

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii  
i Ochrony Środowiska, Instytut Biofizyki,  
Katedra Biofizyki Medycznej,  
ul. Pomorska 141/143, 90-236, Łódź

dr Aneta Rogalska

AUTOREFERAT

(Załącznik nr 3a)

Tytuł osiągnięcia naukowego:

*Epotilony jako nowa klasa inhibitorów wrzeciona  
kariokinetycznego - molekularne mechanizmy działania  
i rola w chemioterapii*

Aneta Rogalska

---

## AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: **Aneta Katarzyna Rogalska**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**Doktor nauk biologicznych**

Dyscyplina: biofizyka

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, uchwała z dnia 24 lutego 2009 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Indukcja apoptozy przez akklarubicynę w nowotworowych komórkach A549, HepG2 i MCF-7”.

Promotor: prof. dr hab. Zofia Józwiak

---

**Magister biologii**

Specjalność: biochemia

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, 5 lipca 2004 r.

Tytuł rozprawy magisterskiej: „Mutacje genu *hMLH1* w raku sutka kobiet”.Promotor: prof. dr hab. Wanda Małgorzata Krajewska

---

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

**Adiunkt (2009 – obecnie)** Katedra Biofizyki Medycznej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź**Asystent (2007 – 2009)** Katedra Termobiologii (obecnie Katedra Biofizyki Medycznej), Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź**Asystent** (1-04-2007 do 30-06-2007) Zakład Toksykologii i Kancerogenezy, Instytut Medycyny Pracy, Łódź**Doktorant (2004 – 2009)** Uczestnik Studium Doktoranckiego Cytogenetyki, Genetyki Molekularnej i Radiobiologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

---

**Urlopy macierzyńskie:**

2010 r. -5 miesięcy

2014 r. -12 miesięcy

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

IA) tytuł osiągnięcia naukowego

**Epotilony jako nowa klasa inhibitorów wrzeciona kariokinetycznego - molekularne mechanizmy działania i rola w chemioterapii**

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i kopie publikacji wnioskodawcy zawarte są w Załączniku 5 (oświadczenia współautorów) i 6 (katalog z kopiami publikacji).

IB) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW (Liczba cytowań)
<i>prace oryginalne</i>			
I-B1.	Rogalska A., Marczak A., Gajek A., Szwed M., Śliwińska A., Drzewoski J., Józwiak Z. <a href="#">Induction of apoptosis in human ovarian cancer cells by new anticancer compounds, epothilone A and B.</a> <i>Toxicology in Vitro</i> <b>2013</b> : 27, 239-249.	3,207 <sup>2013</sup>	25 <sup>2013</sup> (cyt.17)
I-B2.	Rogalska A., Szula E., Gajek A., Marczak A., Józwiak Z. <a href="#">Activation of apoptotic pathway in normal and cancer ovarian cells by Epothilone B.</a> <i>Environmental Toxicology and Pharmacology</i> <b>2013</b> : 36, 600-610.	1,862 <sup>2013</sup>	20 <sup>2013</sup> (cyt. 6)
I-B3.	Rogalska A., Gajek A., Marczak A. <a href="#">Analysis of Epothilone B – induced cell death in normal ovarian cells.</a> <i>Cell Biology International</i> <b>2013</b> : 37, 1330-1339.	1,635 <sup>2013</sup>	15 <sup>2013</sup> (cyt. 0)
I-B4.	Rogalska A., Gajek A., Marczak A. <a href="#">Epothilone B induce extrinsic pathway of apoptosis and mitochondrial dysfunction in human SKOV-3 ovarian cancer cells.</a> <i>Toxicology in Vitro</i> <b>2014</b> : 28, 675-683.	2,903 <sup>2014</sup>	30 <sup>2014</sup> (cyt. 6)

I-B5.	<b>Rogalska A.</b> , Bukowska B., Marczak A. Caspases and ROS - dependent mechanism of action mediated by combination of WP 631 and Etoposide B. <i>Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry</i> <b>2014</b> : 14, 1261-1270.	2,469 <sup>2014</sup>	35 <sup>2014</sup> (cyt. 0)
I-B6.	<b>Rogalska A.</b> , Marczak A. Etoposide B induces human ovarian cancer OV-90 cell apoptosis via external pathway. <i>Environmental Toxicology and Pharmacology</i> <b>2015</b> : 40, 700-712.	2,187 <sup>2015</sup>	25 <sup>2015</sup> (cyt. 6)
I-B7.	<b>Rogalska A.</b> , Marczak A. Nuclear DNA damage and repair in normal ovarian cells caused by Etoposide B. <i>Asian Pacific Journal of Cancer Prevention</i> <b>2015</b> : 16, 6535-6539.	2,39 <sup>2015</sup>	20 <sup>2015</sup> (cyt. 0)
I-B8.	<b>Rogalska A.</b> , Bukowska B, Marczak A. Metformin and etoposide A treatment up regulate pro-apoptotic PARP-1, Casp-3 and H2AX genes and decrease of AKT kinase level to control cell death of human hepatocellular carcinoma and ovary adenocarcinoma cells. <i>Toxicology In Vitro</i> <b>2017</b> :47, 48-62.	2,866 <sup>2017</sup>	30 <sup>2017</sup> (cyt. 0)

#### prace przeglądowe

I-B9.	<b>Rogalska A.</b> , Marczak A., Therapeutic potential of paclitaxel in epithelial ovarian cancer and future directions <i>Life Science</i> <b>2018</b> : 205,38-44.	2,936 <sup>2018</sup>	25 <sup>2016</sup> (cyt. 0)
-------	--	-----------------------	--------------------------------

Sumaryczny Impact Factor publikacji\* wynosi **IF= 22,455 (9 prac)**. Sumaryczna liczba punktów

MNiSW dla wszystkich publikacji wchodzących w skład osiągnięcia\* naukowego wynosi **225**.

**C) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

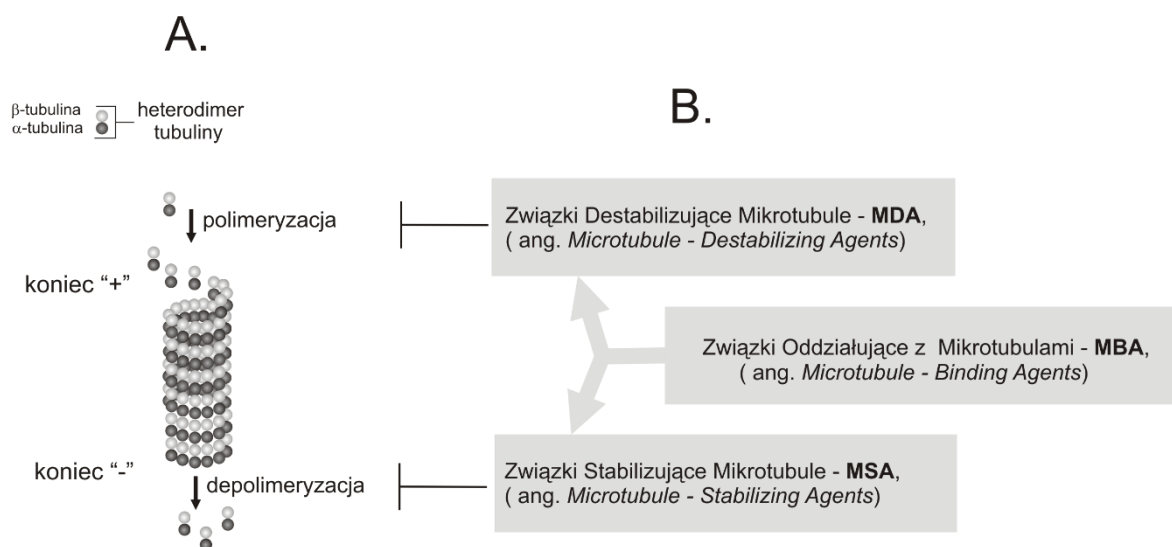
#### WPROWADZENIE:

Przedmiotem badań w niniejszym osiągnięciu naukowym są związki oddziałujące z mikrotubulami (MBD, ang. *Microtubule-Binding Agents*). Należą do nich inhibitory tworzenia dimerów heterotubuliny, tzw. związki destabilizujące mikrotubule (MDA, ang. *Microtubule-Destabilizing Agents*) oraz związki hamujące depolimeryzację mikrotubul (MSA, ang. *Microtubule-Stabilizing Agents*), Ryc.1.

\* Według roku publikacji

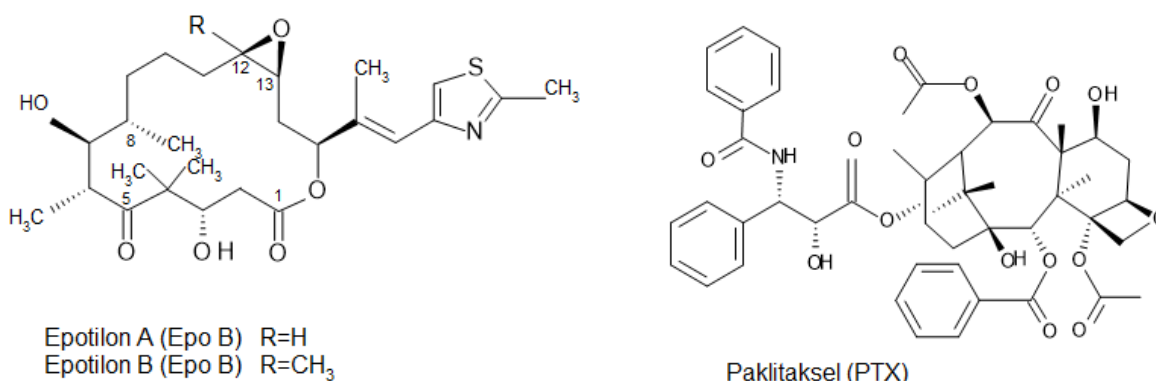
MSA są stosowane zarówno w terapii białaczek, jak i guzów litych. Związki te prowadzą do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M i w efekcie do śmierci komórki na drodze apoptozy. MSA wiążą się preferencyjnie do N-końca, a także do aminokwasów w pozycji 217–231  $\beta$ -tubuliny (Kingston, 2009; Wilmes i wsp., 2011). Badania przedkliniczne i kliniczne dowiodły, że związki wiążące mikrotubule hamują proces angiogenezy, w tym migrację i adhezję komórek śródbłonna, a także przekazywanie sygnałów w komórkach (Jin i Patterson, 2009).

Do grupy inhibitorów depolimeryzacji mikrotubul należą taksany, w tym stosowany w klinikach paklitaksel (PTX). Taksany prowadziły do rozwoju oporności wielolekowej. Poszukiwano zatem nowych, bardziej skutecznych związków. Dlatego też przedmiotem moich zainteresowań stała się nowa generacja inhibitorów depolimeryzacji mikrotubul - epotilony. Odkryto je w latach 90-tych podczas fermentacji bakterii glebowych w Afryce (Zambesi River). Zostały one wyizolowane z miksobakterii *Sorangium cellulosum* i początkowo zakwalifikowano je jako substancje o działaniu przeciwgrzybiczym (Reichenbach i Hofle, 2008). Okazały się jednak zbyt toksyczne, by mogły być wykorzystane jako środki przeciwgrzybicze, natomiast znalazły zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.



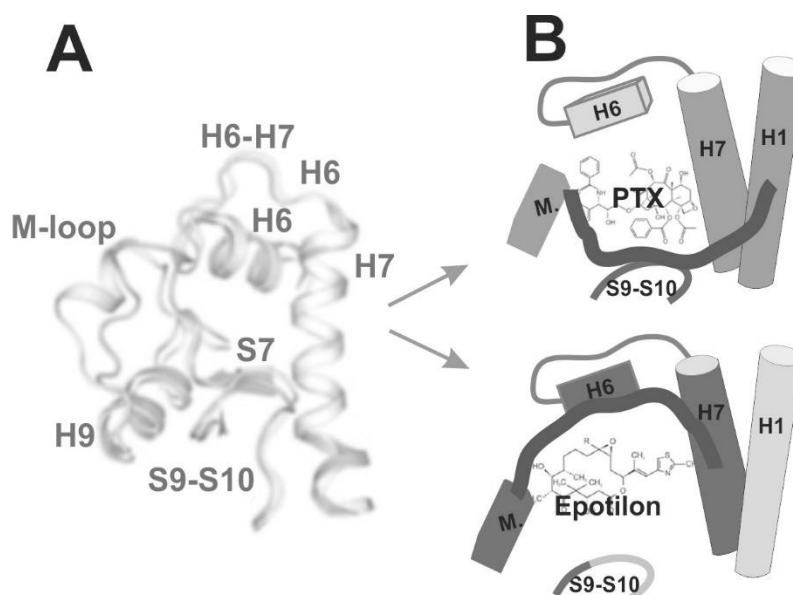
**Ryc. 1.** Procesy polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul (A) oraz podział związków oddziałujących z mikrotubulami (B), na podstawie II-A26.

Do jednych z najważniejszych spośród 37 wyizolowanych związków z tej grupy należą epotilon A (Epo A) i epotilon B (Epo B, patupilone, EPO906) (Ranade i wsp., 2016), Ryc.2.



**Ryc.2.** Struktura chemiczna Epo A, Epo B i PTX, na podstawie I-B9, II-A13.

Epotilony są makrolidami zbudowanymi z 16-członowego pierścienia. Epo A i Epo B są jedynymi w tej grupie związkami pochodzenia naturalnego. Zasadnicza różnica między nimi polega na tym, że Epo B ma dodatkową grupę metylową w pozycji C12 dzięki czemu silniej stabilizuje on mikrotubule (I-B1) (Zhao i wsp., 2009). Epotilony wiążą się do podobnego farmakoforu na podjednostce  $\beta$  tubuliny co taksany. Pętla M, zarówno  $\alpha$  i  $\beta$  tubuliny, jest głównym miejscem kontaktu pomiędzy protofilamentami mikrotubul (Prota i wsp., 2013), Ryc.3.



**Ryc. 3.** Wiązanie się epotilonów i taksanów z mikrotubulami. A) Konformacja pętli M  $\beta$ -tubuliny, B) Schematyczne przedstawienie drugorzędowych elementów struktury, protofilamenty  $\beta$  tubuliny łączącej się z epotilonem A / B lub PTX. Związki stabilizujące mikrotubule łączą helisy  $\beta$  tubulinowe H6 lub H7 i pętlę S9-S10 z pętlą M, na podstawie (Prota i wsp., 2013).

Epo B kompetycyjnie hamuje wiązanie PTX do mikrotubul (Fojo i Menefee, 2007). Kilka z pochodnych epotilonów jest na etapie badań klinicznych w tym iksabepilon (BMS 247550) i sagopilon (ZK-EPO) (Edelman i Shvartsbeyn, 2012). Jedynym epotilonem, który został zarejestrowany w Stanach Zjednoczonych (2007 r.), jest iksabepilon. W Polsce nie został

on dotychczas wprowadzony jako lek, z uwagi na duże ryzyko rozwoju neuropatii. Podobnie jak stosowane od kilkunastu już lat w terapii raka piersi taksany (paklitaksel i docetaksel), epotilony indukują agregację tubuliny i powodują zatrzymanie mitozy oraz zapobiegają depolimeryzacji mikrotubul. Epotilony mają jednak znaczącą przewagę nad taksanami. Są skuteczne także w komórkach opornych na taksany i potencjalnie mogłyby zastąpić je w terapii przeciwnowotworowej.

Epotilony okazały się być cytotoksyczne dla szerokiego spektrum nowotworów. Pomimo prowadzonych badań klinicznych nadal nie zatwierdzono epotilonów jako leków w terapii raka jajnika czy wątroby.

### **MATERIAŁ BIOLOGICZNY**

Materiałem wykorzystanym do przeprowadzenia badań zawartych w poniższym osiągnięciu naukowym były trzy linie komórkowe, w tym dwie ludzkie nowotworowe linie raka jajnika: OV-90 (ang. *Human ovarian papillary serous adenocarcinoma*), SKOV-3 (ang. *Human ovarian adenocarcinoma*) i jedna prawidłowa mysia linia jajnika: MM14.Ov (ang. *mouse normal ovarian cell line*). Prowadziłam również badania na ludzkiej linii raka wątroby: HepG2 (ang. *Human hepatocellular liver carcinoma*). Linie te stanowiły dobry model do badania mechanizmów prowadzących do śmierci komórkowej dzięki znanej charakterystyce morfologicznej, immunohistochemicznej, cytogenetycznej oraz genetycznej (Hernandez i wsp., 2016; Jacob i wsp., 2014).

Rak jajnika charakteryzuje się najwyższą śmiertelnością spośród wszystkich nowotworów ginekologicznych. Tak wysoka śmiertelność związana jest z trudnościami w postawieniu prawidłowej diagnozy. Rak jajnika w początkowych stadiach daje niespecyficzne objawy. Większość przypadków diagnozowana jest w III i IV stadium zaawansowania klinicznego, kiedy nowotwór daje już przerzuty do innych narządów (Bruning i Mylonas, 2010; Pellicciotta i wsp., 2011), (I-B9). Obecnie standardowe leczenie raka jajnika polega na radykalnym usunięciu masy guza oraz tkanek mogących zawierać przerzuty. W sytuacji, gdy nowotwór jest wysoce zaawansowany, radykalne postępowanie chirurgiczne nie jest możliwe. Leczenie wówczas polega na zmniejszeniu masy guza, a następnie wdraża się leczenie adjuwantowe, głównie chemioterapię opartą na karboplatynie i taksanach (Willmott i Fruehauf, 2010). Leki te zwiększają przeżywalność pacjentek w IV stadium, aczkolwiek 5-letni wskaźnik przeżycia w zaawansowanym stadium raka jest nadal poniżej 30% (Davidson i Trope, 2014). Wysoka śmiertelność wśród pacjentek z rakiem jajnika wymusza potrzebę poszukiwania kolejnych skutecznych terapii. Badania profili ekspersji genów sugerują, że jednym z celów chemioterapii raka jajnika powinny być mikrotubule (Yu i wsp., 2016).

Równie złe rokowania dotyczą raka wątroby. Zgodnie ze statystykami Światowej Organizacji Zdrowia rak wątrobokomórkowy (HCC, ang. *hepatocellular carcinoma*) zajmuje drugie miejsce pod względem śmiertelności na świecie (Gong i Qin, 2016). Obecnie istnieje kilka opcji leczniczych: resekcja wątroby, metody ablacyjne, systemowa i regionalna chemioterapia, transplantacja wątroby, immunoterapia, terapia przeciwciałami monoklonalnymi. Chemioterapia nie przyniosła dotychczas przełomu w leczeniu chorych na raka wątrobokomórkowego. W ostatnim okresie nową nadzieję w leczeniu chorych na nieoperacyjnego raka wątrobokomórkowego wniósł preparat o nazwie sorafenib (Liu i wsp., 2015). Należy on do leków zaliczanych do terapii celowanych. Lek ten jest inhibitorem kinaz, a przez to doprowadza do zahamowania rozwoju HCC. W 2017 r. FDA zatwierdziło nivolumab (przeciwciało anty-PD-1, ang. *programmed cell death protein 1*) jako lek do stosowania w leczeniu HCC u pacjentów, którzy byli wcześniej leczeni sorafenibem (Sun i Cabrera, 2018). Przyczyną złych statystyk jest rozwój lekooporności. Mimo, że rak wątroby i jajnika dobrze odpowiadają na wstępną terapię, często, bo w blisko połowie przypadków, nawracają.

**Celem moich badań** było poznanie molekularnych mechanizmów działania Epo A i/lub Epo B oraz określenie typu śmierci komórkowej, zachodzącej pod wpływem działania badanych związków, w raku jajnika i wątroby. Wyniki badań były odnoszone do znanego leku - paklitakselu. Ponadto celem pracy była również ocena skuteczności stosowania dwóch związków, w tym jednego z grupy epotilonów, podawanych łącznie: WP 631 (antybiotyk antracyklinowy) i Epo B oraz metforminy (lek przeciwcukrzycowy) i Epo A.

Uzyskane rezultaty dotyczące poznania mechanizmu działania epotilonów mogą być pomocne w stworzeniu protokołu podawania leków u pacjentów z rakiem jajnika czy wątroby. Zastosowanie epotilonów w skojarzeniu z lekami należącymi do różnych grup jak antracykliny czy leki przeciwcukrzycowe rozszerza spektrum zastosowania tych związków. Znacznie obniżenie dawek leków, w przypadku ich jednoczesnego stosowania, być może pozwoli na zmniejszenie skutków ubocznych terapii.

Ważne dla mnie było ponadto poznanie mechanizmu skojarzonego działania tych związków. Cel ten realizowano poprzez określenie cytotoksyczności, genotoksyczności i zdolności do generowania reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Szczególną uwagę zwrócono na procesy apoptozy zachodzące w komórkach oraz przebieg cyklu komórkowego.

Pomiary wykonywałam mi.in. metodami: spektrofotometryczną, fluorescencyjną, cytometrii przepływową, Western-blot, wykonywałam testy immunofluorescencyjne, rozdziały elektroforetyczne białek (SDS-PAGE) i DNA w żelu agarozowym, PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR).



Badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego obejmowały następujące etapy:

**1. Etap pierwszy**

- 1.1. Oznaczenie cytotoksyczności epotilonu A i B w komórkach raka jajnika, rola glikoproteiny P**
- 1.2. Poznanie mechanizmu śmierci komórkowej wywoływanej przez epotilony w komórkach raka jajnika**
- 1.3. Poznanie mechanizmu śmierci komórkowej wywoływanej przez epotilony w komórkach prawidłowych jajnika**

**2. Etap drugi**

- 2.1. Poznanie molekularnego mechanizmu interakcji WP 631 i epotilonu B w komórkach raka jajnika**
- 2.2. Poznanie molekularnego mechanizmu interakcji metforminy i Epo A w komórkach raka jajnika i wątroby**

**1.1. Oznaczenie cytotoksyczności epotilonu A i B w komórkach raka jajnika, rola glikoproteiny P**

Pierwszym etapem badań było oznaczenie cytotoksyczności badanych związków metodą spektrofotometryczną. Analizując krzywe przeżywalności, zaobserwowałam we wszystkich badanych liniach komórkowych obniżenie przeżywalności komórek poddanych działaniu epotilonów wraz ze wzrostem stosowanych stężeń. Epotilony A i B wykazały wyższą toksyczność przeciwko komórkom linii SKOV-3 niż PTX. W komórkach tych Epo A był 6 razy bardziej (IC<sub>50</sub> - 27.4 nM), a Epo B był 5 razy bardziej cytotoksyczny (IC<sub>50</sub> - 27.5 nM) niż PTX (IC<sub>50</sub> - 126.2 nM) (I-B1). W kolejnej badanej linii nowotworowej jajnika OV-90, komórki były ponad 7 razy bardziej wrażliwe na Epo B (IC<sub>50</sub> - 27.4 nM) niż PTX (IC<sub>50</sub> - 199 nM) (I-B2).

Jedną z przyczyn niepowodzeń chemioterapii jest nabywanie przez komórki nowotworowe oporności na stosowane leki. W przypadku taksanów jest to oporność rozwijająca się w komórkach wykazujących nadekspresję  $\beta$ -tubuliny klasy III (TUBB3). Epotilony natomiast, najprawdopodobniej ze względu na ich zdolność do wiązania się w równym stopniu z  $\beta$ -tubuliną klasy I i III są skuteczne w tych komórkach, co daje im przewagę nad taksanami (Mozzetti i wsp., 2008), (I-B9, II-A28). Kolejną przyczyną oporności wielolekowej jest wzrost ekspresji genu *MDR-1* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 7. Moje badania wykazały, że PTX jest substratem dla glikoproteiny P (P-gp) w przeciwieństwie do epotilonu A i B (I-B1). Otrzymane wyniki pozwalają sugerować, że epotilony mogą być skuteczne także w komórkach opornych na taksany i mogą zastąpić je w terapii. Aktualnie rozważa się Epo B jako obiecującą alternatywę w leczeniu raka jajnika z silną

nadekspresją  $\beta$  tubuliny III i słabą odpowiedzią na standardową terapię taksan/cisplatyna (Albrethsen i wsp., 2014).

## **1.2. Poznanie mechanizmu śmierci komórkowej wywoływanej przez epotilony w komórkach raka jajnika**

Skuteczna terapia przeciwnowotworowa jest oparta na całkowitej eliminacji komórek ze zmienionym fenotypem. Apoptoza jest ważnym celem chemioterapii jako proces ściśle regulowany i kontrolowany przez swoiste procesy biochemiczne, wymagające ekspresji wielu różnych genów. Apoptoza bowiem, w przeciwieństwie do nekrozy, nie wywołuje reakcji zapalnej, a nawet poprzez adenozyne uruchamia reakcję przeciwzapalną w fagocytach (Haanen i Vermes, 1995; Yamaguchi i wsp., 2014). Na podstawie prowadzonych badań mogę stwierdzić, że epotilony indukują stres oksydacyjny, zaburzenia cyklu komórkowego, eksternalizację fosfatydyloseryny, wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, uwolnienie cytochromu c, zmiany potencjału błony mitochondrialnej, aktywację kaspaz, czy uszkodzenia DNA.

Badane epotilony prowadziły w komórkach raka jajnika do zmian w strukturze, rozmiarze i kształcie jądra komórkowego takich jak: kondensacja i marginalizacja chromatyny towarzyszące wczesnej apoptozie (2-4 godziny). Przy dłuższych czasach inkubacji (48-godzin) obserwowano fragmentację i kondensację chromatyny oraz powstawanie ciałek apoptotycznych. Dochodziło również do uszkodzenia błony komórkowej. Ilościowo obserwowane zmiany oceniono przez zastosowanie podwójnego barwienia z wykorzystaniem sond Hoechst 33258/jodek propidyny. Epotilony w porównaniu do taksanów generowały większą liczbę komórek apoptotycznych (I-B1, I-B2).

Generowanie reaktywnych form tlenu było jednym z najwcześniejszych efektów działania epotilonów, jak i PTX, w komórkach raka jajnika. W komórkach obu badanych linii raka jajnika Epo B prowadził do wzrostu poziomu ROS (ang. *reactive oxygen species*). Preinkubacja z N-acetylocysteiną obniżała cytotoksyczny wpływ epotilonów i PTX na badane linie komórkowe (I-B1, I-B2). ROS produkowane przez epotilony wywoływały również w komórkach raka jajnika uszkodzenia DNA prowadzące do zatrzymania cyklu komórkowego czy uruchomienia procesu apoptozy. Epo A w subtoksycznym stężeniu (10 nM) zwiększał liczbę komórek linii SKOV-3 w fazie sub-G1 cyklu komórkowego, aczkolwiek nie blokował cyklu w fazie G1 czy G2/M jak wskazują na to doniesienia literaturowe (I-B8). Drugi z badanych epotilonów, Epo B (10 nM), prowadził również do wzrostu liczby komórek w fazie sub-G1, a także do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Proces ten był zależny od czasu inkubacji. Zapobiegał tym samym ucieczce komórek nowotworowych spod kontroli białek regulujących cykl komórkowy (II-D41). Podobny mechanizm działania obserwowano dla Epo B w stężeniu 4 nM (Pellicciotta i wsp., 2013) w linii SKOV-3, w linii

Hey i liniach pierwotnych wyizolowanych od pacjentek z rakiem jajnika SS2, SS4 (50 nM) (Pellicciotta i wsp., 2013).

Kolejną charakterystyczną zmianą dla wczesnych etapów apoptozy jaką zaobserwowałam po działaniu epotilonów było zaburzenie asymetrii błony komórkowej jako wynik eksternalizacji fosfatydyloseryny (PS, ang. *phosphatidylserine externalization*). ATP-zależna flipaza jest odpowiedzialna za utrzymywanie PS w wewnętrznej dwuwarstwie błony komórkowej. Eksternalizacja PS, wynik działania skramblazy (aktywowana m.in. jonami wapnia), stanowi sygnał rozpoczynający proces apoptozy. Obecność PS w zewnętrznej monowarstwie błony komórkowej jest jednocześnie sygnałem dla makrofagów pozwalającym odróżnić komórki apoptotyczne od pozostałych (Borisenko i wsp., 2003). Proces eksternalizacji fosfatydyloseryny wywołany działaniem Epo B potwierdzono cytometrycznie poprzez zastosowanie podwójnego barwienia z aneksyną V (skoniugowaną w celu jej wizualizacji z izotiocyanianem fluoresceiny, FITC, ang. *Fluorescein isothiocyanate*) i jodkiem propidyny. Poziom komórek aneksyno-dodatnich był zależny od czasu inkubacji z Epo B i PTX w komórkach linii SKOV-3 i OV-90 (I-B1, I-B6).

Zaburzenia homeostazy jonów wapnia są kolejnym czynnikiem prowadzącym do procesu apoptozy. Zdolność mitochondriów do szybkiego przyjmowania jonów wapnia, w celu późniejszego uwolnienia, czyni je dobrymi buforami równowagi wapniowej. Wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia jonów wapnia na skutek działania leków powoduje zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej i niemożność utrzymania potencjału błony mitochondrialnej (Busselberg i Florea, 2017). Zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w wyniku działania epotilonów zależą od typu linii komórkowej. W komórkach raka jajnika linii OV-90 obserwowałam wzrost  $[Ca^{2+}]$  po działaniu PTX natomiast brak było istotnych zmian po działaniu Epo B, (I-B2). Giorgi i wsp. sugerują, że aby doszło do zainicjowania procesu apoptozy musi jednocześnie nastąpić aktywacja kilku czynników. Mitochondria działają jak detektory czasowych zmian w tym stężenia jonów wapnia czy poziomu ROS (Giorgi i wsp., 2012). Mimo, że Epo B tylko nieznacznie podwyższył wewnątrzkomórkowy poziom wapnia mogło to być stężenie wystarczające do zainicjowania apoptozy lub za inicjację apoptozy były odpowiedzialne wyłącznie ROS. Natomiast w linii SKOV-3 miał miejsce wzrost poziomu jonów wapnia po 24 godzinach inkubacji. W tym samym czasie PTX wywołał tylko 10% zmianę badanego parametru (I-B4).

Jednym z pierwszych symptomów mówiących o rozpoczęciu programowanej śmierci komórki jest także spadek potencjału błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ ). Epo A, Epo B i PTX wywoływały zmiany potencjału błony mitochondrialnej w linii SKOV-3 już po 24 godzinnej inkubacji, przy czym najwyższy spadek potencjału błony mitochondrialnej miał miejsce po działaniu Epo B (I-B1). Zaobserwowano również statystycznie istotne różnice między działaniem obu epotilonów. W linii OV-90,  $\Delta\Psi_m$  po działaniu Epo B miały miejsce w czasie od 2 do 48 godzin (I-B2). Inne badania,

dotyczące zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej w izolowanych mitochondriach, potwierdzają przewagę Epo B nad PTX (Khawaja i wsp., 2008).

Spadek potencjału błony mitochondrialnej i zmiany przepuszczalności błony tego organellum powodują wypływ cytochromu c, który oddziałując z cytoplazmatycznym czynnikiem Apaf-1 (ang. *Apoptosis Protease Activating Factor-1*) i prokaspazą-9, w obecności ATP, uruchamia kaskadę kaspaz wykonawczych (Gottlieb i wsp., 2003). Inhibitory depolimeryzacji mikrotubul w tym PTX prowadzą do uwolnienia cytochromu c w wyniku zahamowania ruchu mikrotubul (Shprung i Gozes, 2009). W komórkach raka jajnika linii OV-90 po działaniu Epo B poziom cytochromu c w cytozolu wzrósł o 80% po zaledwie 4 godzinach inkubacji, podczas gdy PTX wywołał zmianę na poziomie 19% (I-B2). Podobne rezultaty obserwowałam w drugiej z badanych linii raka jajnika (I-B4).

W linii SKOV-3 doszło do wzrostu aktywności kaspazy 9, ale tylko po działaniu PTX. Epo B wywołał nieznaczny wzrost aktywności kaspazy 9 (I-B4). Udział kaspazy 9 w uruchamianiu kaskady kaspaz wykonawczych w wyniku działania MSA był dotychczas niejasny. Jedne badania podawały, że dla PTX kaspazą inicjatorową jest kaspaza 10 (Park i wsp., 2004), inne, że kaspaza 8 i 9 (Janssen i wsp., 2007). Komórki linii SKOV-3 mają tzw. dysfunkcyjny apoptosom. W komórkach tych dochodzi do oligomeryzacji czynnika Apaf-1 aczkolwiek jest obniżona ilość kaspazy 9 w apoptosomie (Liu i wsp., 2002). Słaba aktywacja kaspazy 9 w wyniku działania Epo B i jednoczesna silna apoptoza wskazuje na udział innych kaspaz inicjatorowych (I-B4). Inne prace sugerują rolę Apaf-1 w aktywacji kaspazy 4 czy 8 na drodze odmiennego mechanizmu niż w przypadku kaspazy 9 (Hu i wsp., 1998). Zbadałam zatem aktywność kaspazy 8 w linii SKOV-3. W szlaku zewnętrznym sygnał proapoptotyczny przekazywany jest za pośrednictwem receptorów z rodziny TNF w tym TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Przyłączenie odpowiedniego ligandu do receptora indukuje przekazanie sygnału poprzez domenę śmierci (DD, ang. *death domain*) białka FADD (ang. *fas-associated death domain*) do kaspazy 8 (Mielczarek-Palacz i wsp., 2017). Różnica między obiema badanymi grupami MSA (EpoB i PTX) wynikała z szybkości aktywacji kaspazy 8. Epo B szybciej inicjował aktywację kaspazy 8, sugerowało to, że szlak zewnętrzny apoptozy uruchomiony został jako pierwszy. W linii SKOV-3, po działaniu Epo B, miał miejsce silny, zależny od czasu inkubacji wzrost aktywności kaspazy-3 (I-B4).

Podobnie w linii OV-90 kaspaza 8 i 9 były kaspazami inicjatorowymi, a ich poziom był zależny od czasu inkubacji. Poziom kaspazy 8 i 9 wzrósł już po 4 godzinach inkubacji z lekiem do wartości odpowiednio 133% i 115%. Poziom wykonawczej kaspazy 3 był najwyższy po 48 godzinach inkubacji z Epo B (226%). PTX indukował późniejszy wzrost kaspazy 9 (po 24 godzinach) i słabszą aktywację kaspazy 8. Epo B i PTX inicjowały wzrost kaspazy 8 związanej z zewnętrznym szlakiem apoptozy (I-B6).

Leki przeciwnowotworowe mogą wywołać immunogenną śmierć komórki (ICD, ang. *immunogenic cell death*) - typ apoptozy, który prowadzi do wzrostu odpowiedzi układu immunologicznego. W swoich badaniach chciałam sprawdzić czy Epo B i/lub PTX mogą wywołać ten rodzaj apoptozy w komórkach raka jajnika. Jednym ze wskaźników ICD jest mechanizm eliminowania komórek hiperploidalnych. Cząsteczki wydzielane przez ginące komórki nowotworowe, które wysyłają sygnały w odpowiedzi na stres, są łącznie określane jako DAMP (ang. *damage associated molecular patterns*) „programują” charakter śmierci komórek. Jedną z nich jest kalretikulina (CRT, ang. *endoplasmic reticulum chaperone calreticulin*) (Bezu i wsp., 2015). Leki przeciwnowotworowe indukują immunogenną śmierć komórek rakowych, jeśli pod wpływem ich działania m.in. dochodzi do translokacji CRT na powierzchnię błony plazmatycznej w wyniku stresu retikulum endoplazmatycznego. CRT ułatwia fagocytozę umierających komórek przez makrofagi, jak również aktywuje komórki dendrytyczne, zdolne do prezentacji antygenów limfocytom T. Jednym ze związków wpływających na translokacje CRT jest Epo B. Tak więc Epo B przez wywołanie hiperploidyacji komórek rakowych naśladuje układ immunologiczny i wywołuje silną odpowiedź układu odpornościowego (Kepp i wsp., 2014; Senovilla i wsp., 2012).

Szybka aktywacja szlaku zewnętrznego apoptozy skłoniła mnie do zbadania czy pod wpływem epotilonu B może dojść do endogennego wzrostu poziomu liganda TRAIL. Fizjologiczną funkcją liganda TRAIL jest nadzór immunologiczny i udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej. TRAIL wywołuje śmierć komórek nowotworowych na dwa sposoby: jako forma rozpuszczalna oraz poprzez komórki efektorowe (limfocyty cytotoksyczne, komórki NK, neutrofile, monocyty, makrofagi mające na swojej powierzchni ligand TRAIL) (Huber i wsp., 2005; Wennerberg i wsp., 2013). Komórki prawidłowe (fizjologicznie w wątrobie, nerkach, sercu, jelicie, płucach, jądrach) i niektóre komórki nowotworowe mogą w postaci mikropęcherzyków wydzielać TRAIL. Pojawiają się również doniesienia, że w odpowiedzi na cytostatyki komórki nowotworowe zwiększają ekspresję antygeny TRAIL. Uruchomienie zewnętrznej drogi indukcji apoptozy odbywa się m.in. poprzez przyłączenie ligandu TRAIL do receptorów śmierci TRAIL-R1 i/lub TRAIL-R2 zlokalizowanych na komórce docelowej. Zaobserwowano, że cytostatyki mogą nasilać apoptozę z udziałem TRAIL w komórkach nowotworowych i przełamywać oporność poprzez modulację pro- i antyapoptotycznych białek. Na powierzchni komórek raka jajnika znajdują się receptory dla TRAIL (Griffin i wsp., 2003). W moich badaniach zmiany poziomu białka TRAIL były zależne zarówno od typu związku, jak i od czasu inkubacji (2, 48 godz.). W linii SKOV-3 zmiany poziomu liganda TRAIL miały miejsce tylko po 2 godzinach inkubacji z badanymi związkami i wynosiły odpowiednio dla Epo B-132%, a dla PTX 111%. W linii OV-90 zmiany poziomu TRAIL miały miejsce dopiero po 48 godzinach. Epo B generował nieznacznie większy wzrost poziomu TRAIL niż PTX (I-B4, I-B6). Najwyższe zmiany w ekspresji TRAIL zaobserwowano w limfocytach, przy czym Epo B

wywoływał 1.5 krotnie większe zmiany w porównaniu do PTX co jest zdecydowanie korzystnym zjawiskiem w terapii raka jajnika (I-B4).

Niezwykle ważnym białkiem w mechanizmie działania epotilonów jest białko p53. Jest ono zmutowane w 96% nabłonkowych raków jajnika. Są to głównie mutacje zmiany sensu (Seagle i wsp., 2015). P53 jest zlokalizowane w sąsiedztwie mikrotubul. Na skutek uszkodzenia DNA jest transportowane do jądra komórkowego dzięki dyneinom mającym zdolność do poruszania się w kierunku bieguna ujemnego mikrotubul. Zaobserwowałam, że w linii OV-90 Epo B i PTX generowały uszkodzenia DNA na podobnym poziomie (I-B6). Epo B natomiast okazał się być bardziej genotoksycznym związkiem niż PTX w linii SKOV-3, mimo braku ekspresji białka p53, zwłaszcza po dłuższych czasach inkubacji (I-B4). Wysoka genotoksyczność Epo B wynika zatem z generowania wysokiego poziomu ROS (I-B1). Wyniki sugerują, że Epo B prowadzi do śmierci komórkowej na drodze zależnej i niezależnej od p53, a za uszkodzenia DNA są współodpowiedzialne ROS (I-B4, I-B6). Wyniki uzyskane za pomocą alkalicznej wersji metody kometowej zostały potwierdzone cytometrycznie z użyciem metody TUNEL. Zbadałam również poziom napraw DNA. Naprawa DNA zachodziła znacznie rzadziej po działaniu Epo B w porównaniu do PTX w obu liniach raka jajnika (I-B4, I-B6).

Dla uzyskania pełnego obrazu mechanizmu działania epotilonów istotne również było oznaczenie ekspresji PARP-1 (ang. *Poli ADP-Ribose Polymerase*), Ryc 4. Spadek aktywności PARP-1 powoduje zahamowanie procesów naprawy DNA i utratę jego stabilności genomowej. Podczas apoptozy, aktywna kaspaza 3 doprowadza do fragmentacji PARP-1, a w efekcie do trwałych uszkodzeń DNA. Dane literaturowe donoszą, że PARP-1 i p53 ulegają często nadekspresji w raku jajnika i świadczą o jego wysokim stopniu zaawansowania (Godoy i wsp., 2011). Poli-ADP-rybozylacja czynników transkrypcyjnych w tym p53 i NF-κB zapobiega ich przyłączaniu się do DNA i tworzeniu kompleksu transkrypcyjnego (Oei i wsp., 2005). W linii SKOV-3 miał miejsce wzrost poziomu mRNA *PARP-1* po działaniu Epo A. W badanych przeze mnie liniach raka jajnika fragmentacja PARP-1 miała miejsce po działaniu Epo B i PTX co potwierdza udział wewnętrznego szlaku apoptozy w śmierci komórek raka jajnika (I-B4, I-B6, I-B8).

### **1.3. Poznanie mechanizmu śmierci komórkowej wywoływanej przez epotilony w komórkach prawidłowych jajnika**

Zadaniem chemioterapii jest niszczenie komórek nowotworowych przy jednoczesnej ochronie komórek prawidłowych. Mimo, że epotilony wykazują silne działania cytotoksyczne ich wpisanie na listę leków w głównej mierze zależy od skutków ubocznych chemioterapii (Roque i wsp., 2013). Jako model komórek prawidłowych zastosowano myszą prawidłową linię jajnika, MM14.Ov (I-B3). Komórki te były ponad 2 razy bardziej odporne na Epo B niż linie nowotworowe (I-B2). W komórkach tych również dochodziło do indukcji procesu apoptozy, w tym do wczesnej aktywacji białka p53

(I-B3). Następował szybki wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, ale na niższym poziomie niż w komórkach rakowych. Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia miał miejsce już po dwóch godzinach inkubacji z PTX, natomiast po działaniu Epo B nie zaobserwowano istotnych zmian. Zarówno Epo B, jak i PTX prowadziły do zmian morfologicznych charakterystycznych dla apoptozy. Procent komórek apoptotycznych po działaniu PTX był znacznie wyższy niż po działaniu Epo B, co potwierdziłam metodą podwójnego barwienia Hoechst 33258/jodek propidyny i na podstawie analizy stopnia eksternalizacji fosfatydyloseryny (I-B2, I-B3). W komórkach prawidłowych dochodziło również do aktywacji kaspazy 9 i kaspazy 3, fragmentacji PARP-1, co sugerowało udział wewnętrznego szlaku apoptozy (I-B3). Aktywację kaspaz pod wpływem epotilonu obserwowano także w innych typach komórek prawidłowych jak komórki śródbłonka (HUVEC, ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (Long i wsp., 2012), NHEK (ang. *Normal Human Primary Keratinocytes*) (Szmyd i wsp., 2012), czy w makrofagach (Boronkai i wsp., 2009). W przeciwieństwie do komórek nowotworowych w linii MM14.OV zmiany potencjału błony mitochondrialnej miały miejsce dopiero po dłuższym czasie inkubacji (48 godzin). Wypływ cytochromu c z komórek pod wpływem PTX, po 48 godzinach inkubacji z lekiem, był o 70% wyższy niż po inkubacji z Epo B (I-B2). PTX i Epo B indukowały uszkodzenia DNA, które były odwracalne, przy czym istotnie statystycznie niższy poziom uszkodzeń DNA miał miejsce po działaniu Epo B. Potwierdził to test kometowy i metoda TUNEL. Zmiany były zależne od czasu inkubacji (I-B7).

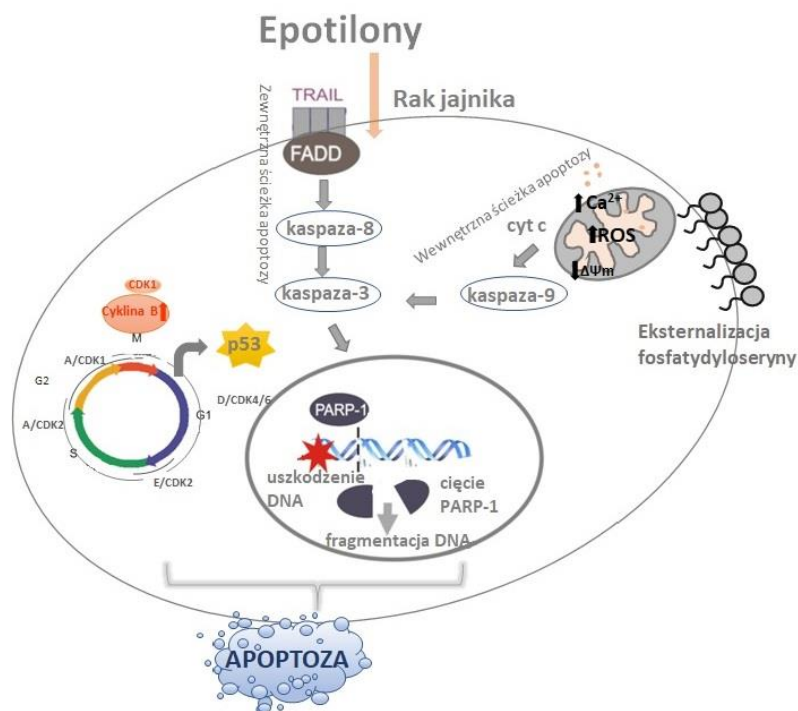
Pacjenci narażeni są na kontakt z epotilonem, czy taksanem tylko przez krótki, określony czas terapii. Długoterminowe uboczne skutki nie są uważane za sprawę pierwszoplanową w obliczu choroby nowotworowej. Prowadzone przeze mnie badania *in vitro* stanowią zaledwie wstęp do badań klinicznych, ale już na tym wczesnym etapie mogę stwierdzić, że PTX ma silniejsze działanie apoptotyczne w komórkach prawidłowych niż epotilon.

#### ❖ Podsumowanie pierwszej części wyników badań

Na podstawie przeprowadzonych badań mogę stwierdzić, że:

1. **Badane epotilony mają silniejsze działanie cytotoksyczne niż paklitaksel niezależnie od linii komórkowej raka jajnika. Epo B jest mniej cytotoksyczny dla komórek prawidłowych jajnika niż PTX. Epotilony i taksany wywołują apoptozę.**
2. **Epo A i Epo B generują reaktywne formy tlenu, które w zależności od czasu inkubacji pośredniczą w indukowaniu apoptozy bądź nekrozy.**
3. **Epotilony powodowały większe zmiany asymetrii błony komórkowej niż PTX**
4. **Wzrost poziomu reaktywnych form tlenu miał istotny wpływ na cytotoksyczność, spadek potencjału błony mitochondrialnej i uszkodzenia DNA. Potwierdzono to m.in. w doświadczeniach, w których zastosowano preinkubację z antyoksydantem.**

5. Epotilony indukują wzrost aktywności kaspazy 9, kaspazy 3 i wewnątrzkomórkowy wzrost poziomu wapnia.
6. Epo B i PTX uruchamiają zewnętrzny szlak apoptozy, indukują wzrost poziomu TRAIL. Aktywacja kaspazy 8 po działaniu Epo B następuje znacznie szybciej niż po działaniu PTX.
7. Epotilony mogą być dobrą alternatywą dla taksanów w terapii raka jajnika



**Ryc.4.** Schematyczna ilustracja proponowanego mechanizmu działania epotilonu A i B, na podstawie (I-B6, I-B8, I-B9, II-D41).

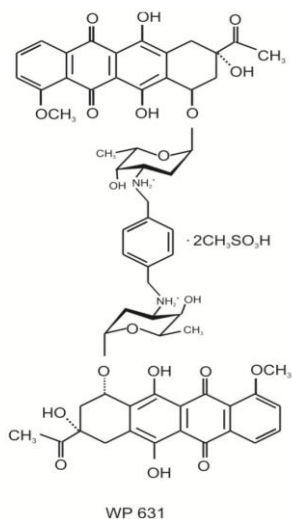
### 2.1. Poznanie molekularnego mechanizmu interakcji WP 631 i epotilonu B w komórkach raka jajnika

Wyniki uzyskane w pierwszym etapie badań, w których to epotilony wykazywały silniejsze działanie cytotoksyczne niż paklitaksel, stały się podstawą do poszerzenia badań na temat współdziałania epotilonów ze związkiem z grupy antracyklin - WP 631. Dotychczas w skojarzonej terapii raka jajnika stosowano głównie doksorubicynę (DOX) lub pochodne platyny w skojarzeniu z taksanami. Połączone działanie DOX z PTX wywoływało oporność wielolekową (MDR), co znacznie obniżało skuteczność chemioterapii. Zatem łączne podanie dwóch związków tj. WP 631 i Epo B w komórkach linii raka jajnika SKOV-3 może stać się alternatywną dla obecnie stosowanych leków.

**Celem** tej części pracy była ocena skuteczności stosowania dwóch związków podawanych łącznie: WP 631 i Epo B w komórkach linii raka jajnika SKOV-3 oraz poznanie mechanizmu skojarzonego działania tych związków. Cel ten realizowano poprzez określenie cytotoksyczności, genotoksyczności i zdolności do generowania ROS.



WP 631 jest bisantracykliną złożoną z dwóch cząsteczek daunorubicyny połączonych łącznikiem p-ksylenowym, Ryc 5. WP 631 interkaluje do DNA z bardzo dużym powinowactwem ( $K=2.7 \times 10^{11} \text{M}^{-1}$ ), znacznie wyższym niż przedstawiciele antracyklin pierwszej generacji ( $K=2 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ ) (Portugal i wsp., 2005). W mechanizm działania WP 631 zaangażowane są ponadto reaktywne formy tlenu powstające głównie w mitochondriach. Pochodna ta wykazuje również silne właściwości proapoptotyczne i genotoksyczne (II-A14, II-A25, II-D40).



Zaletą bisinterkalatorów jest to, że są w stanie przełamać zjawisko oporności wielolekowej. Badania potwierdziły, że WP 631 nie tylko wykazuje mniejsze powinowactwo do białek transportujących odpowiedzialnych za usuwanie leków z komórki, lecz również, w przeciwieństwie do doksorubicyny, prowadzi do obniżenia ekspresji genu MDR-1 (Mansilla i wsp., 2007). Liczne badania *in vitro* pokazały, że WP 631 jest aktywny względem komórek raka jajnika i prowadzi do ich śmierci głównie na drodze apoptozy. Nowy związek jest znacznie skuteczniejszy niż DOX, antracyklina I generacji.

**Ryc 5.** Struktura chemiczna WP 631, na podstawie (I-B5).

Świadczą o tym wybrane parametry, takie jak poziom ROS, uszkodzenia DNA, liczba komórek apoptotycznych czy eksternalizacja fosfatydyloseryny (II-A14, II-A18, II-A25).

Między związkami podawanymi jednocześnie może dojść do interakcji. Jednym z jej typów jest synergizm, najkorzystniejszy z punktu widzenia terapii. Byłam współautorem badań, w których dokonano analizy typu interakcji występującej między WP 631 a Epo B w komórkach raka jajnika SKOV-3. Przebadano połączenie WP 631 i Epo B w różnych stosunkach molowych: 10 : 1; 5 : 1; 2.5 : 1; 1 : 1; 1 : 2.5; 1 : 5 i 1 : 10 i wykazano, że najskuteczniejsze jest to, w której stosunek molowy bisantracykliny do Epo B wynosi 1 : 1. Potwierdził to nie tylko sporządzony izobologram, ale również wyliczony wskaźnik interakcji, określany jako stosunek wartości  $IC_{50}$  wyznaczonej eksperymentalnie do wartości  $IC_{50}$  określonej teoretycznie (II-A22).

Warto podkreślić, że tylko łączne zastosowanie związków w subtoksycznych stężeniach (Epo B, 5nM + WP 631, 5 nM) prowadziło do wczesnego wzrostu ROS. Epo B w stężeniu 10 nM nie generował ROS, a PTX (10 nM) dopiero po 24 godzinach inkubacji. Potwierdzono, że połączenie związków powoduje istotne statystycznie zmiany błonowego potencjału mitochondrialnego, znacznie silniejsze niż przy stosowaniu związków pojedynczo. Parametr ten jest ważnym markerem apoptozy i odzwierciedla udział mitochondriów w procesie programowanej śmierci komórki. Przeanalizowano również aktywność kaspaz (inicjatorowych: -8 i -9 oraz efektorowej - 3)

pod wpływem działania badanych związków i ich kombinacji. Porównując działanie związków stosowanych pojedynczo, można zauważyć, że WP 631 w większym stopniu niż Epo B aktywuje kaspazę-9, natomiast Epo B silniej niż WP 631 indukuje aktywację kaspazy-8. Skojarzone działanie związków z kolei równie efektywnie aktywuje zewnętrzną, jak i wewnętrzną ścieżkę apoptozy. Wzrost aktywności kaspazy-3 był wynikiem zarówno działania pojedynczo dodawanych do komórek związków jak i skutkiem łącznego ich podania.

Oba badane związki jak i ich łączne podanie prowadziły do wzrostu poziomu uszkodzeń DNA. Naprawa DNA miała miejsce zarówno po działaniu pojedynczych leków jak i kombinacji związków, aczkolwiek największy poziom napraw obserwowano po działaniu WP 631. Badania sugerowały, że uszkodzenia DNA generowane przez połączenie związków były trwalsze, w mniejszym stopniu odwracalne, niż po działaniu WP 631. Wpływ skojarzonego działania związków na poszczególne markery apoptozy zamieszczono w Tabeli 1 (I-B5).

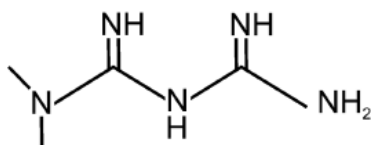
	WP 631	Epo B	WP 631 + Epo B (1:1)
<i>Analizowany parametr</i>			
ROS	+	-	+
eksternalizacja PS			
apoptoza	+	++	+++
nekroza	+	++	++
Hoechst 33258 /PI			
wczesna apoptoza	+	++	+++
późna apoptoza	+	++	+++
nekroza	+	+	+
$\Delta \Psi_m$	-	+	+++
Kaspaza 9	+	-	+++
Kaspaza 8	+/-	+++	+++
Kaspaza 3	-	-	-
TUNEL	+	++	+++
test kometowy	+	++	+++
naprawa DNA	+	++	++

Tabela 1. Wpływ związków podawanych łącznie na badane markery apoptozy, na podstawie (I-B5, II-A22).

## 2.2. Poznanie molekularnego mechanizmu interakcji metforminy i Epo A w komórkach raka jajnika i wątroby

Przedmiotem moich kolejnych badań była analiza skojarzonego działania leku przeciwcukrzycowego – metforminy (Met) (10 mM) w połączeniu z epotilonem A (Epo A) (10 nM), Ryc. 6. Uważa się, że szlak białkowej kinazy serynowo-treoninowej (mTOR, ang. *mammalian target of rapamycin pathway*) jest związany z opornością na inhibitory depolimeryzacji mikrotubul (Yoon i wsp., 2016). Lekiem z kolei hamującym działanie mTOR jest metformina (Hanna i wsp., 2012). Metformina zaliczana jest do doustnych leków przeciwcukrzycowych z grupy biguanidów i jest stosowana w leczeniu cukrzycy typu 2, zespołu policystycznych jajników czy zespołu metabolicznym

(Huang i wsp., 2016). Wykazuje ona działanie przeciwmiażdżycowe, hipotensyjne, immunomodulacyjne oraz przeciwnowotworowe (Chae i wsp., 2016). Moje zainteresowanie lekami cukrzycowymi wynikało z faktu, że u osób chorujących na cukrzycę obserwuje się wzrost ryzyka zachorowania na wiele nowotworów, w tym na raka wątroby, trzustki, nerek, żołądka, jelita grubego, endometrium, raka szyjki macicy, piersi oraz jajnika (Daugan i wsp., 2016; Wu i wsp., 2016). Dlatego też podjęto próbę określenia jej właściwości przeciwnowotworowych w komórkach raka jajnika i wątroby, a następnie zbadano współdziałanie z Epo A w zwalczaniu tychże nowotworów.



**Ryc. 6.** Struktura chemiczna metforminy, na podstawie (II-A24).

Potwierdzono antyproliferacyjne działanie metforminy. Zaobserwowałam obniżenie przeżywalności komórek poddanych działaniu metforminy wraz ze wzrostem stosowanych stężeń. Cytotoksyczność metforminy została oszacowana na podstawie parametru  $IC_{50}$  wynoszącego 14 mM, w odniesieniu do komórek linii SKOV-3 (II-A19). Parametr ten wynosił 21 mM w linii HepG2. Parametr  $IC_{50}$  po działaniu Epo A w linii HepG2 wynosił 24.6 nM, a w linii SKOV-3 20.4 nM (II-A24).

W celu wyjaśnienia mechanizmu skojarzonego działania związków zastosowałam dodatkowo preinkubacje z dwoma inhibitorami: salicylanem sodu (SA) - niesteroidowym związkiem przeciwzapalnym hamującym czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B oraz trycrynbiną (TCN), która hamuje fosforylację i aktywację kinazy Akt oraz zastosowałam antyoksydant w postaci N-acetylocysteiny (NAC).

Jednym z badanych białek była kinaza Akt związana z przeżyciem komórki, apoptozą, proliferacją i metabolizmem. Jest to jedno z najczęściej aktywowanych białek w procesie nowotworowym (Wang i wsp., 2016). Hamuje ono działanie białka Bad (ang. *Bcl-2 antagonist of cell death*), czynnika transkrypcyjnego FOXO (ang. *forkhead transcription factors*), białka c-Raf (ang. *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*) i kaspazy-9, lub poprzez aktywację czynnika NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappaB*) wpływa na prożyciowe białka. Wykryłam nieznaczny wzrost poziomu Akt w badanych liniach komórkowych pod wpływem Epo A. Inne badania potwierdzają wpływ MSA takich jak PTX na poziom Akt w linii jajnika IGROV-1 (Zuco i Zunino, 2008). Sprzeczne badania są na temat wpływu metforminy na poziom Akt (Ferreira i wsp., 2014; Janjetovic i wsp., 2011). W obu liniach komórkowych zanotowałam wzrost poziomu Met. Ciekawy wynik uzyskałam dla kombinacji związków. Łączna inkubacja związków prowadziła do obniżenia poziomu Akt

w porównaniu do poziomu uzyskanego po działaniu Epo A. Prawdopodobnie wpłynęło to na zwiększenie cytotoksyczności kombinacji (I-B8).

W wysokich stężeniach ROS promują starzenie komórek i apoptozę, a zatem funkcjonują jako czynniki przeciwnowotworowe. Jednoczesne zastosowanie dwóch związków generujących ROS było zatem obiecującą strategią zwalczania badanych typów nowotworów. Jedną z głównych oznak procesu apoptozy, niezależnie od typu komórek są zaburzenia funkcji błony mitochondrialnej (Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016). W poprzednich pracach potwierdziłam generowanie ROS przez Epo A i Epo B w linii SKOV-3 (I-B1, I-B4). Epo A generował również ROS w linii HepG2 (I-B8). Metformina hamuje aktywność kompleksu I łańcucha oddechowego, co prowadzi do akumulacji ROS w macierzy mitochondrialnej. Mechanizm ten może zapewnić niezależną od AMPK (ang. *5'AMP-activated protein kinase*) ścieżkę, dzięki której Met może niszczyć komórki nowotworowe poprzez produkcję ROS i uszkodzenie mitochondriów (Ohnishi i wsp., 2016). Łączna inkubacja Epo A i Met generowała wyższy poziom ROS niż pojedyncze związki w obu liniach komórkowych (I-B8). Ostatnio odkryto szlak aktywacji Akt za pośrednictwem ROS, który prowadził do indukcji apoptozy (Jeong i wsp., 2015; Rai i wsp., 2015). Moje badania sugerują, że indukcja apoptozy przez związki podawane łącznie może nastąpić wcześniej niż aktywacja Akt, ponieważ poziom ROS nie był hamowany przez TCN. Preinkubacja z NAC hamowała poziom ROS tylko częściowo.

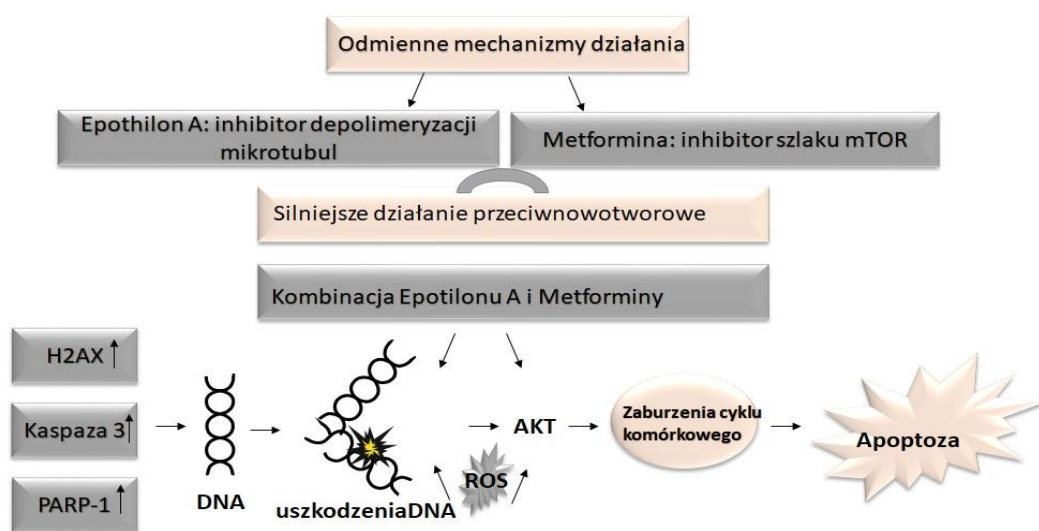
Zbadałam także wpływ kombinacji związków na cykl komórkowy metodą cytometryczną. W zastosowanej nietoksycznej dawce Epo A nie wywoływał bloku cyklu komórkowego G2/M w przeciwieństwie do Epo B (Pellicciotta i wsp., 2013) (II-D41). Inne badania z kolei wykazały, że PTX i docetaksel (DTX) w dawce (0.1 mM) wywołują blok G2/M i apoptozę, a w niskich dawkach (0.01 mM) apoptozę bez zatrzymania cyklu komórkowego (II-D41) (Lin i wsp., 2000). Zatem wywoływany efekt przez MSA jest zależny od dawki. Zaobserwowałam, że Met zwiększała liczbę komórek w fazie G1 w sposób zależny od czasu inkubacji. Z kolei Met z Epo A wywoływały łącznie najwyższy wzrost poziomu komórek w fazie sub-G1 co przekładało się na silne zmiany morfologiczne wywoływane w komórkach raka jajnika i na poziom uszkodzeń DNA. Badana kombinacja związków wywoływała wzrost poziomu komórek apoptotycznych. Kombinacja związków prowadziła również do wzrostu poziomu mRNA dla kaspazy 3 (I-B8).

Analizowałam również poziom mRNA genów związanych z procesem apoptozy jak *PARP-1* czy *H2AX*. Powstawanie podwójnych pęknięć DNA (DSBs) prowadzi do fosforylacji histonu H2AX na Ser139. To z kolei jest przyczyną wzrostu ekspresji p53, co blokuje cykl i podziały komórkowe (Guimaraes i wsp., 2016). Badane połączenie związków prowadziło do wzrostu poziomu PARP-1 w obu liniach komórkowych. Jednym z markerów uszkodzenia DNA w komórce jest wzrost poziomu fosforylacji histonu H2AX. Epo A prowadził do wzrostu poziomu mRNA histonu *H2AX* w linii

SKOV-3 i HepG2, natomiast metformina podwyższała poziom mRNA histonu tylko w linii SKOV-3, Ryc 7.

Ocenie poddano również poziom generowanych uszkodzeń DNA. Wykonałam alkaliczną wersję metody kometowej (pH > 13) w celu oceny poziomu pojedynczych pęknięć DNA (SSBs), podwójnych, miejsc alkalicznie labilnych. Analizie poddałam także poziom uszkodzeń oksydacyjnych DNA. Antyoksydant w postaci NAC obniżał poziom uszkodzeń DNA, co potwierdza udział ROS i oksydacyjnych uszkodzeń DNA w mechanizmie działania kombinacji (I-B8).

Związki uszkadzające DNA są transportowane na mikrotubulach, a MSA zatrzymują je w cytoplazmie co tłumaczy zasadność stosowania grup leków o różnych punktach uchwytu (Poruchynsky i wsp., 2015). ROS hamują szlak mTOR przez aktywację AMPK (Chan i Miskimins, 2012; Lennicke i wsp., 2015). Uzyskane wyniki badań sugerują zatem, że obniżenie ekspresji Akt przez kombinację Epo A - metformina mogło być związane z ograniczeniem wpływu szlaku mTOR, a w konsekwencji prowadzić do wzrostu genetoksycznego i apoptotycznego efektu kombinacji.



**Ryc.7.** Mechanizm łącznego działania Epo A i metforminy w linii SKOV-3 i HepG2, na podstawie (I-B8).

### ❖ Podsumowanie drugiej części wyników badań

Na podstawie przeprowadzonych badań dotyczących skojarzonego działania związków mogą stwierdzić, że:

1. WP 631 i Epo B działają synergistycznie w komórkach raka jajnika, a najefektywniejszym połączeniem jest to, w którym stosunek molowy związków wynosi 1: 1.
2. Kombinacja WP 631 i Epo B oraz Epo A i metforminy w subtoksycznych dawkach wykazuje silniejsze niż związki stosowane pojedynczo działanie proapoptotyczne, prooksydacyjne i genotoksyczne.

### Wnioski ogólne

1. Epotilony są cytotoksyczne i genotoksyczne w komórkach linii raka jajnika i wątroby.
2. Badane MSA uszkodzają komórki prawidłowe jajnika. PTX ma silniejsze działanie cytotoksyczne w porównaniu do Epo B.
3. W zastosowanych kombinacjach związków komórki nowotworowe giną na drodze apoptozy.
4. Związki w subtoksycznych dawkach podawane łącznie, oparte na epotilonach, mają silniejsze działanie przeciwnowotworowe niż pojedynczo stosowane związki.

### Wykorzystanie wyników badań

Uzyskane wyniki badań opisują mechanizm działania epotilonów w komórkach raka jajnika w porównaniu do działania paklitakselu, znanego i stosowanego w klinikach leku. Badania prowadzono również na mysich komórkach prawidłowych jajnika i wykazano, że bardziej cytotoksyczne i genotoksyczne działanie ma paklitaksel, co nie jest korzystne z punktu widzenia terapii. Przyjmując, że miarą skuteczności leków przeciwnowotworowych jest zdolność do indukowania w komórkach rakowych procesu apoptozy, epotilony mogą być zastosowane jako potencjalne leki w terapii raka jajnika, a także zastąpić taksany w przypadku wystąpienia oporności na tradycyjne leczenie. Wymagane jest jednak jednoznaczne wykluczenie w badaniach klinicznych wystąpienia istotnych skutków ubocznych po podaniu naturalnych epotilonów w raku jajnika.

W dalszych badaniach epotilon A i B zastosowano w dwóch różnych wariantach z bisantracykliną w postaci WP 631 i z lekiem przeciwcukrzycowym - metforminą. W badaniach nad kombinacją Epo A i metforminy rozszerzono badania na linie raka wątroby. Oba połączenia związków w subtoksycznych dawkach miały silniejsze działanie niż pojedynczej związki. Według mnie są to pierwsze tego typu połączenia związków z udziałem epotilonów. Otrzymane wyniki poszerzają obecną wiedzę na temat mechanizmu działania skojarzonego działania związków

i sugerują molekularne cele, które mogą się przyczynić do rozwoju kolejnych skutecznych terapii guzów litych.

Praca w części realizowana była w ramach projektu MNiSW (nr N N405 100939) i grantu przyznanego przez Polskie Towarzystwo Chorób Metabolicznych.

Zastosowanie kombinacji metforminy i Epo A stało się przedmiotem zgłoszenia patentowego krajowego i międzynarodowego.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

### Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora

Jestem absolwentką Wydział Biologii i Ochrony Środowiska. Studia ukończyłam w 2004 r. uzyskując tytuł **magistra biologii w zakresie biochemii**. Pracę magisterską pt. „Mutacje genu *hMLH1* w raku sutka kobiet” wykonałam w **Katedrze Cytobiochemii** pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Małgorzaty Krajewskiej i opieką dr hab. Magdaleny Bryś (obecnie prof. dr hab. Magdalena Bryś). W pracy magisterskiej analizowałam mutacje w eksonie 8 i 14 genu *hMLH1* oraz mutacje w dwóch markerach mikrosatelitarnych: GGAA2E02 (chromosom 21, powtórzenia GGAA) i D8S135 (chromosom 8, powtórzenia GA) w raku sutka kobiet. Badałam także wzajemną zależność między częstością występowania mutacji w eksonie 8 i 14 genu *hMLH1*, a częstością występowania mutacji w markerach mikrosatelitarnych. Izolowałam DNA z blozków parafinowych metodą z DNA – zolem w modyfikacji własnej. Mutacje analizowałam za pomocą techniki SSCP – PCR. Po przeprowadzonej reakcji PCR produkty amplifikacji genu *hMLH1* oraz markerów mikrosatelitarnych rozdzielałam w 12% żelu poliakrylamidowym i wybarwiałam metodą srebrową. Wykazałam, że współwystępowanie mutacji w eksonie 8 genu *hMLH1* i markerze mikrosatelitarnym D8S135 może wskazywać na istnienie funkcjonalnej zależności oraz, że niska częstość badanych mutacji nie stwarza przesłanek do zastosowania genu *hMLH1* jako markera procesu nowotworzenia sutka kobiet. Wyniki badań zostały opublikowane w artykule (II-D32).

W roku 2004 zostałam słuchaczką Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Cytogenetyki, Genetyki Molekularnej i Radiobiologii Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę doktorską, pt: „Indukcja apoptozy przez akklarubicynę w nowotworowych komórkach A549, HepG2 i MCF-7”, wykonałam w **Katedrze Termobiologii** (obecnie Katedra Biofizyki Medycznej) pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Józwiak. Recenzentami pracy byli: prof. dr hab. Zofia Kiliańska z Katedry Cytobiochemii UŁ oraz prof. dr hab. n.med. Tadeusz Robak z Kliniki Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Decyzją Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego otrzymałam **stopień naukowy doktora nauk biologicznych w dyscyplinie**

**biofizyka** uchwałą z dnia 24 lutego 2009 r. Rada Wydziału BiOŚ przyjęła wniosek o wyróżnienie mojej rozprawy doktorskiej.

W 2007 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Termobiologii UŁ (obecnie Katedra Biofizyki Medycznej). Tematyka badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej dotyczyła działania leku przeciwnowotworowego – akklarubicyny (ACL) w komórkach nowotworowych człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem procesu apoptozy. Lek ten został wybrany jako obiekt badań w rozprawie doktorskiej, ponieważ w przeciwieństwie do daunorubicyny (DNR) czy DOX, mechanizm działania ACL był stosunkowo słabo poznany, a wyniki eksperymentów przeprowadzone głównie na liniach białaczkowych, kontrowersyjne. Dokonałam kompleksowej oceny działania leku poprzez określenie cytotoksyczności, badanie procesu akumulacji leku, kinetyki transportu oraz zbadanie możliwości indukcji lekooporności i apoptozy. Badania wskazują, że ACL w przeciwieństwie do antracyklin I generacji, prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy a cytotoksyczność tego leku związana jest ze zjawiskiem programowanej śmierci komórki a nie nekrozy. Wyniki badań uzyskane w ramach pracy doktorskiej opublikowałam w **trzech pracach z listy JCR** (Journal Citation Reports): jedna przed uzyskaniem stopnia doktora (II-A11) i dwie po uzyskaniu stopnia (II-A12, II-A21) oraz jednej pracy przeglądowej spoza listy JCR (II-D33).

W tym okresie prowadziłam również badania dotyczące oddziaływania akklarubicyny z prawidłowymi i patologicznymi fibroblastami człowieka. Badania były prowadzone na liniach komórkowych Katedry Termobiologii i liniach otrzymanych dzięki współpracy z Bankiem Komórek przy Centrum Zdrowia Dziecka. W pracy tej potwierdzono udział ROS generowanych w fibroblastach człowieka poddanych działaniu ACL na proces apoptozy (II-A10) (otrzymałam w tym czasie nagrodę, w 2008 r, w postaci dodatkowego 6-miesięcznego stypendium doktorskiego dla doktorantów na etacie asystenta).

Prowadziłam również badania nad oceną szlaków transdukcji sygnałów indukowanych przez kinazę PI3- K/Akt na proces apoptozy indukowany tritlenkiem arsenu w komórkach linii białaczkowych w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi jako współwykonawca projektu.

Do czasu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w specjalności biofizyka mój dorobek naukowy składał się z 2 prac oryginalnych opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR oraz 1 pracy doświadczalnej i 1 pracy przeglądowej spoza listy JCR. Ponadto wyniki badań prezentowałam w postaci 9 komunikatów zjazdowych na konferencjach międzynarodowych (3) i krajowych (6).



## Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora, nie wchodząca w skład osiągnięcia naukowego

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora moje zainteresowania skupiały się wokół kilku tematów:

### 1. Kierunki badań w chemioterapii celowanej

W trakcie studiów doktoranckich uczestniczyłam w konferencjach i sympozjach, które stały się inspiracją dla kilku prac przeglądowych. W trakcie zbierania materiałów powstawały również koncepcje przyszłych badań. Moje zainteresowanie terapią celowaną odzwierciedlają prace dotyczące przeciwciał monoklonalnych (II-D36), przenośników białkowych i peptydowych (II-D34) modyfikacji liposomów (II-D37), aptamerów i ich koniugatów (II-A16), niskocząsteczkowych modulatorów szlaku WNT (II-A17), inhibitorów polimeryzacji mikrotubul (II-A17), czy nowych związków stabilizujących mikrotubule pozyskiwanych z organizmów morskich (II-D38).

### 2. Nowe pochodne antracyklinowe

W swojej pracy doktorskiej zajmowałam się akklarubicyną, a uzyskane wyniki porównywałam z efektami wywołanymi doksorubicyną. Zdobytą wiedzę poszerzyłam dodatkowo w czasie zbierania materiałów do pracy przeglądowej dotyczącej analogów antracyklin utworzonych przez modyfikacje reszty cukrowej (II-D39), a następnie do pracy o WP 631 jako bisinterkalacyjnej pochodnej antracyklin (II-D35). Duży wpływ na kierunek prowadzonych przeze mnie badań miał pozyskany przez dr. hab. Agnieszkę Marczak, prof. nadzw. UŁ grant MNiSW/NCN: *Indukcja apoptozy przez epotilon B i analog doksorubicyny WP 631 w komórkach raka jajnika wrażliwych i opornych na leki przeciwnowotworowe*, w którym byłam głównym wykonawcą. W projekcie tym wykonano szereg badań w zakresie poznania mechanizmu działania Epo B, WP 631 i ich kombinacji. Projekt ten został rozliczony 12 publikacjami.

Po jego zakończeniu powstało jeszcze kilka prac dotyczących molekularnych celów epotilonów jak i ich kombinacji m.in. dwie prace opublikowane w 2016 w *Asian Pac J Cancer Prev*. W pracy Bukowskiej i wsp., 2016 (II-D41) łączne podawanie Epo B i WP 631 prowadzi do zmniejszenia liczby komórek znajdujących się w fazie G2/M, w porównaniu do Epo B, w wyniku poślizgu mitotycznego (ang. *mitotic slippage*), który polega na tym, że komórki opuszczają blok G2/M, a następnie giną na drodze apoptozy. Apoptoza zaś, która jest aktywowana pod wpływem działania kombinacji związków po poślizgu mitotycznym, jest nieodwracalna. Kombinacja związków istotnie obniżała ekspresję mRNA kodującego cyklinę B. Stanowi to dowód na wystąpienie poślizgu mitotycznego, którego cechą charakterystyczną jest degradacja tego białka. Stopniowa utrata aktywności cykliny B w trakcie poślizgu mitotycznego związana jest także ze zmniejszeniem

aktywności cyklino zależnej kinazy 1. W mechanizm działania kombinacji związków zaangażowane są białka EpCAM (ang. *epithelial cell adhesion molecule*) i HMGB1 (ang. *non-histone chromatin-binding protein high-mobility group box 1*), które regulują cykl komórkowy oraz służą jako czynnik prognostyczny. Badania na temat tego skojarzonego działania związków zostały podsumowane w pracy opublikowanej w Life Science (II-A30).

W kolejnym etapie swoich badań skupiłam się na związku między cukrzycą a chorobami nowotworowymi, w tym na określeniu charakteru interakcji pomiędzy związkiem o działaniu przeciwnowotworowym, a lekiem przeciwcukrzycowym. Porównałam wpływ metforminy oraz sitagliptyny na modulowanie działania związków o charakterze przeciwnowotworowych. W ramach pozyskanego grantu naukowego „Rola czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB oraz białka p53 w indukowaniu śmierci komórek nowotworowych wątroby HepG2, przez WP 631 oraz eptilon w kombinacji z metforminą i sitagliptyną” powstała kolejna praca, która dotyczyła połączenia bisantracykliny WP 631 z lekami przeciwcukrzycowymi, takimi jak sitagliptyna czy metformina (II-A24).

W ramach nawiązanej przez dr. hab. Agnieszkę Marczak, prof. nadzw. UŁ współpracy z Instytutem Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie pracowałam także w zespole badającym nowe pochodne doksorubicyny i daunorubicyny z modyfikacjami układu daunozaminy, w tym pochodne formamidynowe i oksazolinowe.

Formamidynoantracykliny należą do analogów doksorubicyny posiadających modyfikacje reszty cukrowej, która polega na transformacji grupy aminowej w położeniu 3' w grupę amidynową, podstawioną dodatkowo resztami cyklicznych amin o różnych wielkościach pierścieni. W pracy dotyczącej formamidynowych pochodnych DOX wykazano, że nowe analogi są cytotoksyczne względem linii raka jajnika-SKOV-3. Ponadto indukują one wewnętrzny szlak apoptozy. Obecność grupy amidynowej w daunozaminie doksorubicyny wpłynęła na nasilenie cytotoksyczności, obniżenie kardiotoxyczności i lekooporności nowych analogów DOX (II-A23).

Uczestniczyłam także w badaniach nad oksazolinowymi pochodnymi doksorubicyny i daunorubicyny. Badania przeprowadzono na linii raka wątroby (HepG2), piersi (MCF-7) i płuc (A549). Oksazolinoantracykliny powstają z DOX lub DNR podczas syntezy odpowiednio formamidynodoksorubicyny lub formamidynodaunorubicyny. Obydwa związki zawierają grupę OH i atom węgla C-4' w konfiguracji cis w odniesieniu do grupy aminowej. Ta konfiguracja jest niezbędna do tworzenia związków, które powstają w wyniku eliminacji drugorzędowej aminy z formamidinoantracykliny, a następnie ulegają dalszej cyklizacji. W pracy tej oznaczono zdolności antyproliferacyjne, genotoksyczne i apoptotyczne m.in poprzez oznaczenie ekspresji kilku genów: (*PARP1*, *BCL2*, *CASP9*, *CASP3*, *BIRC5*, *H2AFX*, *CYC2*). Badania wykazały zdolność doksorubicynoaksazolin (O-DOX) do indukowania procesu apoptozy we wszystkich badanych

liniach poprzez podnoszenie poziomu mRNA *CASP9*, *CASP3*, *CYC2*. Daunorubicynooksazolina (O-DAU) okazała się mało skuteczna w linii SKOV-3 (II-A29). Prowadzone są dalsze badania potwierdzające wyniki uzyskane metodą RT-PCR dotyczące ekspresji białek uczestniczących w mechanizmie działania tej nowej generacji związków, a także badana jest rola autofagii (Aneta Rogalska, Arkadiusz Gajek, Małgorzata Łukawska, Irena Oszczapowicz, Agnieszka Marczak, praca w recenzji w PLOS ONE)

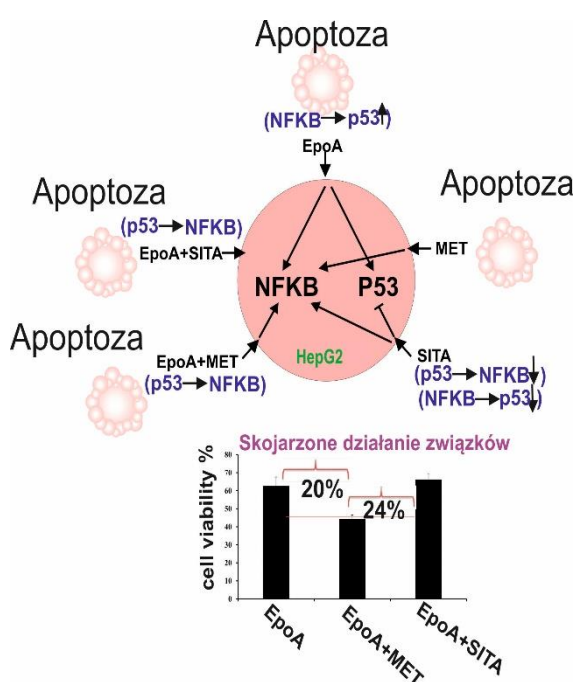
### 3. Przeciwnowotworowe właściwości leków przeciwcukrzycowych

Jednym z leków przeciwcukrzycowych o właściwościach przeciwnowotworowych był gliklazyd. Gliklazyd należy do pochodnych sulfonylomocznika II generacji. Lek poza działaniem przeciwcukrzycowym korzystnie wpływa na profil lipidowy, stymuluje fibrynolizę, ogranicza reaktywności płytek krwi, zwiększa wrażliwość tkanek obwodowych na działanie insuliny. Poprawia także funkcje śródbłonna naczyniowego. W cukrzycy nadmierne stężenie ROS jest odpowiedzialne za aktywację kilku wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, które mogą wpływać na funkcjonowanie i strukturę komórek, zwiększając ryzyko apoptozy. W pracy zbadano antyapoptotyczne właściwości gliklazydu wynikające ze zmniejszenia stresu oksydacyjnego i zmiatania wolnych rodników. Materiał do badań stanowiła linia prawidłowych komórek śródbłonna naczyń (HUVEC) oraz linie nowotworowe gruczołu sutkowego (Hs578T) i linia raka nabłonka przewodu trzustkowego (PANC-1) jako przykład nowotworów związanych z cukrzycą typu 2 (T2DM). Jako model stresu oksydacyjnego wykorzystano nadtlenek wodoru. Oznaczono poziom ROS, zmiany potencjału błony mitochondrialnej i wewnątrzkomórkowy poziom wapnia oraz zmiany apoptotyczne na podstawie zmian w morfologii komórek. Preinkubacja komórek z gliklazydem obniżała poziom wszystkich markerów apoptozy generowanej nadtlentkiem wodoru, a zwłaszcza poziom ROS. Przeciwnowotworowe właściwości gliklazydu opierały się głównie na obniżaniu stresu oksydacyjnego (II-A15).

Najważniejsze osiągnięcie w tym temacie, czyli zastosowanie kombinacji związków stosowanych w leczeniu cukrzycy i inhibitora depolimeryzacji mikrotubul było poprzedzone cyklem prac. Pierwsza z prac dotyczyła wpływu metforminy na proliferację komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz ekspresję genów, kodujących białka zaangażowane w proces O-GlcNAcylation. O-GlcNAcylation jest modyfikacją potranslacyjną białek, która polega na przyłączeniu do seryny lub treoniny wiązaniem O-glikozydowym (O-GlcNAc) pojedynczych reszt N-acetyloglukozaminy. Ze względu na szereg doniesień literaturowych na temat związku między stopniem O-glikozylacji białek komórkowych a cukrzycą oraz wpływie O-GlcNAcylation na proces nowotworzenia oszacowano wpływ metforminy na proces O-GlcNAcylation i proliferację komórek raka jajnika. Stwierdzono, że w przypadku ekspresji genu *OGA* (O-GlcNAc transferazy) nie doszło do znamienych statystycznie zmian w zależności od czasu inkubacji. Natomiast w przypadku genu

OGT ( $\beta$ -N-acetylo-D-glukozaminidaza), w porównaniu z materiałem kontrolnym, obserwowano znamieny statystycznie wzrost ekspresji. Wynik ten był niekorzystny i wymaga dalszych badań i weryfikacji. W linii SKOV-3 oznaczono także cytotoksyczność metforminy i czas potrzebny do podwojenia komórek linii SKOV-3, który wynosił 45 godzin, natomiast w przypadku prób traktowanych 10 mM metforminą nie uzyskano efektu podwojenia liczby komórek nawet po 72 godzinach (II-A20). W kolejnej pracy badano zmiany apoptotyczne indukowane przez metforminę oraz określono poziom mRNA białka antyapoptotycznego – surwiwiny. Metformina obniżała poziom mRNA surwiwiny, co potwierdza jej działanie przeciwnowotworowe (II-A19).

Kolejnym etapem w tym cyklu była druga z prac opublikowana w Asian Pac J Cancer Prev w 2016 (II-D42).



Temat ten był realizowany w ramach współpracy z Kliniką Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca dotyczyła skojarzonego działania Epo A z metforminą oraz Epo A z sitagliptyną w stężeniach subtoksycznych. Celem prowadzonych badań była próba prześledzenia ścieżek sygnałowych czynnika p53 i NF- $\kappa$ B w komórkach nowotworowych linii HepG2 traktowanych badanymi związkami pojedynczo i w połączeniu, Ryc.8. Uzyskane wyniki pozwoliły wykluczyć kombinacje Epo A i sitagliptyny (SITA) jako efektywny rodzaj chemioterapii w raku wątroby.

**Ryc.8.** Proponowany mechanizm działania związków podawanych łącznie, na podstawie (II-D42).

Natomiast łączne podanie związków tj. Epo A z metforminą obniżało proliferację komórek raka wątroby. Epo A indukował większy wzrost poziomu białka p53 niż Met. Wszystkie badane związki stosowane pojedynczo generowały wzrost czynnika NF- $\kappa$ B. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że Met uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie Epo A poprzez co jednoczesne podanie związków Epo A+Met miało silny cytotoksyczny efekt. Skojarzone działanie związków wywoływało proces apoptozy niezależnej od białka p53 jednocześnie obniżając poziom czynnika NF- $\kappa$ B. Badane związki podawane łącznie mogłyby być wykorzystane w leczeniu pacjentów z cukrzycą typu 2 dodatkowo obciążonych rakiem wątroby. Idea badań powstała na podstawie tej pracy była kontynuowana w ramach osiągnięcia naukowego.

Byłam również członkiem zespołu badającego związek między cukrzycą a białkiem p53, który określony został w trakcie badań na podstawie surowicy krwi 225 pacjentów. Poziom ROS u pacjentów z hiperglikemią był przyczyną podwyższonego poziomu białka p53. Wysoki poziom białka p53 był także skorelowany z wiekiem, historią rodzinną, okresem trwania cukrzycy oraz stosunkiem obwodu talii do obwodu bioder (WHR, ang. *waist-to-hip ratio*). Wnioski te zostały poparte analizą statystyczną opartą na wieloczynnikowej regresji logistycznej (II-A31).

#### **4. Leki przeciwbiałaczkowe**

Byłam współautorem pracy realizowanej w ramach grantu NCN (No. 2011/01/B/NZ/0102) „Personalizacja terapii przewlekłej białaczki limfocytowej”, którego kierownikiem była dr hab. Małgorzata Rogalińska, prof. nadzw. UŁ. Dotyczyła ona terapii przewlekłej białaczki limfatycznej z użyciem łącznego podawania leków: kladrybiny z mafosfamidem (CM) lub fludarabiny z mafosfamidem (FM). W pracy wykazano, że odpowiedź pacjenta z przewlekłą białaczką limfocytową oznaczana w oparciu o jego parametry kliniczne najczęściej po 6 cyklach leczenia antynowotworowego oraz wynik analiz *in vitro* wrażliwości komórek białaczkowych na związki antynowotworowe nie zawsze koreluje z stwierdzonymi aberracjami chromosomalnymi (II-A27).

Obecnie jestem promotorem pracy magisterskiej „Kladrybina i jej pochodne - poznanie mechanizmów działania na wybranych modelach nowotworowych linii komórkowych”, realizowanej w oparciu o nowe pochodne kladrybiny pozyskane z Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie. Praca magisterska powstanie m.in. w oparciu o wyniki otrzymane w ramach pozyskanego Studenckiego Grantu Badawczego pt.: „Uszkodzenia DNA generowane przez nowe pochodne kladrybiny” realizowanego przez Panią Anastazję Poczta na Uniwersytecie Łódzkim. Badane pochodne zawierają grupę formamidynową w pozycji 6. Badania prowadzone są równoległe na 3 liniach białaczkowych tj. linii ostrej białaczki limfoblastycznej (MOLT-4), monocytowej (THP-1) i promielocytowej (HL-60). Badany jest poziom oraz typy uszkodzeń DNA, a także rola kinazy ATR (ang. *ATM and Rad-3 related*) w regulacji kinazy deoksycytydynowej.

#### **5. Rola autofagii w cytotoksyczności epotilonów**

Obecnie w roku akademickim 2017/2018 realizuję projekt MINIATURA finansowany ze środków NCN pt. „Autofagia w terapii raka jajnika - ciemna czy jasna strona epotilonów?”. Moja hipoteza badawcza zakłada, że autofagia bierze udział w mechanizmie cytotoksyczności epotilonów w raku jajnika. Celem projektu jest wyjaśnienie molekularnego mechanizmu leżącego u podstaw korelacji między drogą sygnalizacji autofagii a cytotoksycznością wywołaną epotilonami, w porównaniu z paklitaksem oraz zbadanie czy zahamowanie autofagii wpływa na poziom cytotoksyczności związków. Ponadto oszacowany zostanie wpływ epotilonów na interakcję między procesem

autofagii i apoptozy. Mało uwagi poświęca się temu zagadnieniu, niezwykle ważnemu z punktu widzenia skuteczności leków. Badania dostarczają wartościowych informacji dotyczących wpływu autofagii na cytotoksyczność epotilonów, roli autofagii i apoptozy w raku jajnika, poszerzą wiedzę podstawową na temat epotilonów.

### Podsumowanie dorobku naukowego

Na mój dotychczasowy dorobek naukowy składa się **42** publikacji, z czego 31 ukazało się w czasopismach z listy JCR. Spośród tych prac, dziewięć wchodzi w skład osiągnięcia naukowego (**IF=22,455; 225 pkt. MNiSW**). Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji wynosi **64,858**, a liczba punktów MNiSW= **753**. Według bazy Web of Science z dnia 11.04.2018, liczba cytowań publikacji wynosi **137** (175 z autocytowaniami), a indeks Hirscha, **H=7**. Oprócz publikacji, w moim dorobku znajduje się **47** komunikatów konferencyjnych, 21 zaprezentowanych na konferencjach o zasięgu krajowych i 26 na konferencjach międzynarodowych. Cały dorobek naukowy szczegółowo został opisany w załączniku nr 4, a jego podsumowanie przedstawia poniższa tabela

<b>Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</b>				
	Liczba publikacji	Liczba komunikatów	IF	Punkty MNiSW
Publikacje w czasopismach z IF	<b>2</b>		<b>5,793</b>	<b>40</b>
Publikacje bez IF	<b>3</b>		-	<b>10</b>
Komunikaty konferencyjne		<b>9</b>	-	-
Komunikaty konferencyjne opublikowane w czasopismach z IF	-	-	-	-
<b>Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</b>				
Publikacje w czasopismach z IF	<b>29</b>		<b>59,065</b>	<b>668</b>
Publikacje bez IF	<b>8</b>		-	<b>35</b>
Komunikaty konferencyjne		<b>38</b>		
Komunikaty konferencyjne opublikowane w czasopismach z IF		<b>4</b>	15,398*	104*
<b>Sumaryczny dorobek naukowy</b>	<b>42</b>	<b>47</b>	<b>64,855</b> (80,283)**	<b>753</b> (857)**

- Impact Factor (IF) podany jest dla roku opublikowania artykułu

-Liczba punktów za publikacje podana została zgodnie z wykazem czasopism Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z rokiem opublikowania

\*- IF i punkty MNiSW czasopism; \*\*publikacje + komunikaty konferencyjne

## Literatura

- Albrethsen, J., Angeletti, R.H., Horwitz, S.B., Yang, C.P., 2014. Proteomics of cancer cell lines resistant to microtubule-stabilizing agents. *Molecular cancer therapeutics* 13, 260-269.
- Bezu, L., Gomes-de-Silva, L.C., Dewitte, H., i wsp., 2015. Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death. *Frontiers in immunology* 6, 187.
- Borisenko, G.G., Matura, T., Liu, S.X., i wsp., 2003. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold. *Archives of biochemistry and biophysics* 413, 41-52.
- Boronkai, A., Bellyei, S., Szigeti, A., i wsp., 2009. Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by galectin-13 overexpression via activation of Ask-1-p38-MAP kinase and JNK/SAPK pathways and suppression of Akt and ERK1/2 activation in U-937 human macrophage cells. *European journal of cell biology* 88, 753-763.
- Bruning, A., Mylonas, I., 2010. New emerging drugs targeting the genomic integrity and replication machinery in ovarian cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*.
- Busselberg, D., Florea, A.M., 2017. Targeting Intracellular Calcium Signaling ([Ca<sup>2+</sup>]) to Overcome Acquired Multidrug Resistance of Cancer Cells: A Mini-Overview. *Cancers* 9.
- Chae, Y.K., Arya, A., Malecek, M.K., i wsp., 2016. Repurposing metformin for cancer treatment: current clinical studies. *Oncotarget* 7, 40767-40780.
- Chan, D.K., Miskimins, W.K., 2012. Metformin and phenethyl isothiocyanate combined treatment in vitro is cytotoxic to ovarian cancer cultures. *J Ovarian Res* 5, 19.
- Daugan, M., Dufay Wojcicki, A., d'Hayer, B., Boudy, V., 2016. Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacol Res* 113, 675-685.
- Davidson, B., Trope, C.G., 2014. Ovarian cancer: diagnostic, biological and prognostic aspects. *Women's health* 10, 519-533.
- Edelman, M.J., Shvartsbeyn, M., 2012. Epopthilones in development for non--small-cell lung cancer: novel anti-tubulin agents with the potential to overcome taxane resistance. *Clinical lung cancer* 13, 171-180.
- Ferreira, G.D., Germeyer, A., de Barros Machado, A., i wsp., 2014. Metformin modulates PI3K and GLUT4 expression and Akt/PKB phosphorylation in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*.
- Fojo, T., Menefee, M., 2007. Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18 Suppl 5, v3-8.
- Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., i wsp., 2012. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and apoptosis. *Cell calcium* 52, 36-43.
- Godoy, H., Mhaweche-Fauceglia, P., Beck, A., Miller, A., Lele, S., Odunsi, K., 2011. Expression of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase and p53 in epithelial ovarian cancer and their role in prognosis and disease outcome. *Int J Gynecol Pathol* 30, 139-144.
- Gong, X.L., Qin, S.K., 2016. Progress in systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 22, 6582-6594.
- Gottlieb, E., Armour, S.M., Harris, M.H., Thompson, C.B., 2003. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell death and differentiation* 10, 709-717.

- Griffin, D., Wittmann, S., Guo, F., i wsp., 2003. Molecular determinants of epothilone B derivative (BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis of human ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology* 89, 37-47.
- Guimaraes, T.A., Farias, L.C., Santos, E.S., i wsp., 2016. Metformin increases PDH and suppresses HIF-1alpha under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*.
- Haanen, C., Vermes, I., 1995. Apoptosis and inflammation. *Mediators of inflammation* 4, 5-15.
- Hanna, R.K., Zhou, C., Malloy, K.M., i wsp., 2012. Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway. *Gynecol Oncol* 125, 458-469.
- Hernandez, L., Kim, M.K., Lyle, L.T., i wsp., 2016. Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies. *Gynecologic oncology* 142, 332-340.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., Nunez, G., 1998. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4386-4391.
- Huang, T., Chen, P.C., Wu, M.H., Lin, C.Y., 2016. Metformin improved health-related quality of life in ethnic Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Health Qual Life Outcomes* 14, 119.
- Huber, V., Fais, S., Iero, M., i wsp., 2005. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 128, 1796-1804.
- Jacob, F., Nixdorf, S., Hacker, N.F., Heinzelmann-Schwarz, V.A., 2014. Reliable in vitro studies require appropriate ovarian cancer cell lines. *Journal of ovarian research* 7, 60.
- Janjetovic, K., Vucicevic, L., Misirkic, M., i wsp., 2011. Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of Akt. *European journal of pharmacology* 651, 41-50.
- Janssen, K., Pohlmann, S., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K., Fischer, U., 2007. Apaf-1 and caspase-9 deficiency prevents apoptosis in a Bax-controlled pathway and promotes clonogenic survival during paclitaxel treatment. *Blood* 110, 3662-3672.
- Jeong, C.H., Chun, K.S., Kundu, J., Park, B., 2015. Phosphorylation of Smac by Akt promotes the caspase-3 activation during etoposide-induced apoptosis in HeLa cells. *Mol Carcinog* 54, 83-92.
- Jin, S.W., Patterson, C., 2009. The opening act: vasculogenesis and the origins of circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 623-629.
- Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., i wsp., 2014. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3, e955691.
- Khawaja, N.R., Carre, M., Kovacic, H., Esteve, M.A., Braguer, D., 2008. Patupilone-induced apoptosis is mediated by mitochondrial reactive oxygen species through Bim relocalization to mitochondria. *Molecular Pharmacology* 74, 1072-1083.
- Kingston, D.G., 2009. Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *J Nat Prod* 72, 507-515.
- Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L.A., Seliger, B., 2015. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal* 13, 39.
- Lin, H.L., Liu, T.Y., Chau, G.Y., Lui, W.Y., Chi, C.W., 2000. Comparison of 2-methoxyestradiol-induced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species. *Cancer* 89, 983-994.



- Liu, C.Y., Chen, K.F., Chen, P.J., 2015. Treatment of Liver Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5, a021535.
- Liu, J.R., Opiari, A.W., Tan, L., i wsp., 2002. Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. *Cancer research* 62, 924-931.
- Long, X., Li, Y., Qi, Y., i wsp., 2012. XAF1 contributes to dengue virus-induced apoptosis in vascular endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Mansilla, S., Rojas, M., Bataller, M., Priebe, W., Portugal, J., 2007. Circumvention of the multidrug-resistance protein (MRP-1) by an antitumor drug through specific inhibition of gene transcription in breast tumor cells. *Biochem Pharmacol* 73, 934-942.
- Mielczarek-Palacz, A., Sikora, J., Kondera-Anasz, Z., 2017. Assessment of concentrations of sTRAIL ligand and its receptors sTRAIL-R1 and sTRAIL-R2 - markers monitoring the course of the extrinsic pathway of apoptosis induction: potential application in ovarian cancer diagnostics. *Archives of medical science : AMS* 13, 624-628.
- Mozzetti, S., Iantomasi, R., De Maria, I., i wsp., 2008. Molecular mechanisms of paclitaxel resistance. *Cancer research* 68, 10197-10204.
- Oei, S.L., Keil, C., Ziegler, M., 2005. Poly(ADP-ribosylation) and genomic stability. *Biochem Cell Biol* 83, 263-269.
- Ohnishi, S., Mizutani, H., Kawanishi, S., 2016. The enhancement of oxidative DNA damage by anti-diabetic metformin, buformin, and phenformin, via nitrogen-centered radicals. *Free Radic Res* 50, 929-937.
- Park, S.J., Wu, C.H., Gordon, J.D., Zhong, X., Emami, A., Safa, A.R., 2004. Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 51057-51067.
- Pellicciotta, I., Yang, C.P., Goldberg, G.L., Shahabi, S., 2011. Epothilone B enhances Class I HLA and HLA-A2 surface molecule expression in ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology* 122, 625-631.
- Pellicciotta, I., Yang, C.P., Venditti, C.A., Goldberg, G.L., Shahabi, S., 2013. Response to microtubule-interacting agents in primary epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Cell Int* 13, 33.
- Portugal, J., Cashman, D.J., Trent, J.O., i wsp., 2005. A new bisintercalating anthracycline with picomolar DNA binding affinity. *J Med Chem* 48, 8209-8219.
- Poruchynsky, M.S., Komlodi-Pasztor, E., Trostel, S., i wsp., 2015. Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 1571-1576.
- Prota, A.E., Bargsten, K., Zurwerra, D., i wsp., 2013. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* 339, 587-590.
- Rai, N., Sarkar, M., Raha, S., 2015. Piroxicam, a traditional non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) causes apoptosis by ROS mediated Akt activation. *Pharmacol Rep* 67, 1215-1223.
- Ranade, A.R., Higgins, L., Markowski, T.W., i wsp., 2016. Characterizing the Epothilone Binding Site on beta-Tubulin by Photoaffinity Labeling: Identification of beta-Tubulin Peptides TARGSQY and TSRGSQY as Targets of an Epothilone Photoprobe for Polymerized Tubulin. *Journal of medicinal chemistry* 59, 3499-3514.
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A., 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1863, 2977-2992.
- Reichenbach, H., Hofle, G., 2008. Discovery and development of the epothilones - A novel class of antineoplastic drugs. *Drugs in R&D* 9, 1-10.

- Roque, D.M., Bellone, S., Buza, N., i wsp., 2013. Class III beta-tubulin overexpression in ovarian clear cell and serous carcinoma as a maker for poor overall survival after platinum/taxane chemotherapy and sensitivity to patupilone. *American journal of obstetrics and gynecology*.
- Seagle, B.L., Yang, C.P., Eng, K.H., i wsp., 2015. TP53 hot spot mutations in ovarian cancer: selective resistance to microtubule stabilizers in vitro and differential survival outcomes from The Cancer Genome Atlas. *Gynecologic oncology* 138, 159-164.
- Senovilla, L., Vitale, I., Martins, I., i wsp., 2012. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science* 337, 1678-1684.
- Shprung, T., Gozes, I., 2009. A novel method for analyzing mitochondrial movement: inhibition by paclitaxel in a pheochromocytoma cell model. *Journal of molecular neuroscience* : MN 37, 254-262.
- Sun, W., Cabrera, R., 2018. Systemic Treatment of Patients with Advanced, Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Emergence of Therapies. *J Gastrointest Cancer*.
- Szmyd, R.S., Goralcyk, A.G., Skalniak, L., i wsp., 2012. Effect of silver nanoparticles on human primary keratinocytes. *Biological chemistry*.
- Wang, C., Yao, B., Xu, M., Zheng, X., 2016. RIP1 upregulation promoted tumor progression by activating AKT/Bcl-2/BAX signaling and predicted poor postsurgical prognosis in HCC. *Tumour Biol*.
- Wennerberg, E., Sarhan, D., Carlsten, M., i wsp., 2013. Doxorubicin sensitizes human tumor cells to NK cell- and T-cell-mediated killing by augmented TRAIL receptor signaling. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 133, 1643-1652.
- Willmott, L.J., Fruehauf, J.P., 2010. Targeted therapy in ovarian cancer. *Journal of oncology* 2010, 740472.
- Wilmes, A., O'Sullivan, D., Chan, A., i wsp., 2011. Synergistic interactions between peloruside A and other microtubule-stabilizing and destabilizing agents in cultured human ovarian carcinoma cells and murine T cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 68, 117-126.
- Wu, W., Yang, J.L., Wang, Y.L., i wsp., 2016. Reversal of multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells by metformin through inhibiting NF-kappaB gene transcription. *World J Hepatol* 8, 985-993.
- Yamaguchi, H., Maruyama, T., Urade, Y., Nagata, S., 2014. Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells. *eLife* 3, e02172.
- Yoon, H.H., Foster, N.R., Meyers, J.P., i wsp., 2016. Gene expression profiling identifies responsive patients with cancer of unknown primary treated with carboplatin, paclitaxel, and everolimus: NCCTG N0871 (alliance). *Ann Oncol* 27, 339-344.
- Yu, J.X., Chen, Q., Yu, Y.Q., Li, S.Q., Song, J.F., 2016. Upregulation of colonic and hepatic tumor overexpressed gene is significantly associated with the unfavorable prognosis marker of human hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res* 6, 690-700.
- Zhao, Y., Fang, W.S., Pors, K., 2009. Microtubule stabilising agents for cancer chemotherapy. *Expert opinion on therapeutic patents* 19, 607-622.
- Zuco, V., Zunino, F., 2008. Cyclic pifithrin-alpha sensitizes wild type p53 tumor cells to antimicrotubule agent-induced apoptosis. *Neoplasia* 10, 587-596.

Łbóń, 14.05.2018 r. Aneta Rogalska