

Streszczenie w języku polskim

Nowotwór jajnika charakteryzuje się najwyższą śmiertelnością spośród wszystkich nowotworów ginekologicznych. Tak złe statystyki związane są z trudnościami z postawieniem prawidłowej diagnozy oraz częstym rozwojem lekooporności. Czynniki te sprawiają, że choroba wykrywana jest najczęściej w III i IV stopniu zaawansowania, kiedy występują już przerzuty do innych narządów, a dostępne obecnie metody leczenia są nieskuteczne. Z tego względu poszukiwanie nowych i efektywniejszych metod terapeutycznych jest wyzwaniem dla współczesnej onkologii.

W niniejszej rozprawie doktorskiej oceniano skuteczność kombinacji WP 631 i epotilonu B (Epo B) w komórkach SKOV-3. WP 631 jest bisantracykliną złożoną z dwóch cząsteczek daunorubicyny połączonych łącznikiem p-ksylenowym, wykazującą plejotropowy mechanizm działania, obejmujący przede wszystkim interkalację do DNA. Jej efektywność w komórkach raka jajnika jest dobrze udokumentowana. Epo B z kolei wykazuje działanie zbliżone do taksanów: stabilizuje mikrotubule i hamuje ich depolimeryzację. Wykazano, że w komórkach raka jajnika epotilony przejawiają wyższą aktywność niż paklitaksel, najczęściej stosowany przedstawiciel taksanów.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było stwierdzenie, czy WP 631 i Epo B, zastosowane łącznie, będą działały skuteczniej niż w przypadku ich pojedynczego podania w komórkach raka jajnika SKOV-3, oraz poznanie molekularnego mechanizmu skojarzonego działania związków. Badania te podjęto w oparciu o dane literaturowe, wskazujące na znaczną przewagę terapii skojarzonej nad monoterapią w leczeniu nowotworu jajnika.

Wykazano, że WP 631 i Epo B działają synergistycznie w komórkach raka jajnika, a najbardziej optymalnym połączeniem jest to, w którym stosunek bisantracykliny do Epo B wynosi 1 : 1. Tę kombinację związków stosowano w kolejnych eksperymentach, w których oceniano jej właściwości proapoptotyczne, prooksydacyjne i genotoksyczne. Stwierdzono, że kombinacja WP 631 i Epo B, w większym stopniu niż związki stosowane pojedynczo, indukuje apoptozę w komórkach SKOV-3. Na podstawie analizy aktywności kaspaz -9, -8 oraz -3 wykazano, że połączone działanie związków aktywuje zarówno mitochondrialną, jak i receptorową ścieżkę programowanej śmierci komórki. Udowodniono też, że kombinacja przejawia silne działanie prooksydacyjne, a reaktywne formy tlenu zaangażowane są w jej mechanizm działania. WP 631 i Epo B stosowane w połączeniu generowały również uszkodzenia DNA, znacznie silniejsze niż w przypadku działania związków pojedynczych. Co istotne, genotoksyczne działanie kombinacji okazało się w minimalnym stopniu

odwracalne. Uszkodzenia materiału genetycznego powstałe w wyniku działania samego WP 631 czy Epo B były mniej trwałe. Przedstawione wyniki dowodzą, że kombinacja WP 631 i Epo B wykazuje w komórkach SKOV-3 wyższą efektywność niż związki stosowane pojedynczo.

W celu poznania molekularnego mechanizmu skojarzonego działania związków przeanalizowano ich wpływ na cykl komórkowy oraz regulujące go białka. Wykazano, że WP 631 nie powoduje zmian w rozkładzie faz cyklu, Epo B działa proapoptotycznie oraz zatrzymuje cykl w fazie G2/M, natomiast kombinacja związków prowadzi do poślizgu mitotycznego, czyli wyjścia komórek z bloku G2/M, oraz ich śmierci na drodze apoptozy. Zahamowanie aktywności białek regulujących cykl komórkowy: cykliny B, cyklinozależnej kinazy 1 (CDK1), EpCAM i HMGB1 za pomocą specyficznych inhibitorów pozwoliło ustalić, że białka HMGB1 i EpCAM nie są zaangażowane w mechanizm działania żadnego ze związków, a kompleks cykliny B/ cyklinozależna kinaza 1 pośredniczy w mechanizmie działania Epo B. Na podstawie analizy PCR stwierdzono ponadto, że kombinacja związków istotnie wpływała także na poziom ekspresji mRNA kodujących analizowane białka. Pod wpływem jej działania ekspresja mRNA kodujących cyklinę B i CDK1 istotnie spadła, co stanowi dowód na wystąpienie poślizgu mitotycznego. Kombinacja związków, w odróżnieniu od WP 631 i Epo B stosowanych pojedynczo, obniżała także ekspresję mRNA kodujących dwie pozostałe proteiny: EpCAM i HMGB1. Są one czynnikami prognostycznymi, których wysoka ekspresja koreluje ze stopniem zaawansowania choroby i złymi rokowaniami. Dlatego też obniżanie ich ekspresji może się przełożyć na lepsze rezultaty terapii.

Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że WP 631 i Epo B działają synergistycznie w komórkach SKOV-3, a najefektywniejszym połączeniem jest to, w którym stosunek WP 631 do Epo B wynosi 1 : 1. Wy tłumaczeniem wyższego potencjału kombinacji związków jest jej wpływ na białka EpCAM i HMGB1, które pośredniczą w mechanizmie skojarzonego działania WP 631 i Epo B.

Barbara Bukowska

Streszczenie w języku angielskim

Ovarian melanoma is characterized by the highest mortality rate among all gynaecological cancers. The poor mortality statistics are the result of difficulties in making a correct diagnosis and the frequent development of drug resistance. Because of these factors, the disease is most commonly diagnosed at stage III or IV, when the cancer has already spread beyond the ovary, and the methods of treatment that are currently available are ineffective. For this reason, searching for new and more efficient therapeutic approaches is a challenge for modern oncology.

In this doctoral thesis, the effectiveness of the combination of WP 631 and epothilone B (Epo B) in the SKOV-3 cell line was evaluated. WP 631 is a bisanthracycline composed of two molecules of daunorubicin linked with a p-xylene linker. Like other anthracyclines, it exhibits a pleiotropic mechanism of action with the most important part being its intercalation with DNA. The effectiveness of WP 631 in ovarian cancer cells is well established. In turn, Epo B manifests a mechanism of action which is similar to that of taxanes: it stabilizes microtubules and prevents their depolymerization. It was demonstrated that, in ovarian cancer cells, epothilones have a higher activity than paclitaxel: the most commonly used taxane.

The aim of my dissertation was to establish if WP 631 and Epo B, when used in combination, act more effectively than if applied separately in the SKOV-3 cell line. I also sought to discover the molecular mechanism of the combined action of the tested drugs. The study was carried out based on data in the literature, which indicates that combined therapy has a strong advantage when compared with monotherapy in the treatment of ovarian cancer.

It was demonstrated that WP 631 and Epo B act synergistically in ovarian cancer cells and that the most potent combination is that of bisanthracycline and Epo B in a molar ratio of 1:1. This combination was chosen for further studies, in which its proapoptotic, prooxidative and genotoxic properties were evaluated. Compared with individual drugs, the combination significantly enhanced apoptosis in SKOV-3 cells. Based on the activity of caspase-9, caspase-8, and caspase-3 it was noted that both pathways of apoptosis – extrinsic and intrinsic – formed part of the proposed treatment. It was documented that the combination exerted prooxidative effects and that reactive oxygen species were involved in its mechanism of action. When used together, WP 631 and Epo B also generated much greater damage to DNA than in the case of individual compounds. What is extremely important is that the genotoxicity of the combination was only slightly reversible, while the damage to genetic material induced by WP 631 or Epo B alone was less lasting. These findings indicate that the combination of

WP 631 and Epo B manifests higher activity than individual drugs do in the SKOV-3 cell line.

In order to establish the molecular mechanism of action of the combination, we assessed its effects on the cell cycle and cell-cycle-regulating proteins. It was demonstrated that WP 631 did not affect the SKOV-3 cell cycle, Epo B acted proapoptically and caused significant G2/M arrest, and the combination led to mitotic slippage and then apoptosis. The inhibition of cell-cycle-regulating proteins (cyclin B, cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), EpCAM and HMGB1) by specific inhibitors allowed us to confirm that HMGB1 and EpCAM are not engaged in the mechanism of action of drugs either individually or combined, while Epo B acts via the cyclin B/CDK1 complex. Based on the PCR technique, it was also established that the combination significantly influenced the level of mRNA-encoding analysed proteins. The combined action of the drugs led to a marked drop in cyclin B and CDK1 mRNA expression, which constitutes proof of the occurrence of mitotic slippage. The drug combination, in contrast to WP 631 and Epo B applied separately, also decreased EpCAM and HMGB1 mRNA expression. Those two proteins serve as prognostic factors, whose overexpression relates to disease advancement and a poor outcome. Thus, their downregulation may contribute to improving therapy.

The experiments showed that WP 631 and Epo B act synergistically in the SKOV-3 cell line and the most active combination is that in which the molar ratio of WP 631 to Epo B is 1:1. The explanation for the greater potential of the drugs when combined is its impact on the EpCAM and HMGB1 proteins, which mediate the combined effects of WP 631 and Epo B.

Barbara Bukowska