedures. Treatment with hyperbaric oxygen;* Ann Surg, 1985, 201(2), s. 242-245.

http://rcin.org.pl

76. Benson J., Adkinson C. i Collier R., *Hyperbaric oxygen therapy of iatrogenic cerebral arterial gas embolism;* Undersea Hyperb Med, 2003, 30(2), s. 117-126.
77. Raphael J. C. i wsp., *Trial of normobaric and hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide intoxication;* Lancet, 1989, 2(8660), s. 414-419.
78. Weaver L. K. i wsp., *Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning;* N Engl J Med, 2002, 347(14), s. 1057-1067.
79. Buckley N. A. i wsp., *Hyperbaric oxygen for carbon monoxide poisoning;* Cochrane Database Syst Rev, 2011(4), s. CD002041.
80. Pasquier D. i wsp., *Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of radio-induced lesions in normal tissues: a literature review;* Radiother Oncol, 2004, 72(1), s. 1-13.
81. Mayer R. i wsp., *Hyperbaric oxygen and radiotherapy;* Strahlenther Onkol, 2005, 181(2), s. 113-123.
82. Williamson R. A., *An experimental study of the use of hyperbaric oxygen to reduce the side effects of radiation treatment for malignant disease;* Int J Oral Maxillofac Surg, 2007, 36(6), s. 533-540.
83. Bennett M. H. i wsp., *Hyperbaric oxygen therapy for late radiation tissue injury;* Cochrane Database Syst Rev, 2012, 5, s. CD005005.
84. Stipp W., *Time to treatment for decompression illness;* Health and Safety Executive Books, 2007, RR550, s. 1-28.
85. Tompach P. C., Lew D. i Stoll J. L., *Cell response to hyperbaric oxygen treatment;* Int J Oral Maxillofac Surg, 1997, 26(2), s. 82-86.
86. Grundmann T., Jaehne M. i Fritze G., *[The value of hyperbaric oxygen therapy (HBO) in treatment of problem wounds in the area of plastic-reconstructive head and neck surgery];* Laryngorhinootologie, 2000, 79(5), s. 304-310.
87. Wu D. i wsp., *Effects of hyperbaric oxygen on proliferation and differentiation of osteoblasts from human alveolar bone;* Connect Tissue Res, 2007, 48(4), s. 206-213.
88. Grassmann J. P. i wsp., *Hyperbaric oxygen therapy improves angiogenesis and bone formation in critical sized diaphyseal defects;* J Orthop Res, 2015, 33(4), s. 513-520.
89. Mizuguchi T. i wsp., *Hyperbaric oxygen stimulates cell proliferation and normalizes multidrug resistance protein-2 protein localization in primary rat hepatocytes;* Wound Repair Regen, 2005, 13(6), s. 551-557.
90. Thews O. i Vaupel P., *Spatial oxygenation profiles in tumors during normo- and hyperbaric hyperoxia;* Strahlenther Onkol, 2015, 191(11), s. 875-882.
91. Al-Waili N. S. i wsp., *Hyperbaric oxygen and malignancies: a potential role in radiotherapy, chemotherapy, tumor surgery and phototherapy;* Med Sci Monit, 2005, 11(9), s. RA279-289.
92. Moen I. i Stuhr L. E., *Hyperbaric oxygen therapy and cancer--a review;* Target Oncol, 2012, 7(4), s. 233-242.
93. Mcmillan T. i wsp., *The effect of hyperbaric oxygen therapy of oral mucosal carcinoma;* Laryngoscope, 1989, 99(3), s. 241-244.
94. Doguchi H. i wsp., *The enhancing effects of hyperbaric oxygen on mouse skin carcinogenesis;* J Toxicol Pathol, 2014, 27(1), s. 67-72.
95. Braks J. A. i wsp., *Optical Imaging of Tumor Response to Hyperbaric Oxygen Treatment and Irradiation in an Orthotopic Mouse Model of Head*

http://rcin.org.pl

and Neck Squamous Cell Carcinoma; Mol Imaging Biol, 2015, 17(5), s. 633-642.

96. Feldmeier J. i wsp., *Hyperbaric oxygen: does it promote growth or recurrence of malignancy?;* Undersea Hyperb Med, 2003, 30(1), s. 1-18.
97. Carl U. M. i wsp., *Hyperbaric oxygen therapy for late sequelae in women receiving radiation after breast-conserving surgery;* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 49(4), s. 1029-1031.
98. Moen I. i wsp., *Hyperoxic treatment induces mesenchymal-to-epithelial transition in a rat adenocarcinoma model;* PLoS One, 2009, 4(7), s. e6381.
99. Brown J. M., *Tumor hypoxia in cancer therapy;* Methods Enzymol, 2007, 435, s. 297-321.
100. Halliwell B., *Free Radicals and other reactive species in Disease*, in *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001, Nature Publishing Group.
101. Bennett M. H. i wsp., *Hyperbaric oxygenation for tumour sensitisation to radiotherapy;* Cochrane Database Syst Rev, 2012, 4, s. CD005007.
102. Watson E. R. i wsp., *Hyperbaric oxygen and radiotherapy: a Medical Research Council trial in carcinoma of the cervix;* Br J Radiol, 1978, 51(611), s. 879-887.
103. Cade I. S. i Mcewen J. B., *Clinical trials of radiotherapy in hyperbaric oxygen at Portsmouth, 1964--1976;* Clin Radiol, 1978, 29(3), s. 333-338.
104. Henk J. M., *Late results of a trial of hyperbaric oxygen and radiotherapy in head and neck cancer: a rationale for hypoxic cell sensitizers?;* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1986, 12(8), s. 1339-1341.
105. Haffty B. G., Hurley R. i Peters L. J., *Radiation therapy with hyperbaric oxygen at 4 atmospheres pressure in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck: results of a randomized clinical trial;* Cancer J Sci Am, 1999, 5(6), s. 341-347.
106. Haffty B. G., Hurley R. A. i Peters L. G., *Carcinoma of the larynx treated with hypofractionated radiation and hyperbaric oxygen: long-term tumor control and complications;* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1999, 45(1), s. 13-20.
107. Sun T. B., Chen R. L. i Hsu Y. H., *The effect of hyperbaric oxygen on human oral cancer cells;* Undersea Hyperb Med, 2004, 31(2), s. 251-260.
108. Overgaard J., *Hypoxic modification of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck--a systematic review and meta-analysis;* Radiother Oncol, 2011, 100(1), s. 22-32.
109. Alagoz T. i wsp., *Evaluation of hyperbaric oxygen as a chemosensitizer in the treatment of epithelial ovarian cancer in xenografts in mice;* Cancer, 1995, 75(9), s. 2313-2322.
110. Selvendiran K. i wsp., *Oxygenation inhibits ovarian tumor growth by downregulating STAT3 and cyclin-D1 expressions;* Cancer Biol Ther, 2010, 10(4), s. 386-390.
111. Takiguchi N. i wsp., *Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs;* Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 47(1), s. 11-14.
112. Stuhr L. E. i wsp., *Hyperbaric oxygen alone or combined with 5-FU attenuates growth of DMBA-induced rat mammary tumors;* Cancer Lett, 2004, 210(1), s. 35-40.

http://rcin.org.pl

113. Moen I. i wsp., *Hyperoxia increases the uptake of 5-fluorouracil in mammary tumors independently of changes in interstitial fluid pressure and tumor stroma;* BMC Cancer, 2009, 9, s. 446.
114. Petre P. M. i wsp., *Hyperbaric oxygen as a chemotherapy adjuvant in the treatment of metastatic lung tumors in a rat model;* J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 125(1), s. 85-95.
115. Ohgami Y. i wsp., *Effect of hyperbaric oxygen on the anticancer effect of artemisinin on molt-4 human leukemia cells;* Anticancer Res, 2010, 30(11), s. 4467-4470.
116. Kawasoe Y. i wsp., *Hyperbaric oxygen as a chemotherapy adjuvant in the treatment of osteosarcoma;* Oncol Rep, 2009, 22(5), s. 1045-1050.
117. Ohguri T. i wsp., *Systemic chemotherapy using paclitaxel and carboplatin plus regional hyperthermia and hyperbaric oxygen treatment for non-small cell lung cancer with multiple pulmonary metastases: preliminary results;* Int J Hyperthermia, 2009, 25(2), s. 160-167.
118. Ohguri T. i wsp., *Efficacy of hyperbaric oxygen therapy combined with mild hyperthermia for improving the anti-tumour effects of carboplatin;* Int J Hyperthermia, 2015, 31(6), s. 643-648.
119. Kohshi K. i wsp., *Potential roles of hyperbaric oxygenation in the treatments of brain tumors;* Undersea Hyperb Med, 2013, 40(4), s. 351-362.
120. Potapov A. A. i wsp., *[Oxygenation of glioblastomas and normal brain tissue during radiation therapy];* Med Radiol (Mosk), 1983, 28(4), s. 21-24.
121. Wang Y. G. i wsp., *Hyperbaric oxygen promotes malignant glioma cell growth and inhibits cell apoptosis;* Oncol Lett, 2015, 10(1), s. 189-195.
122. Ding J. B. i wsp., *Effect of Hyperbaric Oxygen on the Growth of Intracranial Glioma in Rats;* Chin Med J (Engl), 2015, 128(23), s. 3197-3203.
123. Chang C. H., *Hyperbaric oxygen and radiation therapy in the management of glioblastoma;* Natl Cancer Inst Monogr, 1977, 46, s. 163-169.
124. Dowling S., Fischer J. J. i Rockwell S., *Fluosol and hyperbaric oxygen as an adjunct to radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: a pilot study;* Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol, 1992, 20(2-4), s. 903-905.
125. Kohshi K. i wsp., *Radiotherapy after hyperbaric oxygenation for malignant gliomas: a pilot study;* J Cancer Res Clin Oncol, 1996, 122(11), s. 676-678.
126. Kohshi K. i wsp., *Effects of radiotherapy after hyperbaric oxygenation on malignant gliomas;* Br J Cancer, 1999, 80(1-2), s. 236-241.
127. Chen J. R. i wsp., *Radiotherapy after hyperbaric oxygenation in malignant gliomas;* Curr Med Res Opin, 2015, 31(11), s. 1977-1984.
128. Kohshi K. i wsp., *Fractionated stereotactic radiotherapy using gamma unit after hyperbaric oxygenation on recurrent high-grade gliomas;* J Neurooncol, 2007, 82(3), s. 297-303.
129. Suzuki Y. i wsp., *Increased distribution of carboplatin, an anti-cancer agent, to rat brains with the aid of hyperbaric oxygenation;* Xenobiotica, 2008, 38(12), s. 1471-1475.
130. Suzuki Y. i wsp., *Pharmacokinetic investigation of increased efficacy against malignant gliomas of carboplatin combined with hyperbaric oxygenation;* Neurol Med Chir (Tokyo), 2009, 49(5), s. 193-197.
131. Dagistan Y. i wsp., *Combination hyperbaric oxygen and temozolomide therapy in C6 rat glioma model;* Acta Cir Bras, 2012, 27(6), s. 383-387.

http://rcin.org.pl

132. Lu X. Y. i wsp., *The synergistic therapeutic effect of temozolomide and hyperbaric oxygen on glioma U251 cell lines is accompanied by alterations in vascular endothelial growth factor and multidrug resistance-associated protein-1 levels;* J Int Med Res, 2012, 40(3), s. 995-1004.
133. Lu Z. i wsp., *Hyperbaric oxygen therapy sensitizes nimustine treatment for glioma in mice;* Cancer Med, 2016, 5(11), s. 3147-3155.
134. Beppu T. i wsp., *A phase II study of radiotherapy after hyperbaric oxygenation combined with interferon-beta and nimustine hydrochloride to treat supratentorial malignant gliomas;* J Neurooncol, 2003, 61(2), s. 161-170.
135. Ogawa K. i wsp., *Prospective trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with chemotherapy for high-grade gliomas;* Radiother Oncol, 2003, 67(1), s. 63-67.
136. Ogawa K. i wsp., *Phase II trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with chemotherapy for high-grade gliomas;* Br J Cancer, 2006, 95(7), s. 862-868.
137. Ogawa K. i wsp., *Phase II trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with multiagent chemotherapy (procarbazine, nimustine, and vincristine) for high-grade gliomas: long-term results;* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 82(2), s. 732-738.
138. Yahara K. i wsp., *Radiotherapy using IMRT boosts after hyperbaric oxygen therapy with chemotherapy for glioblastoma;* J Radiat Res, 2017, 58(3), s. 351-356.
139. Koronkiewicz M., Chilmonczyk Z. i Kazimierczuk Z., *Proapoptotic effects of novel pentabromobenzylisothioureas in human leukemia cell lines;* Med Chem Res, 2012, 21(10), s. 3111-3118.
140. Koronkiewicz M. i wsp., *Proapoptotic effects of new pentabromobenzylisothiouronium salts in a human prostate adenocarcinoma cell line;* Acta Pol Pharm, 2012, 69(6), s. 1325-1333.
141. Koronkiewicz M., Chilmonczyk Z. i Kazimierczuk Z., *Synergistic anti-leukemic effects of CK2 inhibitors and pentabromobenzylisothioureas in vitro;* Anticancer Res, 2013, 33(11), s. 4891-4899.
142. Garvey E. P. i wsp., *Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Inhibition by non-amino acid isothioureas;* J Biol Chem, 1994, 269(43), s. 26669-26676.
143. Castano T. i wsp., *Design, synthesis, and evaluation of potential inhibitors of nitric oxide synthase;* Bioorg Med Chem, 2008, 16(11), s. 6193-6206.
144. Kazimierczuk Z. i wsp., *Synthesis and antimicrobial and nitric oxide synthase inhibitory activities of novel isothiourea derivatives;* Arch Pharm Res, 2010, 33(6), s. 821-830.
145. Xu W. i wsp., *The role of nitric oxide in cancer;* Cell Res, 2002, 12(5-6), s. 311-320.
146. Ying L. i Hofseth L. J., *An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer;* Cancer Res, 2007, 67(4), s. 1407-1410.
147. Choudhari S. K. i wsp., *Nitric oxide and cancer: a review;* World J Surg Oncol, 2013, 11(118).
148. Vannini F., Kashfi K. i Nath N., *The dual role of iNOS in cancer;* Redox Biol, 2015, 6, s. 334-343.

http://rcin.org.pl

149. Sharma S. i wsp., *Differential activity of NO synthase inhibitors as chemopreventive agents in a primary rat tracheal epithelial cell transformation system;* Neoplasia, 2002, 4(4), s. 332-336.
150. Matsuno K. i wsp., *S-benzylisothiourea derivatives as small-molecule inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase;* Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(17), s. 5126-5129.
151. Uyttenhove C. i wsp., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase;* Nat Med, 2003, 9(10), s. 1269-1274.
152. Takikawa O., *Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism;* Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(1), s. 12-19.
153. Moon Y. W. i wsp., *Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer;* J Immunother Cancer, 2015, 3, s. 51.
154. Brochez L., Chevolet I. i Kruse V., *The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy;* Eur J Cancer, 2017, 76, s. 167-182.
155. Gogte V. N. i wsp., *Synthesis of potential anticancer agents. I. Synthesis of substituted thiophenes;* Tetrahedron, 1967, 23(5), s. 2437-2441.
156. Gonzalez-Cadavid N. F. i Herrera Quijada F., *Inhibition of translation in liver polyribosomes by a new substituted thiopseudourea with antitumour action;* Biochem J, 1974, 138(2), s. 129-141.
157. Koronkiewicz M. i wsp., *New benzimidazole-derived isothioureas as potential antileukemic agents--studies in vitro;* Med Chem, 2015, 11(4), s. 364-372.
158. Kaminska B. i wsp., *Efficacy and mechanism of anti-tumor action of new potential CK2 inhibitors toward glioblastoma cells;* Int J Oncol, 2009, 35(5), s. 1091-1100.
159. Trembley J. H. i wsp., *Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology;* Cell Mol Life Sci, 2009, 66(11-12), s. 1858-1867.
160. Trembley J. H. i wsp., *Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy;* Biofactors, 2010, 36(3), s. 187-195.
161. Ortega C. E., Seidner Y. i Dominguez I., *Mining CK2 in cancer;* PLoS One, 2014, 9(12), s. e115609.
162. Rowse A. L. i wsp., *Protein kinase CK2 is important for the function of glioblastoma brain tumor initiating cells;* J Neurooncol, 2017, 132(2), s. 219-229.
163. Yefi R. i wsp., *Protein kinase CK2 promotes cancer cell viability via up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and enhanced prostaglandin E2 production;* J Cell Biochem, 2011, 112(11), s. 3167-3175.
164. Sundram V., Chauhan S. C. i Jaggi M., *Emerging roles of protein kinase D1 in cancer;* Mol Cancer Res, 2011, 9(8), s. 985-996.
165. Storz P., *Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D;* Trends Cell Biol, 2007, 17(1), s. 13-18.
166. Steinberg S. F., *Regulation of protein kinase D1 activity;* Mol Pharmacol, 2012, 81(3), s. 284-291.
167. Doppler H. i Storz P., *A novel tyrosine phosphorylation site in protein kinase D contributes to oxidative stress-mediated activation;* J Biol Chem, 2007, 282(44), s. 31873-31881.

http://rcin.org.pl

168. Storz P., Doppler H. i Toker A., *Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species;* Mol Cell Biol, 2005, 25(19), s. 8520-8530.
169. Hassan S. i wsp., *Heat shock protein 27 mediates repression of androgen receptor function by protein kinase D1 in prostate cancer cells;* Oncogene, 2009, 28(49), s. 4386-4396.
170. Durand N., Borges S. i Storz P., *Protein Kinase D Enzymes as Regulators of EMT and Cancer Cell Invasion;* J Clin Med, 2016, 5(2).
171. Bernhart E. i wsp., *Protein kinase D2 regulates migration and invasion of U87MG glioblastoma cells in vitro;* Exp Cell Res, 2013, 319(13), s. 2037-2048.
172. La Valle C. R. i wsp., *Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy;* Biochim Biophys Acta, 2010, 1806(2), s. 183-192.
173. Kim M. i wsp., *Epigenetic inactivation of protein kinase D1 in gastric cancer and its role in gastric cancer cell migration and invasion;* Carcinogenesis, 2008, 29(3), s. 629-637.
174. Eiseler T. i wsp., *Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion;* Breast Cancer Res, 2009, 11(1), s. R13.
175. Nickkholgh B. i wsp., *Beta-catenin represses protein kinase D1 gene expression by non-canonical pathway through MYC/MAX transcription complex in prostate cancer;* Oncotarget, 2017, 8(45), s. 78811-78824.
176. Azoitei N. i wsp., *Protein kinase D2 is a novel regulator of glioblastoma growth and tumor formation;* Neuro Oncol, 2011, 13(7), s. 710-724.
177. Azoitei N. i wsp., *Protein kinase D2 is a crucial regulator of tumour cell-endothelial cell communication in gastrointestinal tumours;* Gut, 2010, 59(10), s. 1316-1330.
178. Abe M. K. i wsp., *ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family;* J Biol Chem, 2002, 277(19), s. 16733-16743.
179. Xu Y. M. i wsp., *Extracellular signal-regulated kinase 8-mediated c-Jun phosphorylation increases tumorigenesis of human colon cancer;* Cancer Res, 2010, 70(8), s. 3218-3227.
180. Jin D. H., Park J. i Kim D. H., *MAPK15 is an attractive therapeutic target for gastric cancer;* Cancer Cell & Microenvironment, 2015, 2: e1006.
181. Chia J. i wsp., *ERK8 is a negative regulator of O-GalNAc glycosylation and cell migration;* Elife, 2014, 3, s. e01828.
182. Strambi A. i wsp., *Structure prediction and validation of the ERK8 kinase domain;* PLoS One, 2013, 8(1), s. e52011.
183. Xia J. i wsp., *Role of NEK2A in human cancer and its therapeutic potentials;* Biomed Res Int, 2015, 2015.
184. Fang Y. i Zhang X., *Targeting NEK2 as a promising therapeutic approach for cancer treatment;* Cell Cycle, 2016, 15(7), s. 895-907.
185. Wang S. i wsp., *Nek2A contributes to tumorigenic growth and possibly functions as potential therapeutic target for human breast cancer;* J Cell Biochem, 2012, 113(6), s. 1904-1914.
186. Cappello P. i wsp., *Role of Nek2 on centrosome duplication and aneuploidy in breast cancer cells;* Oncogene, 2014, 33(18), s. 2375-2384.
187. Zhou W. i wsp., *NEK2 induces drug resistance mainly through activation of efflux drug pumps and is associated with poor prognosis in myeloma and other cancers;* Cancer Cell, 2013, 23(1), s. 48-62.

http://rcin.org.pl

188. Tursynbay Y. i wsp., *Pim-1 kinase as cancer drug target: An update;* Biomed Rep, 2016, 4(2), s. 140-146.
189. Zhao W. i wsp., *PIM1: a promising target in patients with triple-negative breast cancer;* Med Oncol, 2017, 34(8), s. 142.
190. Braso-Maristany F. i wsp., *PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response in triple-negative breast cancer;* Nat Med, 2016, 22(11), s. 1303-1313.
191. Mukaida N., Wang Y. Y. i Li Y. Y., *Roles of Pim-3, a novel survival kinase, in tumorigenesis;* Cancer Sci, 2011, 102(8), s. 1437-1442.
192. Zhang F. i wsp., *A novel regulatory mechanism of Pim-3 kinase stability and its involvement in pancreatic cancer progression;* Mol Cancer Res, 2013, 11(12), s. 1508-1520.
193. Liu B. i wsp., *Pim-3 promotes human pancreatic cancer growth by regulating tumor vasculogenesis;* Oncol Rep, 2014, 31(6), s. 2625-2634.
194. Zhuang H. i wsp., *Aberrant expression of Pim-3 promotes proliferation and migration of ovarian cancer cells;* Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(8), s. 3325-3331.
195. Li T. i wsp., *Pim-3 Regulates Stemness of Pancreatic Cancer Cells via Activating STAT3 Signaling Pathway;* J Cancer, 2017, 8(9), s. 1530-1541.
196. Arcaro A., *Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer;* Front Pharmacol, 2013, 4, s. 30.
197. Denduluri S. K. i wsp., *Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance;* Genes Dis, 2015, 2(1), s. 13-25.
198. Baserga R., Peruzzi F. i Reiss K., *The IGF-1 receptor in cancer biology;* Int J Cancer, 2003, 107(6), s. 873-877.
199. Bielen A. i wsp., *Enhanced efficacy of IGF1R inhibition in pediatric glioblastoma by combinatorial targeting of PDGFRalpha/beta;* Mol Cancer Ther, 2011, 10(8), s. 1407-1418.
200. Sun Y., Sun X. i Shen B., *Molecular Imaging of IGF-1R in Cancer;* Mol Imaging, 2017, 16, s. 1-7.
201. Ekyalongo R. C. i Yee D., *Revisiting the IGF-1R as a breast cancer target;* NPJ Precis Oncol, 2017, 1.
202. Ulanet D. B. i wsp., *Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to IGF-1R targeted therapy;* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(24), s. 10791-10798.
203. Vigneri R., Goldfine I. D. i Frittitta L., *Insulin, insulin receptors, and cancer;* J Endocrinol Invest, 2016, 39(12), s. 1365-1376.
204. Zhang H. i wsp., *Inhibition of cancer cell proliferation and metastasis by insulin receptor downregulation;* Oncogene, 2010, 29(17), s. 2517-2527.
205. Pucko E. i wsp., *Potent Antitumour Effects of Novel Pentabromobenzylisothioureas Studied on Human Glial-derived Tumour Cell Lines;* Anticancer Res, 2018, 38(5), s. 2691-2705.
206. Lesniak M. S., *Novel advances in drug delivery to brain cancer;* Technol Cancer Res Treat, 2005, 4(4), s. 417-428.
207. Jahangiri A. i wsp., *Convection-enhanced delivery in glioblastoma: a review of preclinical and clinical studies;* J Neurosurg, 2017, 126(1), s. 191-200.
208. Louis N. i wsp., *New therapeutic approaches for brainstem tumors: a comparison of delivery routes using nanoliposomal irinotecan in an animal model;* J Neurooncol, 2018, 136(3), s. 475-484.

http://rcin.org.pl

209. Jain A. i wsp., *Ultrasound-based triggered drug delivery to tumors;* Drug Deliv Transl Res, 2018, 8(1), s. 150-164.
210. Lam F. C. i wsp., *Enhanced efficacy of combined temozolomide and bromodomain inhibitor therapy for gliomas using targeted nanoparticles;* Nat Commun, 2018, 9(1).
211. Liang B. C., *Effects of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human glioma cell lines;* J Neurooncol, 1996, 29(2), s. 149-155.
212. Papandreou I. i wsp., *Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment;* Cancer Res, 2005, 65(8), s. 3171-3178.
213. Osawa T. i wsp., *Human glioblastoma cells exposed to long-term hypoxia and nutrient starvation stimulated induction of secondary T-cell leukemia in mice;* Blood Cancer J, 2011, 1(2), s. e6.
214. Riffle S. i wsp., *Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids;* BMC Cancer, 2017, 17(338).
215. Yi T. i wsp., *Hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) promotes cap-dependent translation of selective mRNAs through up-regulating initiation factor eIF4E1 in breast cancer cells under hypoxia conditions;* J Biol Chem, 2013, 288(26), s. 18732-18742.
216. Mamede A. C. i wsp., *Beyond the limits of oxygen: effects of hypoxia in a hormone-independent prostate cancer cell line;* ISRN Oncol, 2013, 2013, s. 918207.
217. Qian J. i wsp., *Propofol Reversed Hypoxia-Induced Docetaxel Resistance in Prostate Cancer Cells by Preventing Epithelial-Mesenchymal Transition by Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor 1alpha;* Biomed Res Int, 2018, 2018.
218. Yao K. i wsp., *In vitro hypoxia-conditioned colon cancer cell lines derived from HCT116 and HT29 exhibit altered apoptosis susceptibility and a more angiogenic profile in vivo;* Br J Cancer, 2005, 93(12), s. 1356-1363.
219. Strese S. i wsp., *Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity;* BMC Cancer, 2013, 13(331).
220. Li Q., Lin Q. i Yun Z., *Hypoxia-activated cytotoxicity of benznidazole against clonogenic tumor cells;* Cancer Biol Ther, 2016, 17(12), s. 1266-1273.
221. Tang H. i wsp., *Effects of hyperbaric oxygen therapy on tumor growth in murine model of PC-3 prostate cancer cell line;* Urology, 2009, 73(1), s. 205-208.
222. Granowitz E. V. i wsp., *Hyperbaric oxygen inhibits benign and malignant human mammary epithelial cell proliferation;* Anticancer Res, 2005, 25(6B), s. 3833-3842.
223. Zhou W. i wsp., *Assessment of hypoxia inducible factor levels in cancer cell lines upon hypoxic induction using a novel reporter construct;* PLoS One, 2011, 6(11), s. e27460.
224. Jones R. B. i wsp., *The ST6Gal-I sialyltransferase protects tumor cells against hypoxia by enhancing HIF-1alpha signaling;* J Biol Chem, 2018.
225. Liu L. i wsp., *Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer;* Cancer Sci, 2008, 99(1), s. 121-128.
226. Wartenberg M. i wsp., *Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species;* FASEB J, 2003, 17(3), s. 503-505.

http://rcin.org.pl

227. Rapisarda A. i wsp., *Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway;* Cancer Res, 2002, 62(15), s. 4316-4324.
228. Kummar S. i wsp., *Multihistology, target-driven pilot trial of oral topotecan as an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha in advanced solid tumors;* Clin Cancer Res, 2011, 17(15), s. 5123-5131.
229. Zhou Y. i wsp., *Hyperbaric oxygen intervention on expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in spinal cord injury models in rats;* Chin Med J (Engl), 2013, 126(20), s. 3897-3903.
230. Sun L., Marti H. H. i Veltkamp R., *Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in focal cerebral ischemia;* Stroke, 2008, 39(3), s. 1000-1006.
231. Bai X. i wsp., *Down-regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by hyperbaric oxygen attenuates the severity of acute pancreatitis in rats;* Pancreas, 2009, 38(5), s. 515-522.
232. Sunkari V. G. i wsp., *Hyperbaric oxygen therapy activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which contributes to improved wound healing in diabetic mice;* Wound Repair Regen, 2015, 23(1), s. 98-103.
233. Ren P. i wsp., *Hyperbaric oxygen preconditioning promotes angiogenesis in rat liver after partial hepatectomy;* Life Sci, 2008, 83(7-8), s. 236-41.
234. Terraneo L. i wsp., *In vivo hyperoxia induces hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression in LNCaP tumors without affecting the tumor growth rate;* Int J Biochem Cell Biol, 2014, 51, s. 65-74.
235. Son J. H. i wsp., *Melatonin promotes osteoblast differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells under hypoxic conditions through activation of PKD/p38 pathways;* J Pineal Res, 2014, 57(4), s. 385-392.
236. Ha W. H. i wsp., *Recombinant human bone morphogenic protein-2 Induces the Differentiation and Mineralization of Osteoblastic Cells Under Hypoxic Conditions via Activation of Protein Kinase D and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways;* Tissue Eng Regen Med., 2017, 14(4), s. 433-441.
237. Fleegal M. A. i wsp., *Activation of PKC modulates blood-brain barrier endothelial cell permeability changes induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation;* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289(5), s. H2012-H2019.
238. Gozal E. i wsp., *Protein kinase C modulation of ventilatory response to hypoxia in nucleus tractus solitarii of conscious rats;* J Appl Physiol (1985), 1998, 84(6), s. 1982-1990.
239. Asaithambi A. i wsp., *Protein kinase D1 (PKD1) phosphorylation promotes dopaminergic neuronal survival during 6-OHDA-induced oxidative stress;* PLoS One, 2014, 9(5), s. e96947.

http://rcin.org.pl