

lek. Karolina Janyst

**Badanie efektywności działania nowych kombinacji leków
przeciwnowotworowych i potencjalnych terapeutyków
na komórki raka jajnika człowieka w modelu *in vitro***

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Witold Lasek

Zakład Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

STRESZCZENIE

Rak jajnika jest główną przyczyną śmierci wśród chorych z nowotworami ginekologicznymi. Najnowsze dane pokazują, że ten typ raka jest piątym najczęściej występującym nowotworem wśród kobiet w Polsce z 2777 zgonami w 2019 roku [www.onkologia.org.pl].

W oparciu o powyższe dane, w badaniach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, zdecydowano się na poszukanie nowych wariantów chemioterapii w celu poprawy efektywności leczenia raka jajnika.

Obecne schematy leczenia opierają się głównie na pochodnych platyny (karboplatyna lub cisplatyna) oraz taksoidu (paklitaksel). Jednakże poznawanie specyfiki biologii komórek nowotworowych pozwala na odkrywanie i testowanie nowych czynników, które mogłyby być stosowane w chemioterapii nowotworów. W pracy doktorskiej, testowano nowe kombinacje terapeutyków, w tym inhibitor aktywności proteasomu - bortezomib, indukujący apoptozę w komórkach nowotworowych, oraz inhibitor o szerokim zakresie działania na deacetylazy histonowe - skryptaid, którego przewaga nad innymi związkami z tej grupy polega na jego względnie nietoksycznym działaniu na komórki prawidłowe. Jednoczesne hamowanie dwóch szlaków proteolitycznych w komórce: proteosomalnego (bortezomib) i lizosomalnego (skryptaid), prowadzi do zachwiania homeostazy w komórkach, a w konsekwencji ich śmierci i nasilenia działania przeciwnowotworowego.

W pierwszym etapie badań przeprowadzone zostały eksperymenty *in vitro* na referencyjnych liniach raka jajnika: SKOV-3, MDAH-2774, OVP-10, z zastosowaniem metody MTT. Celem ich było określenie przeciwnowotworowego działania aktualnie stosowanych leków zawartych w podstawowych schematach leczenia raka jajnika (paklitaksel, karboplatyna, doksorubicyna, etopozyd) oraz czynników należących do grupy inhibitorów proteasomów i inhibitorów deacetylazy histonowej, używanych pojedynczo lub w kombinacjach. Najsilniejsze działanie toksyczne wobec komórek nowotworowych, o charakterze synergizmu, zostało zaobserwowane w przypadku kombinacji skryptaidu i doksorubicyny a także skryptaidu i bortezomibu. Kontynuacją tych badań była ocena zmian w komórkach nowotworowych przytoczonych linii raka jajnika, które wcześniej inkubowane były z wyżej wymienionymi czynnikami. Przeprowadzone eksperymenty metodą

Western blot udowodniły, iż cytotoksyczne działanie kombinacji skryptaidu i bortezomibu wynika z nasilenia procesów apoptotycznych w komórce (widoczna ekspresja białek: kaspazy 9 oraz pociętej formy białka PARP) oraz z wpływu na cykl komórkowy (zwiększona ekspresja białka p21). Odsetek komórek apoptotycznych, w teście z Aneksyną V i jodkiem propidyny, w hodowli traktowanej jednocześnie skryptaidem i bortezomibem był istotnie wyższy aniżeli w przypadku pojedynczych czynników. Analizując dalej mechanizm synergistycznego działania skryptaidu i bortezomibu, zauważono wzmożoną ekspresję acetylowanej α -tubuliny, substratu jednej z deacetylaz histonowych. Wskazuje to na zablokowanie lizosomalnej drogi degradacji nieprawidłowych białek, w której istotnym etapem jest tworzenie się agresomów zależne od deacetylacji α -tubuliny przez deacetylazę histonową HDAC6.

W drugim etapie badań, skuteczność działania wybranych kombinacji chemioterapeutyków została oceniona na komórkach 10 pierwotnych linii komórkowych raka jajnika, wyprowadzonych z płynu otrzewnowego chorych operowanych z powodu raka jajnika z komórkami nowotworowymi w płynie z jamy otrzewnej. Wszystkie linie komórkowe wykazywały ekspresję pancytokeratyn, a niektóre z nich także EpCAM. Obecność antygenu CA-125 w zawieszynie znad hodowanych komórek została odnotowana w przypadku 3 linii komórkowych. W badaniach finalnych na powyższych liniach komórkowych, używając testu Alamar Blue, stwierdzono, że najbardziej skuteczna w ograniczaniu przeżywalności komórek okazała się kombinacja skryptaidu z doksorubicyną – synergizm działania ujawniono w przypadku wszystkich wyprowadzonych linii. Podobnie jednoczesne zastosowanie bortezomibu i skryptaidu spowodowało istotny spadek żywotności komórek, o charakterze synergizmu, w znaczącej większości pierwotnych linii komórkowych.

Podsumowując, przedstawione w niniejszej rozprawie badania, przeprowadzone w znacznie szerszym niż w innych publikacjach zakresie, pokazują synergiczne działanie połączenia potencjalnych terapeutyków: skryptaidu z doksorubicyną i skryptaidu z bortezomibem na komórki raka jajnika, zarówno na ustalonych liniach komórkowych, jak i liniach pierwotnych. Może to stanowić podstawę dla dalszych badań *in vitro* na innych nowotworowych liniach komórkowych a także *in vivo* w modelach zwierzęcych z intencją użycia w klinice.