



UNIWERSYTET MARIII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE
Instytut Nauk Biologicznych

Adrian Zając

**Temozolomid oraz inhibitory szlaków zależnych od
receptora TrkB w indukcji zaprogramowanej śmierci
ludzkich komórek glejaka *in vitro***

***Temozolomide and inhibitors of TrkB receptor dependent
pathways in induction of programmed cell death in human glioma
cells***

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil
Promotor pomocniczy: dr Ewa Langner

Lublin, 2020 r.

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania

Pani dr hab. Joannie Jakubowicz-Gil

*za ogromną cierpliwość i nieocenioną opiekę promotorską,
cenne uwagi i wskazówki w trakcie realizacji niniejszej pracy,*

a także 5 lat wspólnej, owocnej współpracy

oraz Pani dr Ewie Langner za życzliwość, naukowe wskazówki oraz wszelką pomoc.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
1.1. TKANKA NERWOWA	8
1.2. ASTROCYTY	10
1.3. NOWOTWORY POCHODZENIA GLEJOWEGO	11
1.3.1. Gwiaździak anaplastyczny - III ^o	14
1.3.2. Glejak wielopostaciowy - IV ^o	16
1.4. CZYNNIKI ETIOLOGICZNE GLEJAKÓW	18
1.4.1. Czynniki egzogenne	18
1.4.2. Czynniki endogenne	19
1.5. MOLEKULARNE MECHANIZMY TRANSFORMACJI GLEJAKÓW	21
1.5.1. Wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnału przeżycia regulowane przez receptor TrkB	22
1.6. LECZENIE NOWOTWORÓW CENTRALNEGO UKŁADU NERWOWEGO.....	28
1.7. INHIBITORY WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH SZLAKÓW PRZEŻYCIA	30
1.7.1. LOXO-101	30
1.7.2. LY294002.....	30
1.7.3. Sorafenib	31
1.7.4. U-73122.....	31
1.8. ŚMIERĆ KOMÓRKOWA	32
1.8.1. Apoptoza	32
1.8.2. Autofagia.....	35
1.8.3. Korelacja pomiędzy apoptozą a autofagią	37
1.8.4. Nekroza	39
2. CEL PRACY	40
3. MATERIAŁY I METODY.....	41
3.1. SPIS ODCZYNNIKÓW	41
3.2. SPIS BUFORÓW	42
3.3. LINIE KOMÓRKOWE.....	42
3.4. BADANE ZWIĄZKI.....	43
3.5. METODYKA BADAWCZA.....	45

3.5.1. Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą barwienia fluorochromami: Hoechst 33342 oraz jodek propidionowy	45
3.5.2. Identyfikacja komórek autofagalnych	46
3.5.3. Technika mikroskopii elektronowej TEM	47
3.5.4. Barwienie komórek mieszaniną falloidyny i rodaminy	47
3.5.5. Izolacja białek z materiału badanego	48
3.5.6. Oznaczanie stężenia białka.....	48
3.5.7. Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym	48
3.5.8. Immunoblotting.....	50
3.5.9. Badanie aktywności enzymatycznej metodą ELISA	51
3.5.10. Blokowanie ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1, TrkB, Bcl-2, beklina-1 przy użyciu specyficznych siRNA	52
3.5.11. Koimmunoprecypitacja	53
3.5.12. Immunocytochemia.....	53
3.5.13. Badanie zahamowania migracji komórek glejaków z zastosowaniem Testu Rysy (Wound Assay)	54
3.5.14. Analiza statystyczna.....	54
4. WYNIKI	55
4.1. WPŁYW LY294002, U-73122 ORAZ LOXO-101 NA INDUKCJĘ APOPTOZY, AUTOFAGII I NEKROZY W KOMÓRKACH GLEJAKÓW	55
4.1.1. LY294002.....	55
4.1.2. U-73122.....	57
4.1.3. LOXO-101	59
4.2. PODSUMOWANIE SKUTECZNOŚCI LY294002, SORAFENIBU, TEMZOLOMIDU, U-73122 ORAZ LOXO-101 W INDUKCJI ZAPROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓREK MOGGCCM I T98G	61
4.3. EFEKT DZIAŁANIA SKOJARZONEJ APLIKACJI LY294002, SORAFENIBU, TEMZOLOMIDU, U-73122 ORAZ LOXO-101 W KONTEKŚCIE INDUKCJI ZAPROGRAMOWANEJ ŚMIERCI W LINIACH MOGGCCM ORAZ T98G	63
4.4. POZIOM EKSPRESJI ORAZ AKTYWNOŚĆ BIAŁEK MARKEROWYCH	67
4.4.1. Poziom ekspresji kaspazy 3.....	67
4.4.2. Aktywność kaspaz 3, 8 oraz 9	69
4.4.3. Analiza poziomu ekspresji bekliny-1	73

4.5. ZMIANY ORGANIZACJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ GWIAŹDZIAKA ANAPLASTYCZNEGO (MOGGCCM) ORAZ GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO (T98G) POD WPŁYWEM LY294002, SORAFENIBU, TEMOZOLOMIDU, U-73122 ORAZ LOXO-101	75
4.6. ANALIZA KOMPLEKSÓW BIAŁKOWYCH BEKLINA-1 I BCL-2.....	76
4.7. WPŁYW LY294002, SORAFENIBU, TEMOZOLOMIDU, U-73122 ORAZ LOXO-101 NA POZIOM EKSPRESJI ORAZ AKTYWNOŚĆ WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH SZLAKÓW PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU PRZEŻYCIA W LINIACH MOGGCCM ORAZ T98G.....	79
4.7.1. Linia MOGGCCM	80
4.7.2. Linia T98G	84
4.8. BLOKOWANIE EKSPRESJI PI3K, RAF, PLC γ 1 I TRKB ORAZ POTWIERDZENIE SKUTECZNOŚCI DZIAŁANIA INHIBITORÓW TYCH SZLAKÓW.....	88
4.9. OCENA WPŁYWU BADANYCH INHIBITORÓW NA POTENCJAŁ MIGRACYJNY KOMÓREK GWIAŹDZIAKA ANAPLASTYCZNEGO I GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO	92
5. DYSKUSJA	94
6. PODSUMOWANIE.....	102
7. WNIOSKI.....	103
8. LITERATURA	104
SPIS TABEL I RYSUNKÓW.....	116
STRESZCZENIE	119
ABSTRACT	120

1. Wstęp

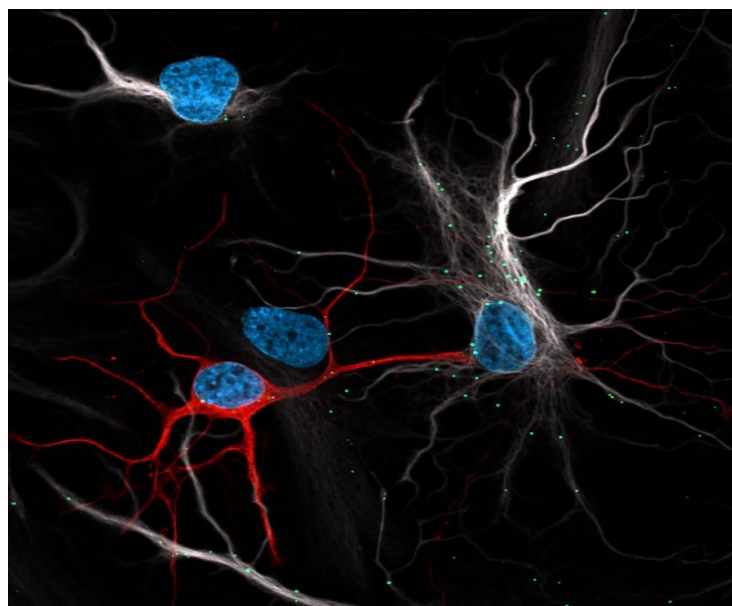
Nowotwory na chwilę obecną są uważane za chorobę cywilizacyjną XXI wieku. Coraz częstsze odnotowania przypadków zachorowań wiążą się z intensywną eksploatacją i ingerencją w środowisko, w którym żyjemy, a bardzo duży odsetek śmiertelności spowodowany jest często nie do końca poznanymi mechanizmami powstawania tych schorzeń. W samym tylko 2019 roku odnotowano prawie 20 milionów przypadków zachorowań na całym świecie, a ponad połowa z nich zakończyła się śmiercią pacjenta. Tendencja ta jest wzrostowa i szacuje się, że w kolejnych latach coraz więcej osób będzie miało zdiagnozowaną chorobę nowotworową.

Glejaki są to złośliwe nowotwory centralnego układu nerwowego. Powstają one z neurogleju lub progenitorowych komórek nerwowych na drodze transformacji nowotworowej. Charakteryzują się one bardzo dużą agresywnością wzrostu guza oraz intensywną infiltracją zdrowych tkanek mózgu. Pomimo, iż udział glejaków w ogólnej liczbie zachorowań nie jest wysoki i wynosi od 2 do 3%, to stanowią one ponad 80% wszystkich nowotworów centralnego układu nerwowego u osób dorosłych, przy czym częściej chorują mężczyźni niż kobiety. Ponadto charakteryzują się wysoką śmiertelnością. Biorąc pod uwagę kryteria złośliwości, Światowa Organizacja Zdrowia dokonała podziału glejaków w czterostopniowej skali według stopnia ich złośliwości od najmniej złośliwego I^o do najbardziej agresywnych form IV^o. Przykładem najbardziej agresywnych nowotworów mózgu jest gwiaździak anaplastyczny (AA, III^o) oraz glejak wielopostaciowy (GBM, IV^o). Prognozy dla pacjentów ze zdiagnozowanym AA lub GBM są bardzo słabe i na ten moment schorzenia te są nieuleczalne. Wysoka agresywność tych glejaków w połączeniu z często trudną strategicznie lokalizacją guza, powoduje, że są one bardzo trudne w eliminacji, a stosowana obecnie terapia prowadzi jedynie do przedłużania i poprawy komfortu życia pacjenta. Dlatego też poszukuje się nowoczesnych i skuteczniejszych terapii przeciwko glejakom opartych o tzw. molekularne cele. Coraz częściej bowiem złośliwość oraz oporność na standardowe leczenie tych nowotworów przypisuje się nadekspresji wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału przeżycia: PI3K-Akt/PKB-mTOR (PI3K – kinaza fosfatydylo-3 inozytolu, Akt/PKB – kinaza białkowa typu B, mTOR – ssaczy cel rapamycyny), Ras-Raf-MEK-ERK (Ras – „mała GTPaza”, Raf – ang. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, MEK – ang. mitogen-activated protein kinase kinase, ERK – ang. extracellular signal-regulated kinases), PLC γ 1-PKC (PLC γ 1 – fosfolipaza C γ 1, PKC – kinaza białkowa typu C), które są regulowane przez receptor TrkB (ang. Tropomyosin

receptor kinase B). Zostało bowiem udowodnione, iż niekontrolowana i nadmierna regulacja tych szlaków odgrywa kluczową rolę w intensyfikacji proliferacji oraz unikaniu zaprogramowanej śmierci komórkowej, co prowadzi do progresji tych nowotworów. Dlatego wydaje się, że zablokowanie tych szlaków przy użyciu specyficznych inhibitorów może skutecznie eliminować komórki glejaków na drodze zaprogramowanej śmierci.

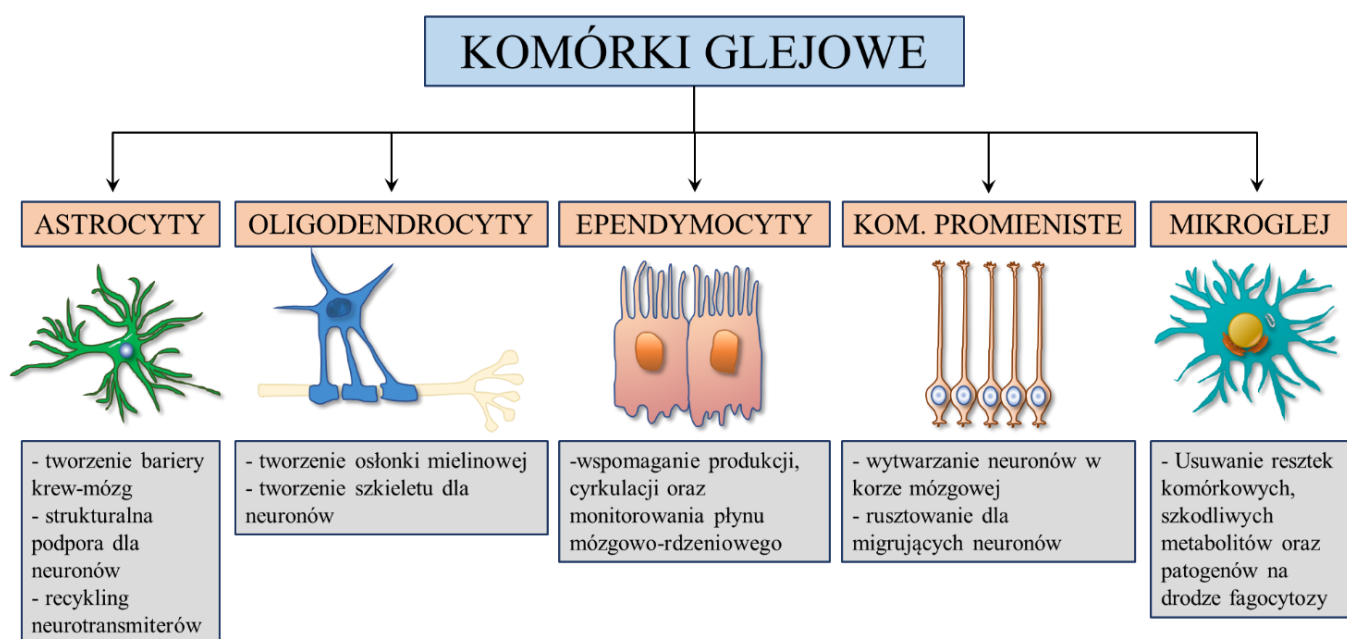
1.1. Tkanka nerwowa

Układ nerwowy człowieka składa się z dwóch części: centralnego układu nerwowego (CUN) obejmującego mózg i rdzeń kręgowy oraz obwodowego układu nerwowego (OUN), w skład którego wchodzi nerwy obwodowe oraz zwoje nerwowe. Mózg jest wyspecjalizowanym narządem i odpowiada za regulację funkcjonowania całego naszego organizmu. Na przekroju czołowym widoczna jest tzw. istota biała oraz istota szara. Istota biała składa się głównie z aksonów otoczonych osłonką mielinową i komórek glejowych, podczas gdy istota szara przede wszystkim z włókien nerwowych z ich aksonami i dendrytami oraz komórek glejowych. Ludzki mózg może zawierać nawet 100 miliardów neuronów i jeszcze więcej komórek glejowych, które tworzą dla nich wyspecjalizowaną podporę (Rysunek 1) [1].



Rysunek 1. Neurony (kolor czerwony) oraz komórki glejowe – astrocyty (kolor szary) [www.janelia.org]

Komórki glejowe (z greckiego γλία - klej), nazywane również neuroglejem, są to nieneuronalne komórki, występujące zarówno w obwodowym jak i centralnym układzie nerwowym. Pełnią one cztery zasadnicze funkcje. Po pierwsze, poprzez otaczanie neuronów, utrzymują je we właściwym miejscu oraz pomagają w ich stabilizacji, po drugie zajmują się dostarczaniem składników odżywczych oraz tlenu, po trzecie mają za zadanie odizolować jeden neuron od drugiego i po czwarte pełnią rolę ochronną i oczyszczającą, niszcząc patogeny i usuwając martwe neurony. W tkance centralnego układu nerwowego wyróżniamy pięć rodzajów komórek glejowych (Rysunek 2): astrocyty, oligodendrocyty, ependymocyty, komórki promieniste oraz mikroglej. Komórki glejowe mają znacznie większą różnorodność i funkcje w porównaniu do neuronów i mogą reagować, a także manipulować neurotransmisją w połączeniach synaptycznych [1]. Rodzaje oraz podstawowe funkcje poszczególnych komórek glejowych zabrano i przedstawiono na Rysunku 2.

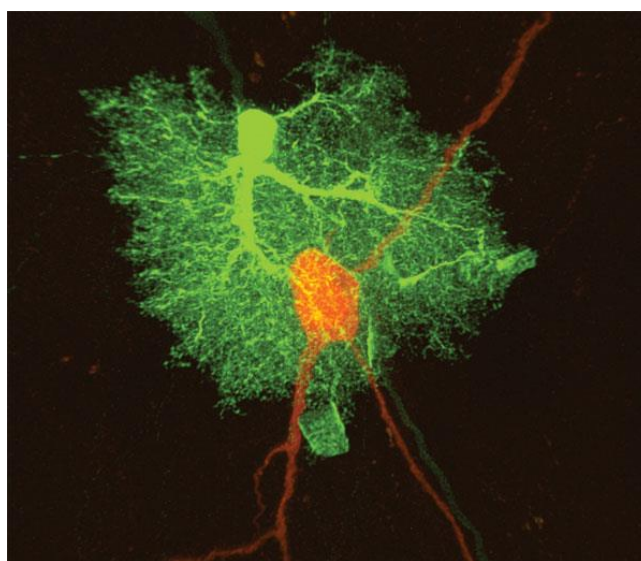


Rysunek 2. Podział komórek glejowych oraz ich funkcje [opracowanie własne]

1.2. Astrocyty

Astrocyty inaczej nazywane astroglejem, stanowią najliczniejszą grupą komórek w centralnym układzie nerwowym. W tkance nerwowej są rozmieszczone równomiernie i nieprzypadkowo. Są one zlokalizowane zazwyczaj w pobliżu neuronów i mogą otaczać synapsy, a czasem nawet przejmować jej rolę. Charakteryzują się centralnie położonym jądrem zawierającym drobnoziarnistą chromatynę oraz stosunkowo małymi jąderkami. Od ciała komórki promieniście odchodzą liczne wypustki, które tworzą strukturę podobną do gwiazdy. Wypustki te pełnią wiele różnych funkcji cytofizjologicznych i przylegają do powierzchni wszystkich głównych obszarów neuronów tj. ciał komórek, aksonów, dendrytów i synaps. Ponadto rozciągają się tworząc płaszczyznę powierzchniową mózgu nazywaną błoną graniczną, która oddziela korę mózgu od opony miękkiej. Dodatkowo otaczają również naczynia włosowate mózgu, a podczas rozwoju indukują komórki śródbłonna do tworzenia ciasnych połączeń. Astrocyty odpowiadają za zachowanie integralności bariery krew-mózg. Odgrywają również ważną rolę w utrzymaniu homeostazy zewnątrzkomórkowego środowiska chemicznego, poprzez pobieranie i usuwanie jonów K^+ uwalnianych przez neurony. Ponadto, biorą udział w zaopatrywaniu neuronów w substancje odżywcze, jak i w odbieraniu od nich i usuwaniu produktów przemiany materii [2].

Ze względu na różnice w morfologii astrocyty dzielimy na dwa typy: protoplazmatyczne (typ I) i włókniste (typ II) (Rys. 3).



Rysunek 3. Dwa rodzaje astrocytów: zielony – typ I astrocyt protoplazmatyczny, czerwony – typ II astrocyt włóknisty [3]

Różnice te związane są m.in. z ilością oraz rodzajem wypustek, a ich kształt oraz liczba zależy od lokalizacji oraz stanu metabolicznego komórki. Astrocyty protoplazmatyczne, zlokalizowane przede wszystkim w istocie szarej. Charakteryzują się one licznymi, grubymi, krótkimi rozgałęzionymi wypustkami, które wydają się tworzyć strukturę gąbki. Zawierają dużą ilość organelli, a na terenie cytoplazmy oraz wypustek zlokalizowane są liczne wiązki włókien pośrednich, zwanych włóknami glejowymi, składającymi się z glejowego białka kwasu fibrylarnego (GFAP, ang. glial fibrillary acid protein). Astrocyty włókniste z kolei obserwowane są głównie w istocie białej. Posiadają one mniejszą ilość wypustek niż typ I, które są długie i mniej rozgałęzione, a także bardziej zróżnicowane morfologicznie. Na elektrogramach zauważalna jest znacznie mniejsza ilość organelli w porównaniu do astrocytów protoplazmatycznych, a także obecność jąder euchromatycznych. Komórki te również mogą posiadać włókna glejowe, jednak ich ilość jest znikoma [2, 3].

1.3. Nowotwory pochodzenia glejowego

Glejaki stanowią grupę najczęściej występujących pierwotnych nowotworów centralnego układu nerwowego i charakteryzują się wysoką złośliwością oraz śmiertelnością. Powstają one na skutek transformacji nowotworowej prawidłowych astrocytów lub glejowych komórek progenitorowych. Rozwijają się one głównie w półkulach mózgowych, jednakże mogą się również pojawiać w pniu mózgu, nerwach wzrokowych, rdzeniu kręgowym oraz w mózdzku. Współczynnik zachorowalności na glejaki na świecie wynosi około 3,7/100 000 osób w przypadku mężczyzn oraz 2,6/100 000 w przypadku kobiet, przy czym współczynnik ten jest wyższy w krajach wysoko rozwiniętych (mężczyźni 5,8 i kobiety 4,1/100 000 osób), niż w krajach rozwijających się (mężczyźni 3,0 i kobiety 2,1/100 000 osób). Przykładowo glejak wielopostaciowy występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet, w odróżnieniu od oponiaków, które pojawiają się dwa razy częściej u kobiet. Istnieją badania sugerujące, że żeńskie hormony mogłyby wpływać protekcyjnie na rozwój niektórych typów nowotworów mózgu, co jednak nie zostało jeszcze do końca potwierdzone. Glejaki charakteryzują się bimodalnym rozkładem wieku wśród chorych. Obserwuje się niewielkie zwiększenie zachorowań u dzieci, stabilny wzrost zapadalności w czasie, od 20 roku życia, aż do szczytu zachorowań który przypada na 75-84 lat. Średnia wieku u osób dorosłych, wynosi 57 lat. Tendencje wiekowe są w dużej mierze uzależnione od rodzaju oraz lokalizacji guza. Prognozy dla pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem nie są dobre, a przeżywalność oscyluje w przedziale od 9

miesiące do 5 lat w zależności od stopnia złośliwości oraz od wieku pacjenta. Na chwilę obecną nie ma skutecznej terapii przeciwko glejakom, dlatego nowotwory te stanowią ważny obiekt badań [4–8].

Podział nowotworów pochodzenia glejowego jest bardzo zróżnicowany i zależy od kryterium klasyfikacyjnego np.: typ komórek, z których się wywodzą, stadium rozwoju, lokalizację, a także tempo rozprzestrzeniania się. Najczęściej stosowanym podziałem, jest ten opracowany przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization), oparty na histologicznej ocenie złośliwości. Okazało się jednak, iż poza specyficznymi cechami histologicznymi, w glejakach obserwuje się zmienność w genie kodującym dehydrogenazę izocytrynianową (IDH, ang. isocitrate dehydrogenase) oraz ko-delecję lub jej brak w 1p/19q. W przypadku IDH mówimy o dwóch rodzajach: IDH typu dzikiego, w którym nie obserwuje się żadnych mutacji w obrębie genu *IDH* (IDH-) oraz IDH+, który posiada mutację w genie *IDH1* i/lub *IDH2*. Z kolei kodelecja w 1p/19q polega na całkowitej delecji zarówno krótkiego ramienia chromosomu 1 (1p), jak i długiego ramienia chromosomu 19 (19q). Na tej podstawie WHO, wyróżniło pięć glejaków rozproszonych: glejaki z IDH+ lub IDH-; gwiaździaki rozproszone lub anaplastyczne z IDH+ lub IDH-; oraz oligodendrogliomy lub oligodendrogliomy anaplastyczne z IDH+ i kodelecją 1p19q. Podział ten uzupełnił czterostopniową skalę złośliwości glejaków (Tabela 1) od łagodnych (stopień I), do najbardziej złośliwych (stopień IV). Nowotwory łagodne (I i II stopień) to zróżnicowana grupa pierwotnych guzów mózgu, charakteryzujących się wolnym tempem wzrostu guza, a komórki nowotworowe wykazują podobieństwo do tych, z których powstały na drodze transformacji. Dotykają one najczęściej pacjentów do 20 roku życia, a ich niższy stopień złośliwości histopatologicznej warunkuje dobre rokowania. Dzięki powolnemu wzrostowi, mogą być usuwane operacyjnie, jeśli zlokalizowane są w łatwo dostępnym miejscu lub z zastosowaniem radio- i/lub chemioterapii [9–12].

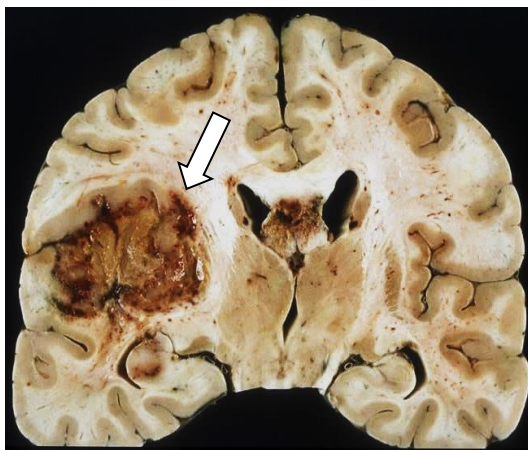
Tabela 1. Klasyfikacja glejaków wg czterostopniowej skali złośliwości

Pochodzenie:	Stopień złośliwości wg klasyfikacji WHO			
	I	II	III	IV
glej gwiaździsty	gwiaździak włosowatokomórkowy	gwiaździak	gwiaździak anaplastyczny	glejak wielopostaciowy
skąpowypustkowe	—	skąpodrzewiak	skąpodrzewiak anaplastyczny	—
wyściółkowe	podwyściółczak	wyściółczak	wyściółczak anaplastyczny	—
gwiaździste i skąpowypustkowe	—	glejak mieszany	glejak mieszany anaplastyczny	—

Z kolei glejaki złośliwe (III i IV stopień wg. aktualnej klasyfikacji WHO), są najczęstszym typem nowotworów mózgu. Są one agresywnymi, wysoce inwazyjnymi i neurologicznie destrukcyjnymi schorzeniami uważanymi za jedno z najgroźniejszych spośród ludzkich nowotworów. Charakteryzują się bardzo intensywnym wzrostem guza, martwiczym rdzeniem, a także dużym potencjałem migracyjnym, przez co są w stanie w bardzo krótkim czasie dokonać inwazji sąsiednich, zdrowych tkanek mózgu. Prędkość migracji najbardziej złośliwych form (np. glejaka wielopostaciowego) może wynosić nawet $0,5 \pm 0,07 \mu\text{m}/\text{min}$, co daje około 0,1 mm na dobę. Przykładami glejaków złośliwych stopnia III są anaplastyczne postacie gwiaździaka, oligodendrogleju i oligoastrocytoma, natomiast najczęściej obserwowanym glejakiem stopnia IV jest glejak wielopostaciowy [4, 13].

1.3.1. Gwiaździak anaplastyczny - III^o

Gwiaździak anaplastyczny (AA, ang. anaplastic astrocytoma (Rysunek 4)) jest złośliwym nowotworem mózgu, sklasyfikowanym przez Światową Organizację Zdrowia jako III stadium glejaka.



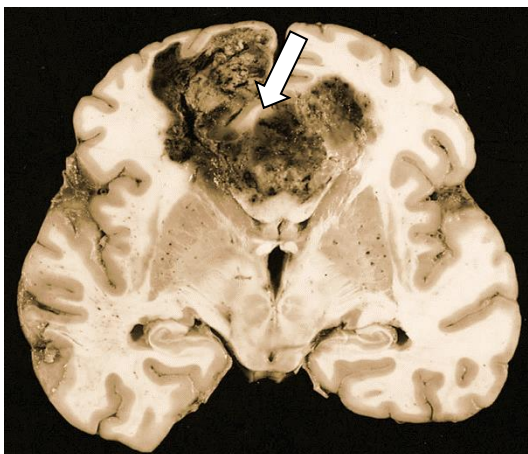
Rysunek 4. Przekrój poprzeczny mózgu z widocznym guzem nowotworowym (biała strzałka) gwiaździaka anaplastycznego [NeuroscienceNews]

Stanowi on około 17% przypadków glejaka u osób dorosłych, z czego większość z nich (ponad 70%) posiada mutację w genach *IDH1* oraz *IDH2*, a szczyt zachorowań przypada między 40 a 50 rokiem życia. Rokowania pacjentów ze zdiagnozowanym gwiaździakiem anaplastycznym są złe, a przeżywalność wynosi od 2 do 5 lat, przy czym 5 lat dożywa: 49% pacjentów w przedziale wiekowym 22-44 lata, 29% w przedziale 45-54 i jedynie 10% pacjentów powyżej 55 roku życia. U pacjentów z AA najczęściej obserwuje się ogólne objawy neurologiczne, które zależą od anatomicznej lokalizacji guza. Przykładem mogą być: ogólne osłabienie, utrata czucia, zaburzenia w mowie, widzeniu oraz czynnościach lokomotorycznych. Ponadto mogą wystąpić inne objawy takie jak: zmiany osobowości, drgawki, czy silne migreny. Obrazowanie guza z użyciem magnetycznego rezonansu jądrowego uwidacznia jego nieostre brzegi z widocznym, naciekającym na sąsiednie zdrowe tkanki obrzękiem naczynioruchowym. Dodatkowo, w obrębie guza można wyróżnić rdzeń nekrotyczny, który stanowi jego większość oraz komórki otaczające o wysokim potencjale proliferacyjnym i migracyjnym [5, 14, 15]. Dodatkowo uwalniane w procesie tworzenia rdzenia zwiększają złośliwy charakter komórek

warstwy zewnętrznej. Komórki gwiaździsta anaplastycznego powstają z astrocytów i charakteryzują się anaplazją komórkową oraz bardzo intensywną aktywnością mitotyczną. Nowotwór ten w większości, bo w około $\frac{3}{4}$ przypadków, rozwija się ze wcześniejszych stadiów (I^o i II^o) w procesie transformacji, w konsekwencji licznych mutacji genów kodujących białka systemów naprawczych i tzw. regulatorowych, które kontrolują proliferację i różnicowanie się komórek. U pozostałych pacjentów guz nowotworowy powstaje *de novo* (Rysunek 7.). Przykładem mechanizmów transformacji nowotworowej AA mogą być mutacje genów *TP53* (ang. tumor protein 53), *LOH* (ang. loss of heterozygosity), czy *CDK4* (ang. cyclin-dependent kinase 4). Każdy z nich koduje ważne białka regulatorowe, np. gen *TP53* koduje białko p53, które jest nazywane „strażnikiem genomu” i jest to czynnik transkrypcyjny o właściwościach supresora nowotworowego. Białko to ma za zadanie aktywację mechanizmów naprawy DNA lub indukcji apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA w komórce, a jego mutacja prowadzi do transformacji nowotworowej. Z kolei *LOH* jest częstym zjawiskiem genetycznym biorącym udział w somatycznej utracie alleli genu supresorowego, co powoduje progresję wielu dziedzicznych nowotworów. *CDK4* natomiast, jest to białko odpowiedzialne za regulację przejścia fazy G1 do S cyklu komórkowego i zalicza się go do onkogenów. Już nawet pojedyncza mutacja w genie *CDK4* może stanowić podstawę mechanizmu kancerogenezy [16–19].

1.3.2. Glejak wielopostaciowy - IV^o

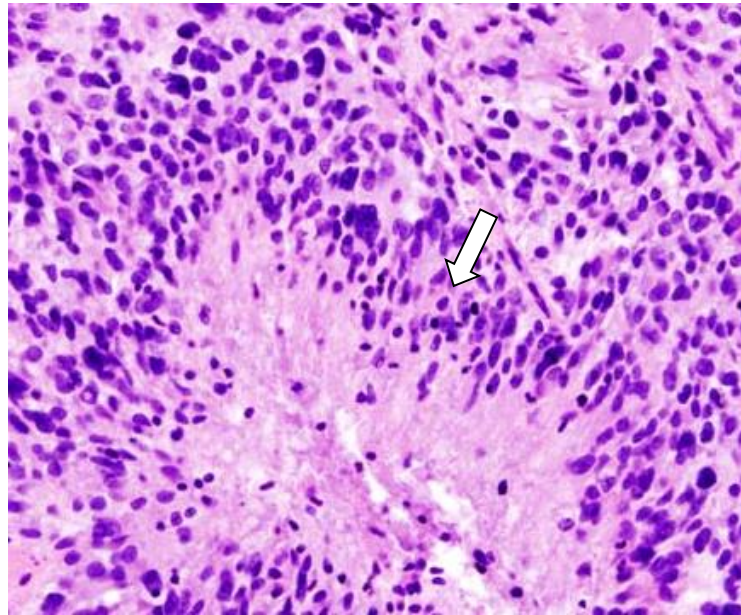
Najczęściej obserwowanym rodzajem glejaka, bo aż w połowie przypadków, jest glejak wielopostaciowy – GBM (ang. glioblastoma multiforme (Rysunek 5)).



Rysunek 5. Zdjęcia przedstawiające przekrój poprzeczny mózgu z widocznym guzem nowotworowym (biała strzałka): glejaka wielopostaciowego [NeuroscienceNews]

Jest to najbardziej złośliwa i jednocześnie najgorzej rokująca odmiana nowotworu. Średni czas przeżycia pacjentów wynosi od 12 do 18 miesięcy, przy czym jedynie 25% pacjentów przeżywa dłużej niż rok, a tylko znikomy odsetek (poniżej 5%) przeżywa dłużej niż 2 lata. U pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem wielopostaciowym obserwuje się najczęściej ogniskowe objawy neurologiczne, napady drgawkowe oraz objawy związane ze wzrostem ciśnienia śródczaszkowego. Rzadziej dochodzi do krwotoku śródnawotworowego, a pacjenci wykazują wówczas ostre objawy podobne do udaru. GBM może się rozwinąć *de novo*, wówczas mówimy o glejaku pierwszorzędowym, inaczej pierwotnym, lub rozwijać się stopniowo z glejaków o niższym stopniu złośliwości. Jest wówczas określany mianem drugorzędowego (wtórnego), przy czym pierwotna odmiana stanowi aż 95% przypadków (Rysunek 7) [20, 21]. Pod względem histopatologicznym oba rodzaje charakteryzują się bardzo wysokim wskaźnikiem proliferacji, swoistym unaczynieniem spowodowanym intensyfikacją procesów neoangiogenezy oraz obecnością tzw. struktur Scherera. Są to morfologiczne wzorce migracji komórek glejaka, z masy guza do sąsiednich tkanek wykorzystując anatomiczne struktury takie jak nerwy, naczynia krwionośne opona miękka, czy istota biała [22]. Świadczy to o wysokim potencjale migracyjnym komórek glejaka, gdyż uważa się, że w ten sposób naśladują one kluczowe wewnątrzkomórkowe

procesy zarówno proliferacji, jak i migracji zachodzące w nerwowych komórkach macierzystych lub glejowych komórkach progenitorowych w rozwijającym się ośrodkowym układzie nerwowym. Podobne struktury są również obserwowane w gwiaździaku anaplastycznym, jednak w mniejszym stopniu. Dodatkowo, bardzo typowym zjawiskiem dla glejaka wielopostaciowego jest występowanie skupisk komórek ułożonych palisadowo wokół rdzenia nekrotycznego, który obserwowany jest także w przypadku AA (Rysunek 6.) [4].



Rysunek 6. Palisadowy układ komórek nowotworowych (biała strzałka) wokół rdzenia martwiczego w glejaku wielopostaciowym (barwienie hematoksyliną–eozyną)

Na poziomie molekularnym, transformacja nowotworowa prawidłowych astrocytów, bardzo często, związana jest z mutacjami genów kodujących receptory błonowe. U większości pacjentów (około 90%) obserwuje się zaburzenia w przekazywaniu sygnału od błony do jądra komórkowego poprzez receptory: naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna VEGFR (ang. vascular endothelial growth factor receptor) oraz płytkowego czynnika wzrostu PDGFR (ang. platelet-derived growth factor receptor). VEGFR jest ważnym białkiem sygnalizacyjnym zaangażowanym w m.in. w proces angiogenezy (wzrost naczyń krwionośnych). Z kolei PDGFR jest ważnym czynnikiem regulującym proliferację, różnicowanie się, czy przeżywanie komórek [23–25]. Ponadto, podobnie jak w przypadku gwiaździaka anaplastycznego, transformacja nowotworowa komórek glejaka wielopostaciowego może zostać zaindukowana mutacjami genów *TP53* oraz *LOH*.

Dokładne czynniki molekularne powstawania GBM oraz AA zostaną szerzej opisane w następnym rozdziale.

1.4. Czynniki etiologiczne glejaków

Aby zrozumieć dokładną patofizjologię glejaków, należy spojrzeć na ważne aspekty wynikające z cech histologicznych i molekularnych, które obejmują pytania: dlaczego nowotwory niższego stopnia przekształcają się w guzy bardziej złośliwe, jakie szlaki genetyczne warunkują transformację nowotworową oraz jakie mechanizmy molekularne są przyczyną oporności na leczenie glejaków III i IV stadium. Niestety czynniki, które leżą u podłoża rozwoju glejaków, niestety, wciąż nie są do końca wyjaśnione. Kluczową rolę mogą odgrywać zarówno czynniki endogenne (wrodzone), jak i czynniki egzogenne (środowiskowe). Warto zwrócić uwagę, że wpływ na rozwój glejaków mogą mieć różne aspekty takie jak: wiek, płeć, położenie geograficzne, przynależność do różnych grup etnicznych, czynniki genetyczne, ekspozycja na czynniki biologiczne (infekcje), fizyczne (np. promieniowanie jonizujące), czy niektóre chemiczne [5, 26].

1.4.1. Czynniki egzogenne

Glejaki, jak każde inne nowotwory mogą powstawać pod wpływem indukcji różnych czynników środowiskowych związanych z coraz większym tempem naszego życia, nieprawidłową dietą, degradacją środowiska i zanieczyszczeniami jakie ze sobą niesie oraz infekcje wirusowe i bakteryjne.

Nie bez znaczenia jest położenie geograficzne oraz stopień industrializacji. Zaobserwowano, że występowanie glejaków złośliwych jest wyższe w krajach z lepiej dostępną i rozwiniętą opieką medyczną, jak np. w Europie Północnej, czy w Stanach Zjednoczonych. Dla porównania Indie, czy Filipiny mają najniższy do tej pory odnotowany wskaźnik nowotworów mózgu, co może być spowodowane niskim poziomem służby zdrowia w tych krajach i dostępem podstawowej diagnostyki dla pacjentów. Co ciekawe, występowanie złośliwych nowotworów mózgu w Japonii jest mniejsze, i to o połowę, niż w Europie Północnej. Można również zaobserwować, że glejaki atakują częściej rasę Kaukaską, niż pozostałe. Jednak przyczyna tych różnic na chwilę obecną nie jest jeszcze do końca poznana. Czynnikiem, który podnosi ryzyko zachorowania na glejaki, a który wiąże się również z położeniem geograficznym oraz stylem życia jest dieta. Spożywanie dużych ilości przetworzonego mięsa, palenie papierosów oraz małe ilości przyjmowanych z pokarmem witamin (np. witaminy E) mogą w dużym stopniu przyczynić się do rozwoju

nowotworów mózgu. Związek z tym mają najprawdopodobniej N-nitrozo związki np. etylnitrozomocznik i metylo-nitrozomocznik, które oprócz mutagennych właściwości posiadają zdolność do przenikania bariery krew- mózg, co powoduje, że są idealnymi czynnikami inicjującymi proces kancerogenezy. Również silna i postępująca degradacja środowiska może przyczynić się do rozwoju glejaków. Generowane ogromne ilości odpadów chemicznych oraz zanieczyszczenia powietrza (np. popularny ostatnio smog) mogą powodować nagromadzenie się licznych mutacji prowadzących do transformacji zdrowych komórek w nowotworowe. Ponadto, WHO wraz z innymi organizacjami, prowadzą badania nad wpływem rozwoju technologii telefonii komórkowej na rozwój nowotworów mózgu. Jednakże, na chwilę obecną rezultaty badań są niejednoznaczne. Kolejnym z czynników ryzyka jest promieniowanie jonizujące, które może powodować trwale uszkodzenia DNA w komórce i przyczynić się do rozwoju nowotworów złośliwych. Podobne zmiany może wywołać radioterapia. Zaobserwowano bowiem, że niska dawka promieniowania użyta do leczenia grzybicy skóry i skórniego naczyń krwionośnego u dzieci wiązała się z podwyższonym ryzykiem rozwoju oponiaków i glejaków. Wzrost występowania nowotworów mózgu odnotowano również u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną, którzy byli poddawani naświetlaniu [6, 7, 27].

1.4.2. Czynniki endogenne

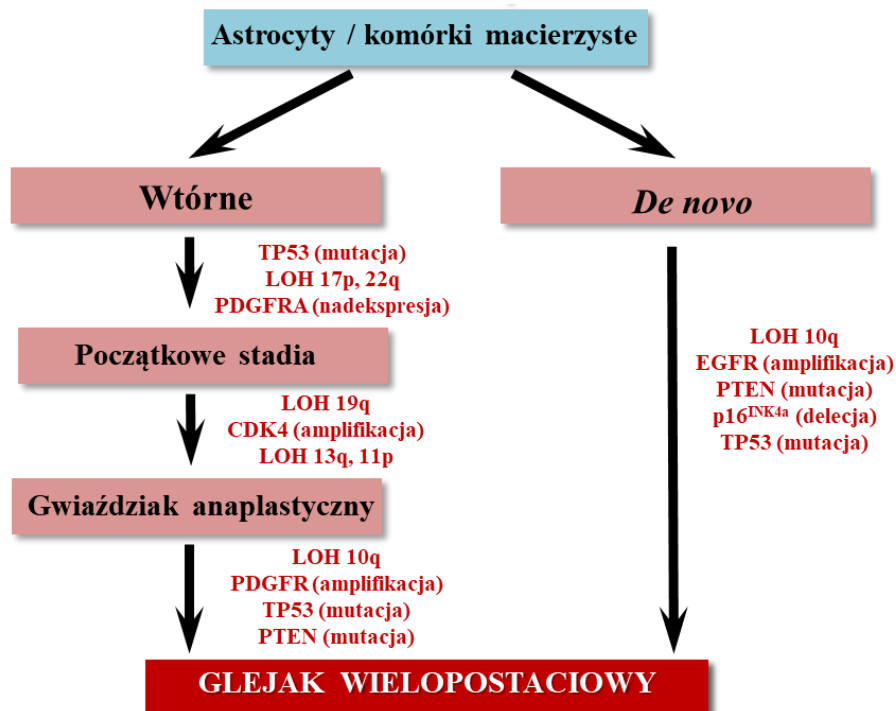
Wszystkie wyżej opisane czynniki egzogenne wywierają pośredni lub bezpośredni wpływ na czynniki endogenne, które również warunkują rozwój nowotworów mózgu.

Największy wpływ na transformację nowotworową astrocytów w komórki glejaków ma nagromadzenie różnego rodzaju mutacji (Rysunek 7), zarówno tych wrodzonych, jak i wywołanych przez czynniki środowiskowe. Zaobserwowano zwiększone występowanie nowotworów mózgu jako schorzeń towarzyszących niektórym chorobom genetycznym. Przykładem może być zespół von Hippel-Lindau. Jest to choroba dziedziczona autosomalnie dominująco. Wiąże się z mutacją germinálną genu supresorowego kodującego białko von Hippel-Lindau na chromosomie 3. Jest to przykład opisanej wcześniej utraty heterozygotyczności LOH i prowadzi ona do powstawania licznych nowotworów, w tym również centralnego układu nerwowego[16].

Innym przykładem może być Zespół Li-Fraumeni, związany z mutacją w genie *TP53*. Progresja glejaka wielopostaciowego może być skorelowana z zespołem Turcota. Schorzenie to jest związane z mutacją genu supresorowego *APC* (ang. adenomatous

polyposis coli), co prowadzi do pobudzenia podziałów, migracji, adhezji oraz różnicowania się komórek, a także hamuje proces apoptozy. Glejaki zależne od wymienionych chorób genetycznych częściej występują u dzieci lub młodych dorosłych, natomiast są rzadko diagnozowane u osób w późniejszym okresie życia [18, 28].

Wśród czynników genetycznych, bezpośrednio przyczyniających się do transformacji glejaków, najczęściej, bo u 30% pacjentów z GBM, obserwuje się zahamowanie ekspresji genu supresorowego *PTEN* (ang. phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10). Białko PTEN jest fosfatazą, której funkcją jest odłączanie reszt fosforanowych od cząsteczek lipidów błony komórkowej. Jest ono antagonistą kinazy 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K), a co za tym idzie inhibitorem wewnątrzkomórkowego szlaku PI3K-Akt/PKB-mTOR. Posiada aktywność fosfodiesterazy, odłączającej grupy 3'-fosforanowe od (3,4,5)-trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP3), co prowadzi do powstania (4,5)-fosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2), zatrzymania podziału komórki i jej apoptozy. Z kolei w przypadku gwiaździka anaplastycznego u ponad 70% pacjentów obserwuje się mutacje w genie *ATRX* (ang. alpha-thalassemia X-linked mental retardation), prowadzące do obniżenia jego ekspresji. *ATRX* jest bardzo ważnym regulatorem transkrypcji. Bierze on udział przy włączaniu histonów H3.3 do regionów telomerowych chromosomów i jest jednym z mechanizmów utrzymywania telomerów. Wykazano, że mutacja ta powoduje różnorodne zmiany w strukturze DNA, co ma związek z przebudową chromatyny, metylacją DNA i ekspresją onkogenów w progresji AA. Zarówno w gwiaździku anaplastycznym i glejaku wielopostaciowym, obserwuje się wspomniane wcześniej aberracje *IDH1* i *IDH2*, które odgrywają kluczową rolę w patogenezie tych nowotworów. Są to enzymy, które katalizują oksydacyjną dekarboksylację izocytrynianu z wytworzeniem α -ketoglutaranu. Podczas tego procesu powstaje fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego NADPH (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), który w nowotworach mózgu ma kluczowe znaczenie w funkcjonowaniu cytochromu P450 oraz produkcji szkodliwego tlenu azotu i reaktywnych form tlenu, które dodatkowo mogą promować proces kancerogenezy. Przytłaczająca większość (95%) obserwowanych mutacji genów *IDH* w glejakach to mutacje genotypu *R132H IDH1*, co skutkuje powstaniem nowego fenotypu, w którym enzymy IDH wytwarzają znaczne ilości ubocznego produktu metabolicznego: 2-hydroksyglutaranu, którego w normalnych warunkach jest niewiele [9, 29–31].



Rysunek 7. Schemat transformacji nowotworowej komórek glejowych oraz mutacje jej towarzyszące [opracowanie własne]

1.5. Molekularne mechanizmy transformacji glejaków

Rozwój i progresja glejaków nie są uwarunkowane jedynie nagromadzeniem mutacji w komórkach glejowych. Podejrzewa się dwie ścieżki procesu transformacji nowotworowej. Pierwsza dotyczy opisanych wcześniej zmian genetycznych, prowadzących do powstawania i rozwoju złośliwych glejaków zarówno *de novo* jak i w procesie przekształcania się niższych stadiów. Druga odnosi się do występowania zaburzeń spowodowanych nadekspresją wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału przeżycia. Dokładne poznanie molekularnych procesów transformacji astrocytów w nowotworowe komórki glejaków złośliwych pomoże przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów ich oporności na leczenie [5, 22].

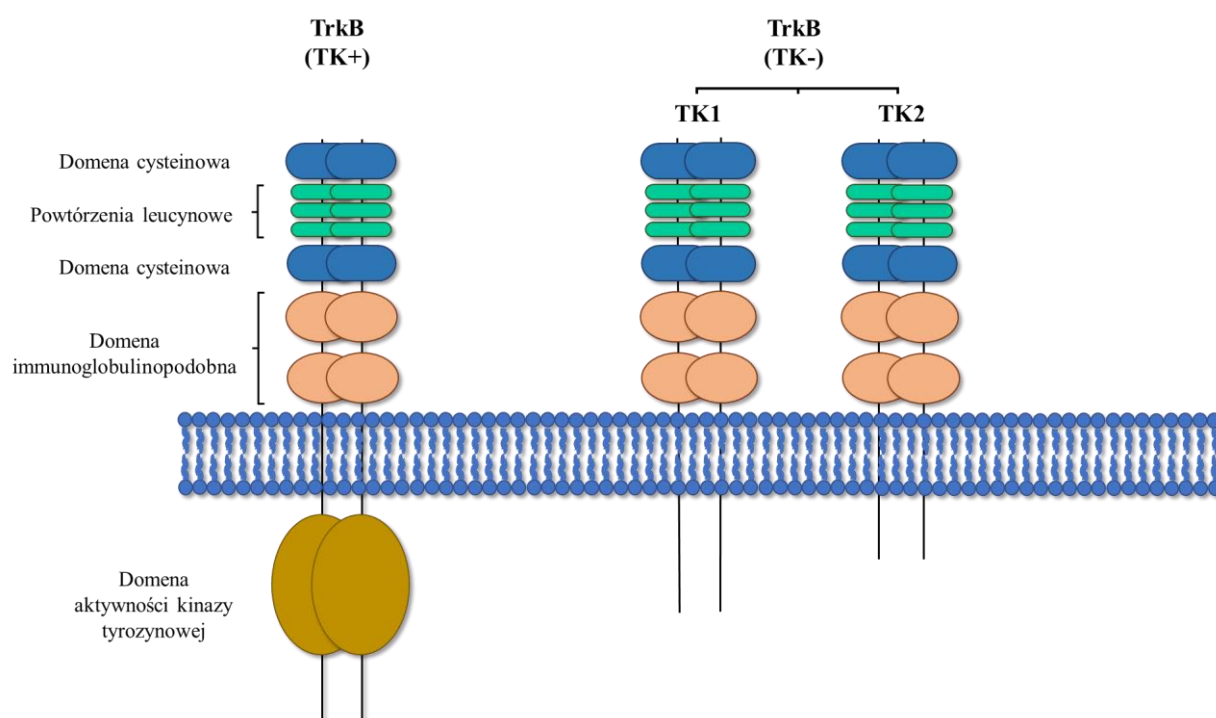
W chorobach neurodegeneracyjnych w tym w nowotworach mózgu, obserwuje się nadekspresję różnych białek, odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału w komórkach od błony do jądra. Należą do nich m.in. wspomniane wcześniej VEGF czy PDGF. Przykładem receptora, którego nadaktywność jest bardzo często obserwowana w glejakach jest receptor TrkB (ang. tyrosine receptor kinase B). Jego konstytutywne pobudzenie przez

liczne ligandy powoduje, w konsekwencji do stałego przekazywania sygnału przeżycia do jądra komórkowego, co inicjuje proces transformacji nowotworowej [32, 33].

1.5.1. Wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnału przeżycia regulowane przez receptor TrkB

Tyrozynowy receptor kinazy B – TrkB, jest transbłonowym receptorem czynników wzrostu, kodowanym przez gen *NTRK2* w ludzkich komórkach nerwowych i należy do rodziny kinaz NTRK (ang. neurotrophic tyrosine receptor kinases). Zalicza się tu również receptory TrkA oraz TrkC, jednakże udział form A i C w patogenezie glejaków jest znikomy. Receptor TrkB może zostać aktywowany przez m.in. neurotrofiny, w szczególności NT-3 (ang. neurotrophin-3) oraz NT-4 (ang. neurotrophin-4) [34].

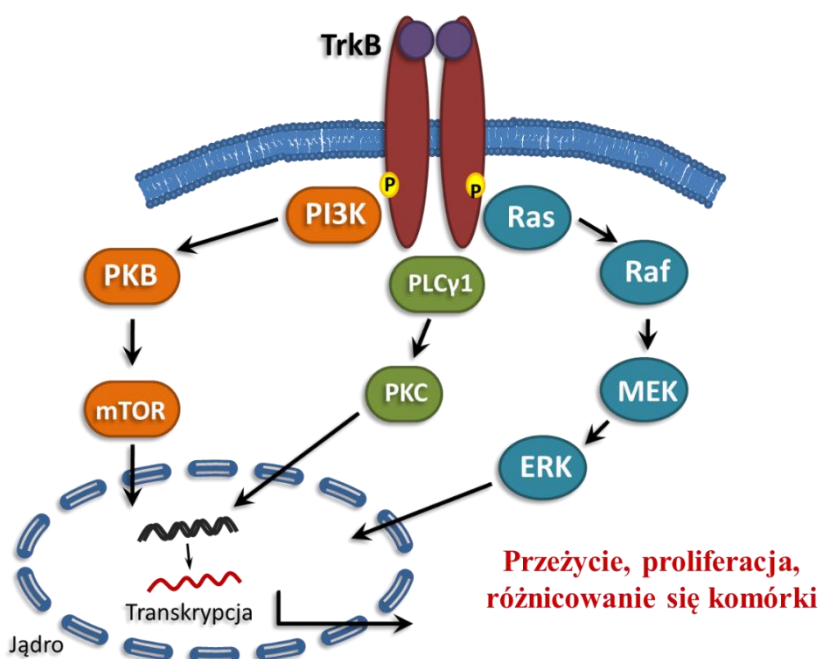
Na chwilę obecną rozróżnia się trzy izoformy receptora TrkB: długołańcuchową (TK+) oraz dwie krótkołańcuchowe (TK-: TK1 i TK2) (Rysunek 8). Najbardziej typową budowę reprezentuje forma TK+ i występuje ona najczęściej w ludzkim układzie nerwowym.



Rysunek 8. Struktury aminokwasowe izoform receptora TrkB. TrkB pełnołańcuchowa – TK+ oraz dwie krótkołańcuchowe TK- (TK1 i TK2). Domena zewnątrzkomórkowa bogata w cysteinę i w leucynę oraz dwie domeny podobne do immunoglobulin, domena transbłonowa w przypadku TK+ o aktywności kinazy tyrozynowej [opracowanie własne].

Forma długołańcuchowa (TK+) zbudowana jest z dwóch części: nadbłonowej, w skład której wchodzi dwie domeny cysteinowe oddzielone powtórzeniami leucynowymi oraz domena immunoglobulinopodobna jak również domeny podbłonowej o aktywności kinazy tyrozynowej. Część nadbłonowa jest wspólna dla pozostałych izoform (TK1 i TK2), ale nie posiadają one aktywnej domeny podbłonowej, która przekazuje sygnał od pobudzonego receptora do jądra komórkowego poprzez wewnątrzkomórkowe szlaki zależne od kaskady kinaz. W komórkach centralnego układu nerwowego receptor TrkB dzięki interakcji z neurotrofinami 3 i 4 reguluje m.in. przeżywanie i różnicowanie się neuronów [33, 35, 36].

Zaobserwowano, że złośliwy charakter glejaków III i IV stopnia, może być związany z przekazywaniem ciągłego sygnału przeżycia od TrkB poprzez szlaki: PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK oraz PLC γ 1-PKC (Rysunek 9), które odpowiedzialne są m.in. za kontrolowanie: cyklu komórkowego, proliferacji, różnicowania się, czy przeżywania neuronów i komórek glejowych w centralnym układzie nerwowym. Konstytutywne pobudzenie receptora, i nieprzerwane przekazywanie sygnału poprzez wyżej wymienione szlaki do jądra komórkowego, prowadzi do nadmiernej i niekontrolowanej proliferacji, co powoduje powstawanie błędów w DNA, które powielone kumulują się i nie są naprawiane przez systemy naprawcze. To z kolei prowadzi do nagromadzenia mutacji, które warunkują transformację prawidłowej komórki gleju w nowotworową [28, 32–34].



Rysunek 9. Przekazywanie sygnału przeżycia poprzez szlak TrkB i podległe mu szlaki: PI3K/PKB/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK oraz PLC γ 1/PKC [opracowanie własne].

Przykładem molekularnego szlaku przeżywania, ulegającego nadekspresji w glejakach jest PI3K-Akt/PKB-mTOR. Kontroluje on cykl komórkowy, a także takie procesy jak różnicowanie się oraz przeżywanie komórek. Wzmoczona aktywacja tego szlaku w procesie nowotworzenia spowodowana jest wieloma czynnikami. Bardzo często są to czynniki wzrostowe np. czynnik wzrostowy naskórka EGF (ang. epidermal growth factor), składniki odżywcze oraz związki zewnętrzne działające mutagennie. Pierwsze z białek szlaku kinaza 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K) należy do grupy enzymów, które katalizują podstawowe funkcje życiowe komórki np.: wzrost, proliferacja czy transport wewnątrzkomórkowy. Są to kinazy lipidowe wykazujące zdolność do fosforylacji grupy – OH w pierścieniu fosfatydyloinozytolu. Określa się je mianem heterodimerów, ponieważ w ich budowie można wyodrębnić jednostkę katalityczną oraz regulatorową. Kinazy PI3K zostały podzielone na 3 klasy ze względu na ich budowę, swoistość wobec substratu, a także rodzaj podjednostki regulatorowej. PI3K klasy I katalizują konwersję PIP2 do PIP3. Klasa ta jest podzielona na podgrupy IA i IB pod względem podobieństwa sekwencji. PI3K klasy IA składają się z heterodimeru, zawierającego podjednostkę katalityczną p110 i podjednostkę regulatorową p85. Istnieje pięć rodzajów podjednostki regulatorowej p85 α , p55 α , p50 α , p85 β i p55 γ oraz trzy warianty podjednostki katalitycznej p110 α , β i δ . Pierwsze dwie izoformy (α i β) ulegają największej nadekspresji w komórkach glejaków. Klasa II PI3K różni się od klasy I swoją budową i funkcją. Posiada ona na C-końcu domenę katalityczną C2 i wyróżnia się jej trzy izoformy (C2 α , C2 β i C2 γ). Jednakże, w przeciwieństwie do klas I i III, nie obserwuje się w niej domeny regulatorowej. PI3K klasy II regulują przekształcanie PIP do PIP2. Klasa III jest strukturalnie podobna do I, gdyż charakteryzuje się posiadaniem zarówno podjednostki katalitycznej jak i regulatorowej [30, 31, 37, 38].

Pobudzony PI3K powoduje ufosforylowanie PIP2 do PIP3, co fosforyluje i aktywuje z kolei Akt/PKB – kinazę białkową typu B (ang. protein kinase B). PI3K posiada naturalny inhibitor - PTEN, którego funkcją, jak już wspomniano, jest ograniczenie proliferacji oraz indukcja apoptozy, co pomaga w zapobieganiu rozwojowi nowotworu. PKB jest białkiem enzymatycznym, specyficznym wobec seryny oraz treoniny. Reguluje ono szereg procesów komórkowych związanych z metabolizmem, podziałami komórkowymi czy zaprogramowaną śmiercią komórkową - apoptozą. U człowieka możemy wyróżnić trzy izoformy Akt/PKB:

- PKB α (Akt1) – występuje w mózgu, sercu i płucach

- PKB β (Akt2) – występuje w mięśniach szkieletowych
- PKB γ (Akt3) – podobnie jak izoforma α występuje w mózgu i sercu, ale także w nerkach embrionów

Nadaktywność tej kinazy jest jednym z najczęstszych czynników procesu nowotworzenia. Wzmoczoną ekspresję obserwuje się w takich nowotworach jak rak jajnika, prostaty czy trzustki. W komórkach glejaków mutacje w genach kodujących PI3K lub PTEN powodują stałą fosforylację Akt/PKB, co z kolei powoduje ciągłe pobudzenie mTOR (następnego elementu szlaku). Nadekspresja tej kinazy może również prowadzić do degradacji białka p53, jednocześnie ograniczając inicjację zaprogramowanej śmierci poprzez pośrednią aktywację kinazy rybosomalnej S6 w celu promowania proliferacji komórek, a przy udziale anti-apoptotycznego białka Bcl-2, hamować inicjację apoptozy. Ostatnim elementem szlaku jest mTOR - ssaczy cel rapamycyny (ang. mammalian target of rapamycin). Jest to kinaza serynowo-treoninowa, której gen kodujący zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 1. Enzym ten pobudza przekazywanie sygnału wewnątrzkomórkowego w komórce, a także jest bardzo istotnym przełącznikiem pomiędzy katabolizmem a anabolizmem komórkowym. Kinaza ta występuje w dwóch kompleksach białkowych. Pierwszy z nich mTORC1 składa się z kinazy mTOR, białka raptor (ang. regulatory associated protein of mTOR) i białka mLST8/G β L (ang. mammalian LST8/G- β -subunit like protein). Jest on regulatorem syntezy białek oraz jest czujnikiem związków ATP, których niski poziom w komórce hamuje jego aktywność. Drugi, mTORC2 składa się z kinazy mTOR, białka rictor (ang. rapamycin-insensitive companion of mTOR), białka G β L oraz białka związanego z aktywowaną stresem kinazą białkową ssaków mSIN1 (ang. mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1). Posiada on aktywność kinazy białkowej typu D, której zadaniem jest fosforylacja reszty serynowej S473 kinazy Akt/PKB w celu jej aktywowania. Stanowi on istotny czynnik regulujący reorganizację cytoszkieletu poprzez interakcje z jego białkami. Kinaza mTOR odgrywa także kluczową rolę w koordynacji równowagi pomiędzy proliferacją, a śmiercią komórek, w odpowiedzi na stan odżywienia, czynniki wzrostowe i sygnały stresu [31, 39–41].

Kolejnym szlakiem regulowanym przez receptor TrkB, którego nadmierna aktywacja jest często obserwowana w glejakach jest szlak Ras-Raf-MEK-ERK. Jest to kluczowy szlak ścieżki sygnalizacji, konserwatywnie wykorzystywanej przez komórki ssaków do wzrostu i proliferacji. Mutacje poszczególnych składników tej ścieżki prowadzą do niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych. Jest on także

zaangażowany w kontrolowanie cyklu komórkowego, gojenie się ran, czy migrację komórek. Może on również stymulować proces neoangiogenezy poprzez zmiany w ekspresji genów bezpośrednio zaangażowanych w tworzenie nowych naczyń [22, 23, 42].

Pierwszym elementem szlaku, jest białko Ras, które wykazuje powinowactwo do trifosforanu guanozyny (GTP), które są odpowiedzialne za regulację m.in. różnicowania się komórek, czy reorganizację cytoszkieletu. Białko Ras składa się z dwóch części: domeny G, która wiąże nukleotydy guanozyny oraz domeny na C-końcu, która umożliwia wiązanie się tego białka z błoną. Jest ono początkowo syntetyzowane jako nieaktywny pro-peptyd. Następnie, ulegając serii potranslacyjnych modyfikacji na końcu karboksylowym, lokalizuje się przy bogatej w lipidy błonie komórkowej. Białko Ras, przyłączone do błony może wchodzić w reakcję z difosforanem guanozyny (GDP) lub GTP, co stanowi mechanizm jego aktywacji, pobudzając w ten sposób szereg kinaz efektorowych. Z kolei zmodyfikowana konformacja zmutowanego Ras, które, często obserwowane w glejakach, wykazuje zwiększone powinowactwo do GTP, a co za tym idzie do aktywowania dalszych elementów szlaku nawet przy braku stymulacji czynnikiem wzrostu, powodując agresywny rozrost guza [28, 43, 44].

Do najlepiej scharakteryzowanych efektorów Ras należy kinaza Raf z rodziny kinaz serynowo-treoninowych, kodowanych przez gen *Raf* znajdujący się na chromosomie 3. Jest to białko posiadające w swojej budowie kilka domen, które ułatwiają regulację jego aktywności katalitycznej. Na N-końcu enzymu znajdują się: domena RBD (ang. Ras-binding domain), która wiąże Ras sprzęgnięty z GTP oraz domena C1. Aktywacja Raf stymuluje kaskadę sygnałową poprzez fosforylację kinaz aktywowanych mitogenami – MAPK. Przykładem takiego białka, a za razem kolejnym elementem szlaku jest regulowany czynnikiem zewnątrzpochoodnymi ERK (ang. extracellllular signal-regulated kinases). Głównymi białkami z tej grupy są ERK1 i ERK2, które fosforylują i aktywują szereg jądrowych czynników transkrypcyjnych, w tym *Elk-1*, *c-Ets1*, *c-Ets2*, a także enzymów jak MNK1 (ang. MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1) oraz MNK2 (ang. MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2). Te ostatnie są kinazami białkowymi, które bezpośrednio fosforylowane i aktywowane przez ERK biorą udział w regulacji syntezy białka w komórce [13, 45, 46].

Ostatnim elementem szlaku jest kinaza MEK (ang. MAPK/ERK Kinase). Jest to serynowo-treoninowe białko, które zostaje aktywowana w odpowiedzi na wiele sygnałów,

w tym czynniki wzrostu i/lub cytokiny. Ma to na celu promowanie przeżycia komórek lub ich śmierci na drodze apoptozy. Odpowiedź na bodźce stresowe (np. stan zapalny), czy NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) jest regulowana przez szereg mediatorów, np. kinazę JNK (ang. c-Jun N-terminal kinase) i kinazę SAPK (ang. stress-activated protein kinase). Wiele z docelowych białek MEK oraz ERK zaangażowanych jest w indukowaną przez Ras transformację nowotworową komórek [13, 44, 47].

Kolejnym szlakiem, regulowanym przez receptor TrkB, który bierze kluczową rolę w progresji glejaków jest szlak zależny od fosfolipazy $C\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$), a mianowicie szlak PLC $\gamma 1$ -PKC. PLC $\gamma 1$ jest enzymem należącym do rodziny fosfolipaz C (PLC – ang. phospholipase C). Białka z tej rodziny są modulatorami lipidów wewnątrzkomórkowych PIP i biorą udział w wielu kaskadach przekazywania sygnału w komórkach. Fizjologicznie kontrolują one m.in. aktywację proliferacji komórek w odpowiedzi na czynniki wzrostu, takie jak EGFR i PDGFR, a ponadto kontrolują proces kształtowania się komórek nerwowych oraz przeżywania neuronów. Na chwilę obecną wyróżnia się 13 izoform PLC u ssaków i zostały one podzielone na sześć podtypów: $\beta(1-4)$, $\gamma(1,2)$, $\delta(1,3,4)$, ϵ , ζ oraz $\eta(1,2)$. Jedną z izoform jest PLC $\gamma 1$, która składa się z rdzenia enzymatycznego o kształcie podzielonego cylindra i aktywności izomerazy triosefosforanowej oraz domen: PHD (ang. plectrin homology domain), czterech tandemowych motywów dłoni EF (domeny wiążące Ca^{2+}) i domeny C2. W rdzeniu znajduje się miejsce wiązania jonów wapniowych Ca^{2+} , zaś domena C2 jest odpowiedzialna za główne przekazywanie sygnału. Jej działanie opiera się na enzymatycznej hydrolizie PIP $_2$ w wyniku czego powstają DAG (diacyloglicerol) oraz 1,4,5-trisfosforan inozytolu (IP $_3$, ang. inositol 1,4,5-trisphosphate). Tak powstały DAG jest bezpośrednim aktywatorem kolejnego z elementów szlaku - białkowej kinazy typu C (PKC – ang. protein kinase type C). Rodzina PKC u ludzi składa się z dwunastu izoenzymów, które dzieli się na trzy podrodziny (konwencjonalne, nowe i atypowe), a klasyfikacji dokonuje się na podstawie przekazywanego drugiego rzędu jakiegoś danego izoforma potrzebuje do aktywacji. Konwencjonalne PKC składają się z izoform α , βI , βII i γ , a aktywność uzależniona jest przede wszystkim od Ca^{2+} i DAG. Nowe PKC z kolei, dzieli się na izoformy δ , ϵ , η i θ , które wymagają do aktywacji jedynie DAG. Tak więc konwencjonalne i nowe PKC są uruchamiane przez ten sam szlak transdukcji sygnału co fosfolipaza $C\gamma 1$, natomiast atypowe, złożone z izoform $M\zeta$ i ι/λ nie wymagają do aktywacji ani Ca^{2+} , ani DAG. Uwalnianie zmagazynowanych wewnątrz

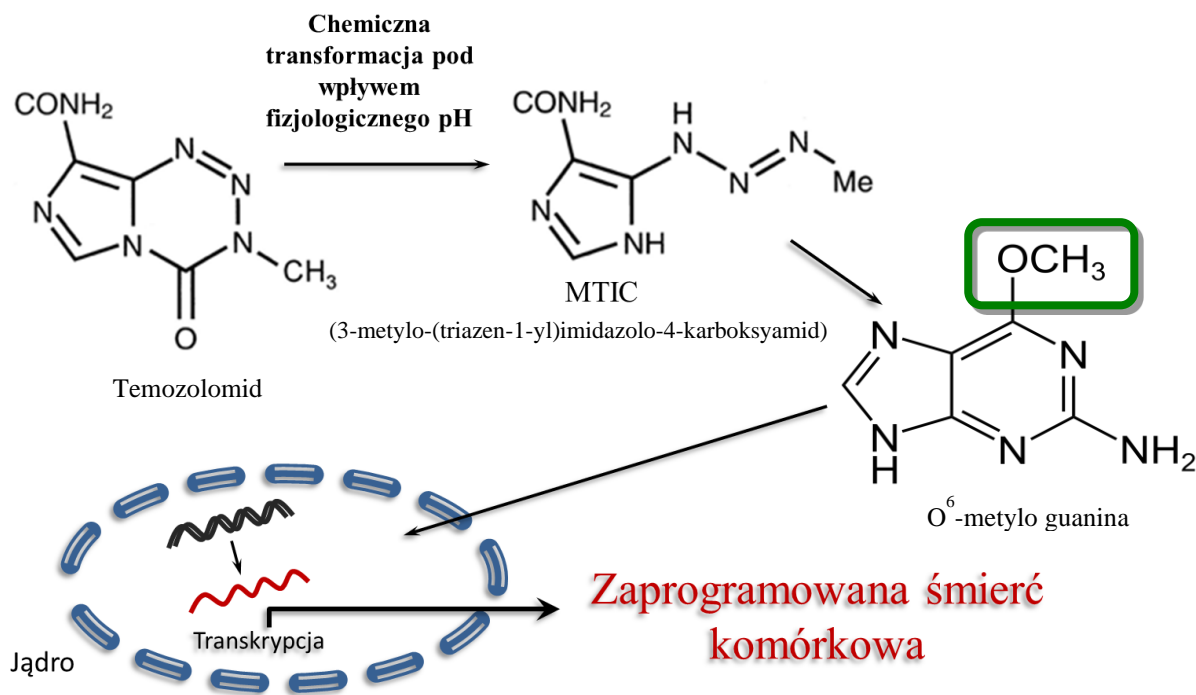
komórki jonów wapnia Ca^{2+} może zostać zaindukowane przez IP3. Taka mobilizacja jonów wapnia przyczynia się do amplifikacji przekazywania sygnału. Wysokie stężenie Ca^{2+} może być również induktorem apoptozy [23, 29, 30, 48–50].

Zaobserwowano również, że wyżej opisane szlaki mają zdolność do wzajemnego pobudzania się. Przykładem może być wspomniane białko Ras, które nioselektywnie może aktywować również inne kinazy np. Akt/PKB, czy PKC [23, 45].

1.6. Leczenie nowotworów centralnego układu nerwowego

Obecnie w leczeniu glejaków najczęściej stosowaną formą terapii jest resekcja chirurgiczna, która może być wspomagana radio- i/lub chemioterapią. Strategia leczenia uzależnione są od takich czynników jak lokalizacja guza, a także stopień jego złośliwości. W przypadku gwiaździka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego najczęściej stosowanym cytostatykiem jest Temozolomid [5].

Temozolomid (8-karbomoilo-3-metyloimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazyn-4(3H)-on TMZ) jest to lek przeciwnowotworowy, którego działanie opiera się na alkilacji DNA. Posiada on zdolność przedostawania się do płynu mózgowo-rdzeniowego i przenikania bariery krew-mózg na zasadzie dyfuzji biernej, a do tego nie wymaga metabolizmu wątrobowego do aktywacji. TMZ jest prolekiem, który w fizjologicznym pH ulega samoistnej hydrolizie do nietrwałego MTIC (3-metylotriazen-1-ylo-imidazolo-4-karboksamid), który natychmiast ulega rozpadowi do kationu metyldiazoniowego, odpowiedzialnego za metylację i metabolitu ubocznego – AIC (5-aminoimidazolo-4-karboksamid). Kation metyldiazoniowy jest aktywnym związkiem metylującym, który powoduje przyłączenie grupy metylowej w pozycji N^7 (70%) oraz O^6 (5%) w pierścieniu guaniny, a także w pozycji N^3 (25%) w adeninie. Pomimo, iż udział procentowy powstałej O^6 -metylo guaniny (O^6 -meG) jest niewielki, to wywiera on największy wpływ na indukcję apoptozy. Związane jest to z nieprawidłowym parowaniem w cyklu komórkowym O^6 -meG z tyminą, zamiast, jak to ma miejsce w warunkach prawidłowych, z cytozyną. Komórki, w których dojdzie do powstania pary O^6 -meG/T muszą przejść przez drugi cykl komórkowy, co prowadzi do pęknięcia podwójnej nici DNA. Jeśli nie zostanie ono naprawione, dochodzi do niestabilności genomu, co w konsekwencji prowadzi do wprowadzenia komórek nowotworowych na drogę apoptozy (Rysunek 10) [51].



Rysunek 10. Schemat działania Temozolomidu na komórki glejaków (opracowanie własne)

Niestety, około 50% pacjentów leczonych TMZ wykazuje wysoką oporność na stosowany lek. Przyczyną tego zjawiska jest między innymi aktywność metylotransferazy O6-metyloguaniny (MGMT ang. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase), enzymu, który powoduje usunięcie grupy metylowej z O6-metyloguaniny i w konsekwencji neutralizuje przeciwnowotworową aktywność Temozolomidu. MGMT po przejęciu grupy metylowej jest degradowany za pośrednictwem ubiquityny. Zahamowanie aktywności MGMT zwiększa cytotoksyczność Temozolomidu, a epigenetyczna metylacja promotora genu *MGMT* prowadzi do zablokowania aktywności naprawczej tego enzymu. Wykazano, że komórki pochodzące z hodowli pierwotnej glejaków, posiadające zmetylowany promotor były bardziej wrażliwe na indukcję zaprogramowanej śmierci po zastosowaniu Temozolomidu niż te, w których nie zaobserwowano modyfikacji genu. Niska ekspresja MGMT oraz metylacja promotora enzymu stanowią na chwilę obecną istotne czynniki diagnostyczne oraz strategiczne w zastosowaniu terapii Temozolomidem u pacjentów z gwiaździakiem anaplastycznym lub glejakiem wielopostaciowym [20, 51–53].

Poza TMZ, w chemioterapii glejaków stosuje się skojarzone działanie trzech leków prokarbazyny, lomustyny i winkrystyny. Istnieją również nowe strategie oparte o stosowanie inhibitorów kinaz tyrozynowych np. watalanibu i wandetynibu, inhibitorów integrzyn np. cilengitydu, przeciwciał monoklonalnych np. bewacizumabu i cetuksymabu, inhibitorów mTOR np. temsyrolim i ewerolim, czy inhibitorów kinaz białkowych np. enzastaur [54].

W związku z tym, iż standardowe leczenie glejaków na chwilę obecną jest terapią jedynie przedłużającą życie i komfort pacjentów, a nie prowadzi do całkowitego wyleczenia, poszukuje się intensywnie nowych związków o różnym mechanizmie działania, które eliminowałyby komórki glejaków na drodze indukcji zaprogramowanej śmierci. Przykładem związków, które mogłyby stanowić dobrą strategię przeciwnowotworową są inhibitory białek biorących udział w nadaktywności szlaków regulowanych przez receptor TrkB: PI3K/PKB/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK oraz PLC γ 1/PKC.

1.7. Inhibitory wewnątrzkomórkowych szlaków przeżycia

1.7.1. LOXO-101

Larotrectinib (LOXO-101) jest to niskocząsteczkowy, inhibitor receptora TrkB, wyprodukowany przez Loxo Oncology we współpracy z Bayer AG. Funkcjonuje jako związek o potencjalnie przeciwnowotworowym działaniu względem nowotworów, w których obserwowana jest fuzja genów *NTRK*, które powodują konstytutywne pobudzenie receptora TrkB. Larotrectinib z dużą skutecznością hamuje aktywność receptora, jednocześnie wykazując minimalną lub zerową aktywność hamującą względem innych kinaz. Molekularny mechanizm inhibicji receptora opiera się na zablokowaniu jego miejsca wiązania ATP, co prowadzi do zahamowania jego aktywności katalitycznej. To z kolei zapobiega konstytutywnej autofosforylacji i blokuje przekazywanie sygnału przez podległe mu szlaki. Prowadzi to do indukcji apoptozy oraz zahamowania wzrostu komórek nowotworowych z nadekspresją genu *NTRK*, zarówno *in vivo* jak i *in vitro* [55–57].

1.7.2. LY294002

Specyficznym inhibitorem szlaku PI3K-Akt/PKB-mTOR jest LY294002. Jest to morfolinowa, syntetyczna (2-4-morfolinylo-8-fenlochromon) pochodna naturalnego flawonoidu – kwercetyny – wykazującego wysokie powinowactwo do PI3K. Mechanizm jego działania oparty jest na specyficznym blokowaniu katalitycznego miejsca p110 α tej kinazy. Zaobserwowano również, że związek ten może działać hamująco na ekspresję

genu kodującego białkowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Dodatkowo ostatnie badania wykazały, że inaktywacja PI3K przy użyciu LY294002 prowadzi również do defosforylacji Akt/PKB, co w konsekwencji powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Prowadzi to do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych i ostatecznie wprowadzanie ich na drogę apoptozy. Taki mechanizm działania inhibitora umożliwia eliminację nowotworów z silnie wyrażoną konstytutywną aktywnością Akt [40, 58, 59].

1.7.3. Sorafenib

Przykładem skutecznego inhibitora szlaku Ras-Raf-MEK-ERK, jest sorafenib (BAY 43-9006). Jest to doustny lek o działaniu antyproliferacyjnym oraz przeciwnowotworowym, obecnie stosowanym w leczeniu raka nerek, wątroby oraz tarczycy. Związek ten jest inhibitorem kinazy Raf. Mechanizm jego działania jest dwuetapowy. W pierwszym dochodzi do zablokowania miejsc aktywnych receptorów kinaz tyrozynowych (np. TrkB) na powierzchni komórek. W drugim etapie następuje inhibicja domeny katalitycznej kinazy Raf. Sorafenib wykazuje więc działanie przeciwnowotworowe, inicjując zaprogramowaną śmierć na drodze apoptozy lub autofagii. Dodatkowo związek ten zmniejsza proces unaczyniania się guza, w wyniku zahamowania aktywności docelowych enzymów oraz czynników zlokalizowanych w komórkach guza oraz w jego nowo powstałych naczyniach [42, 46, 60].

1.7.4. U-73122

U-73122 (1-(6-((17 β -3metoksyestra-1,3,5(10)-trienylo-17)amino)heksylo)-1-irolo-,5-dion) to niskocząsteczkowy aminosteroid, hamujący aktywność fosfolipazy $C\gamma 1$, co powoduje zablokowanie szlaku $PLC\gamma 1$ -PKC. Molekularny mechanizm działania U-73122 jest oparty o trzy procesy. Pierwszym z nich jest bezpośrednia interakcja grupy malemidowej związku z domeną katalityczną zlokalizowaną na C-końcu $PLC\gamma 1$, powodując zablokowanie jej aktywności enzymatycznej. Drugi z mechanizmów oparty jest na zahamowaniu hydrolizy PIP2 do IP3. Trzeci natomiast, związany jest z obniżaniem wewnątrzkomórkowego wydzielania jonów wapnia (Ca^{2+}) w nowotworowych komórkach za pośrednictwem blokowania pomp wapniowych, co prowadzi do obniżenia aktywności PKC i zablokowania transdukcji sygnału przeżycia [61–63].

1.8. Śmierć komórkowa

Za śmierć komórkową uznaje się nieodwracalny proces, podczas którego w danej komórce dochodzi do całkowitego zahamowania wszelkich czynności biochemicznych uznawanych za przyżyciowe. Śmierć komórek może zostać sklasyfikowana na podstawie jej cech morfologicznych, kryteriów enzymatycznych, czy aspektów funkcjonalnych. Ze względu na charakterystyczne cechy morfologiczne komórkę uznaje się za martwą jeżeli spełni jedno z kilku kryteriów takich jak: utrata integralności błony plazmatycznej oraz jej wypuklenie się, całkowita fragmentacja jądra komórkowego (np. w przypadku apoptozy na ciała apoptotyczne), drastycznie uszkodzone organella oraz ich zamknięcie w pęcherzykach struktury (autofagosomy w autofagii) [64].

Pod względem enzymatycznym z kolei komórka może zostać uznana za martwą, gdy wejdzie w tzw. „punkt bez powrotu”, którym na przykład w przypadku apoptozy jest aktywacja kaskady kaspaz inicjatorowych np. kaspazy 8 czy 9 oraz efektorowych takich jak kaspaza 3.

Aspekty funkcjonalne, inaczej fizjologiczne śmierci komórkowej dzielą ją na powszechną zaprogramowaną śmierć komórkowa, a także mechaniczną, której doskonałym przykładem jest nekroza. Zaprogramowana śmierć komórkowa (PCD – ang. Programmed Cell Death) jest to określenie procesu, w którym komórka sama „podejmuje decyzję” o śmierci. Dlatego też, często określa się go również mianem samobójczej śmierci komórkowej. Na poziomie całego organizmu, PCD jest bardzo korzystnym procesem, który np. w trakcie rozwoju embrionalnego. Wyróżnia się wiele rodzajów zaprogramowanej śmierci, jednakże najczęściej opisywanymi są dwa główne typy: apoptoza (I typ śmierci) oraz autofagia (II typ śmierci). Zaburzenia tych procesów są często obserwowane w nowotworach centralnego układu nerwowego [64–66].

1.8.1. Apoptoza

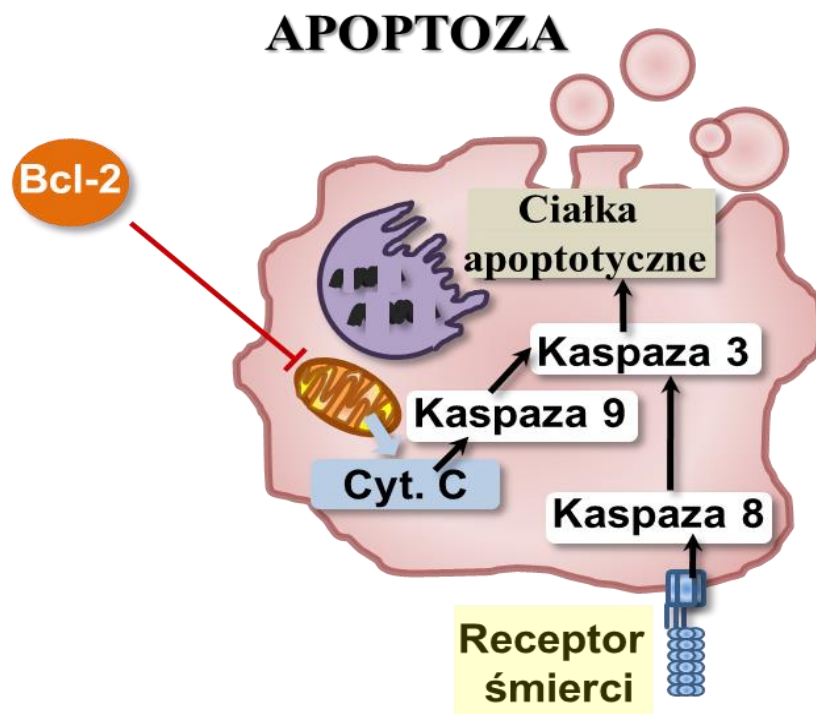
Apoptoza (z gr. *apo* – oddzielony, *ptosis* – opadanie liści) jest aktywnym i ściśle kontrolowanym procesem, który umożliwia eliminację z organizmu niepotrzebnych, uszkodzonych bądź zakażonych komórek. Pozwala również na usunięcie komórek zmienionych nowotworowo, nie powodując przy tym wystąpienia stanu zapalnego i uszkodzenia pobliskich tkanek [64].

Czynniki inicjujące proces apoptozy można podzielić na wewnątrzpochodne m.in.: niedobór czynników wzrostu i hormonów, zaburzenia w transporcie jonów, uszkodzenia DNA i aktywacja onkogenów, oraz zewnątrzpochodne tj.: występowanie reaktywnych form tlenu, promieniowanie jonizujące, czy leki stosowane w chemioterapii [39].

Bodźce indukujące apoptozę wywołują w komórce wiele charakterystycznych zmian morfologicznych. Pierwszym objawem świadczącym o rozpoczęciu procesu samobójczej śmierci komórki są zmiany na poziomie jądra. Chromatyna ulega kondensacji i lokalizuje się tuż pod błoną jądrową. Następnie dochodzi do obkurczenia całego jądra oraz jego fragmentacji. W kolejnym etapie następuje kondensacja cytoplazmy oraz tworzenie charakterystycznych pęcherzyków na powierzchni komórki. Z uwypukleń błony komórkowej tworzą się ciała apoptotyczne, które są strukturami zawierającymi fragmenty jądra, cytoplazmę wraz z organellami komórkowymi. Ostatecznym etapem jest fagocytoza powstałych ciałek przez sąsiednie komórki [67].

Zmianom morfologicznym apoptozy towarzyszą zmiany na poziomie molekularnym. Kluczową rolę w tym procesie odgrywiają proteazy cysteinowe – kaspazy, rozcinające łańcuch polipeptydowy za resztą asparaginową. Enzymy te występują w komórce w formie nieaktywnych zymogenów (pro-kaspaz). Ze względu na rolę jaką pełnią podczas indukcji apoptozy, podzielono je na kaspazy inicjatorowe oraz efektorowe. Inicjatorowe np. 8 i 9 aktywują kaspazy wykonawcze (efektorowe), do których zaliczamy m.in. kaspazę 3, która hydrolizując białka cytoszkieletu (m. in. aktyny i spektryny) oraz błony otaczającej jądro komórkowe inicjuje proces apoptozy. Proces aktywacji kaspaz efektorowych przebiega kaskadowo. Zaobserwowano, że do aktywacji tych enzymów może dochodzić dwoma szlakami. wewnątrz- lub zewnątrzpochodnym (Rysunek 11). Aktywacja szlaku zewnętrznego rozpoczyna się od aktywacji odpowiednich błonowych receptorów należących do nadrodziny receptorów czynnika nekrozy TNF (ang. tumor necrosis factor), do których takich jak m.in. TRAIL-R1 i TRAIL-2 (ang. TNF-related apoptosis-inducing ligand-R1 i R2), oraz Fas/CD95/Apo1. Każdy z nich zawiera dwie domeny: zewnątrzkomórkową, pozwalającą na przyłączenie ligandu oraz wewnątrzkomórkową, nazywaną domeną śmierci (DD- ang. death domain), odpowiedzialną za przyłączenie cytoplazmatycznych białek: FADD (ang. Fas-associated death domain protein) oraz TRADD (ang. TNFR1-associated death domain), zwanych również białkami adaptorowymi. Dzięki obecności w nich domeny DED (ang. death effector domain) możliwe

jest przyłączenie białka efektorowego – prokaspazy 8. W ten sposób powstaje kompleks inicjujący śmierć komórki – DISC (ang. death initiated signaling complex), w obrębie którego dochodzi do aktywacji inicjatorowej kaspazy 8, która następnie aktywuje kolejne kaspazy efektorowe, w tym kaspazę 3. Może ona również aktywować występujące w cytoplazmie białko Bid, które następnie bierze udział w tworzeniu kanałów mitochondrialnych w wewnętrznym szlaku apoptozy [66, 68–71].



Rysunek 11: Schemat przebiegu apoptozy szlakiem zewnątrz- i wewnątrzpochodnym [opracowanie własne]

Drugi szlak - wewnątrzpochodny, inaczej nazywany mitochondrialnym zachodzi z udziałem mitochondriów i jest aktywowany przez stres oksydacyjny, reaktywne formy tlenu, niektóre związki chemiczne (w tym niektóre cytostatyki), wzrost stężenia jonów wapnia czy też zaburzenia w transporcie elektrolitów i uszkodzenia DNA. Pod wpływem wymienionych wyżej czynników dochodzi do otwierania mitochondrialnych megakanałów – PTP (ang. permeability transition pore), czego konsekwencją jest obniżenie potencjału transbłonowego i uwolnienie cytochromu c oraz czynnika AIF (ang. apoptosis inducing factor) do cytoplazmy. Cytochrom c łączy się z czynnikiem Apaf-1 (ang. apoptosis protease-

activating factor 1), powodując zmianę jego konformacji i odsłonięcie domeny CARD (ang. caspase and RIP adapter with death domain), która jest miejscem przyłączania się inicjatorowej prokaspazy 9. W powstałym kompleksie, zwanym apoptosomem dochodzi do aktywacji kaspazy 9, która następnie uaktywnia kolejne kaspazy efektorowe m.in. kaspazę 3, co jest jednoznacznym sygnałem śmierci komórki na drodze apoptozy. Proces apoptozy jest negatywnie regulowany przez anty-apoptotyczne białko Bcl-2, które migrując do zewnętrznej błony mitochondrialnej powoduje zmianę jej potencjału, co hamuje uwalnianie cytochromu c do cytoplazmy. W nielicznych przypadkach wewnątrzpochodny szlak apoptozy może być również aktywowany przez kaspazę 8. Zarówno nadmierna aktywność apoptozy, jak również jej „unikanie” przez komórki jest czynnikiem indukującym wiele stanów patologicznych jak np. choroby neurodegeneracyjne, zaburzenia autoimmunologiczne oraz wiele rodzajów nowotworów, w tym również mózgu [41, 50, 70, 72, 73].

1.8.2. Autofagia

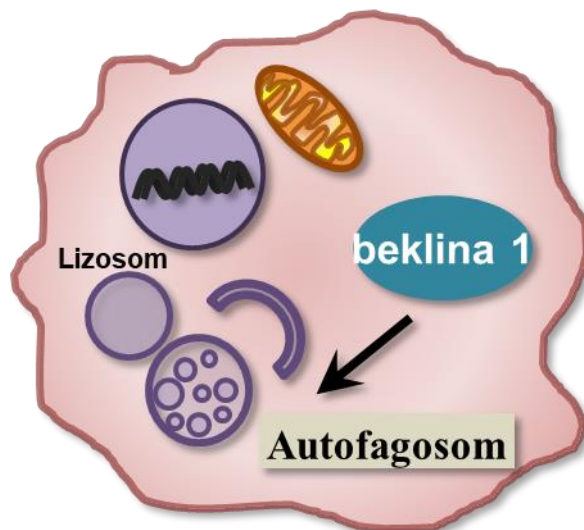
Autofagia (z gr. *auto* – samo, *phagy* – zjadanie) jest naturalnym procesem odpowiedzialnym za degradację uszkodzonych, obumarłych bądź zużytych kompartmentów oraz organelli komórkowych. Proces ten zachodzi z udziałem lizosomów i odpowiada za utrzymanie homeostazy komórki, a w warunkach stresowych umożliwia ich przeżycie, dlatego też pojawiły się doniesienia, iż w komórkach nowotworowych autofagia może odpowiadać nie tylko za ich śmierć, ale i za ich przeżywanie [64, 74].

Mechanizm autofagii (Rysunek 12) jest uruchamiany w komórce w odpowiedzi na wewnątrz- i zewnątrzpochodne czynniki stresowe do których możemy zaliczyć m.in.: niedobory składników odżywczych i/lub aminokwasów, silną agregację i akumulację nieprawidłowo pofałdowanych białek, uszkodzenia organelli, hipoksję lub aktywację onkogenów [67].

Cechą charakterystyczną autofagii jest pojawienie się ciałek autofagalnych. Fragment cytoplazmy przeznaczony do degradacji zawierający uszkodzone organella lub agregaty niepoprawnie sfałdowanych białek jest stopniowo oplaszczany podwójną błoną w kształcie litery C (zwaną fagoforem), która stopniowo ulega elongacji. Donorem cząstek budulcowych dla wydłużającej się fagofory jest retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego bądź błona komórkowa. Gdy oba końce błony izolującej złączą się ze sobą powstaje autofagosom. Tak powstały pęcherzyk łączy się z lizosomem, tworząc

autofagolizosom czyli ciało autofagalne. W jego wnętrzu dochodzi do połączenia się zawartości autofagosomu z enzymami litycznymi, co prowadzi do degradacji jego zawartości [39, 75].

AUTOFAGIA



Rysunek 12. Schemat przebiegu autofagii z uwzględnieniem roli białka beklina-1 w regulacji tego procesu [opracowanie własne]

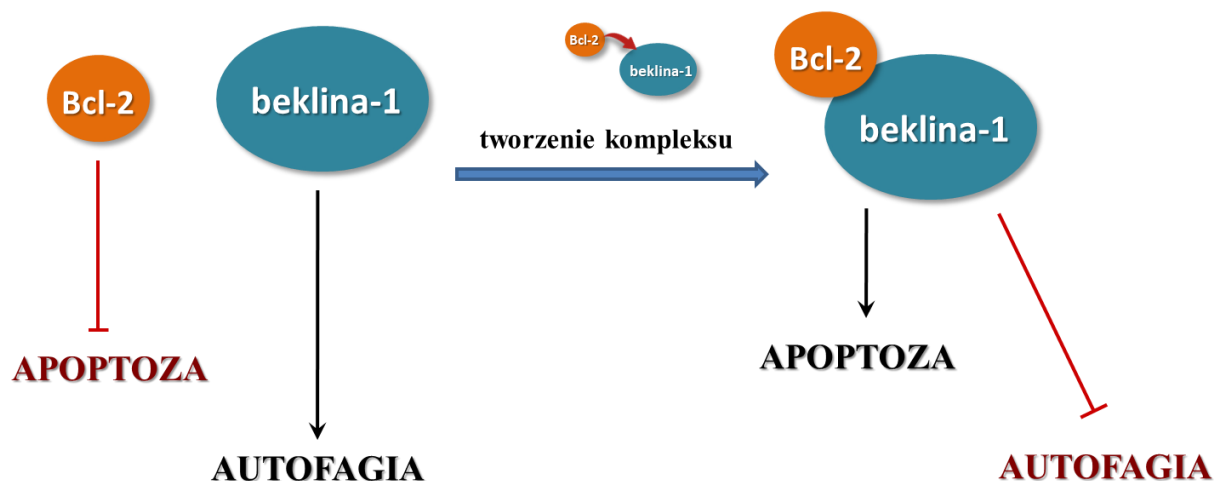
Na poziomie molekularnym autofagia charakteryzuje się wielostopniowością, a jej przebieg podlega kontroli produktów ekspresji genów *ATG* (ang. autophagy-related gene) – białek Atg. Przykładem są kinazy serynowo–treoninowe ULK1 (ang. uncoordinated-51-like kinase-1) i ULK2 (ang. uncoordinated-51-like kinase-2), które są odpowiedzialne za indukcję powstawania autofagosomów [39, 75].

Proces autofagii rozpoczyna się od aktywacji kompleksu białek ULK1 i ULK2, w którego skład wchodzi również: FIP200 (ang. focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa), Atg101 oraz białko Atg113. Za jego regulację odpowiada kinaza mTOR, która w korzystnych warunkach przyłącza się do kompleksu i powoduje fosforylację kinaz ULK1 i ULK2 oraz białka mAtg113, które w postaci hiperfosforylowanej traci powinowactwo do kompleksu ULK1/2. W warunkach stresowych mTOR oddysocjuje, powodując defosforylację tych białek i przywracając aktywność enzymatyczną ULK1/2, która katalizuje fosforylację FIP200 oraz mAtg113, rozpoczynając tym samym powstawanie autofagosomów. W kolejnym etapie dochodzi do nukleacji fagoforu, która odbywa się w obecności kompleksu PI3K, w skład którego obok kinazy wchodzi białka Atg142, Vps34

(ang. *vacuolar protein sorting 34*), p150 oraz beklina-1. Kinaza PI3K, łącząc się z beklina-1 aktywuje syntezę niezbędnego do elongacji fagoforu fosfolipidu – PIP3. Od momentu aktywacji kompleksu PI3K powstawanie autofagosomu jest regulowane przez ubikwitynopodobne systemy koniugacyjne: Atg12 – Atg5 oraz LC3–II–PE (ang. *microtubule-associated protein light chain 3-II-phosphatidylethanolamine*). Białka pierwszego z nich ulegają oligomeryzacji, tworząc konieczne do wydłużenia błony izolującej struktury. Początkowo kompleks ten jest równomiernie związany z błoną fagoforu, jednak w miarę dojrzewania pozostaje związany jedynie z zewnętrzną błoną, po czym oddysocjowuje od dojrzałego autofagosomu. Przypuszcza się że kompleks Atg12-Atg5 powoduje przyłączenie fosfatydyloetanolaminy do białka LC3 i powstanie drugiego systemu LC3–II–PE. W końcowej fazie procesu autofagii dochodzi do fuzji autofagosomu z lizosomem. U ssaków proces ten poprzedzony jest dojrzewaniem pęcherzyka, który polega na połączeniu z endosomami. Dostarczają one składników przeznaczonych do degradacji oraz niezbędnych do fuzji z lizosomem czynników. Dodatkowo obniżają pH, stwarzając sprzyjające warunki dla aktywności obecnych w lizosomach hydrolaz. W wyniku fuzji powstaje autofagolizosom, a jego zawartość ulega degradacji [39, 64, 67, 76, 77].

1.8.3. Korelacja pomiędzy apoptozą a autofagią

Apoptoza oraz autofagia to mechanizmy śmierci, które mogą wzajemnie na siebie oddziaływać i przechodzić z jednego w drugi i odwrotnie. Jest to możliwe dzięki interakcjom pomiędzy kluczowymi białkami tych procesów, które leżą u podstaw molekularnego mechanizmu wzajemnego oddziaływania. Wykazano na przykład, że białka związane z autofagią Atg mogą również wpływać na zmianę potencjału błony mitochondrialnej, a co za tym idzie indukować apoptozę. Zahamowanie tych specyficznych Atg przez białka regulujące apoptozę z kolei mogą hamować ten proces na korzyść autofagii. Innym przykładem korelacji pomiędzy obydwojema typami śmierci jest fuzja anty-apoptotycznego białka Bcl-2 i specyficznego markera autofagii – beklina-1. Powstały w ten sposób kompleks może być swego rodzaju molekularnym „przełącznikiem” pomiędzy procesami apoptozy i autofagii (Rysunek 13) [68, 77, 78].



Rysunek 13. Proces przełączania procesów apoptozy i autofagii w kontekście tworzenia się kompleksów białkowych Bcl-2:beklina-1 [opracowanie własne]

Kompleks białek Bcl-2:beklina-1 został po raz pierwszy odkryty jako ważny system w odpowiedzi komórek na infekcję wirusem Sindbis, modulowaną poprzez stymulację autofagii. W normalnych warunkach w komórce Bcl-2 hamuje aktywność bekliny-1 łącząc się z nią, co umożliwia indukcję apoptozy. Pod wpływem stresu białka te oddysocjują, co z kolei prowadzi do indukcji autofagii. Tworzenie kompleksu obu białek odbywa się poprzez łączenie domeny BH3 bekliny-1 z hydrofobowym rowkiem w strukturze Bcl-2, który tworzą jego domeny BH1, BH2 i BH3. Fakt, iż beklina-1 posiada zdolność wiązania się z innymi członkami białek z rodziny Bcl-2, sugeruje, że znaczenie fizjologiczne i rola tej interakcji mogą się różnić w zależności od białka z jakim się zwiąże. Ponieważ Bcl-2 jest bardzo dobrze znany jako białko anti-apoptotyczne, mechanizm, dzięki któremu białko to może hamować zarówno przeżycie, jak i śmierć komórki, jest intrygujący. Tworzenie kompleksu Bcl-2:beklina-1 uzależnione jest też od wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek. Bcl-2 siateczki śródplazmatycznej jest w stanie hamować autofagię i promować proces apoptozy, podczas gdy mitochondrialne białko działa anti-apoptotycznie, uwalniając beklinę-1, co z kolei promuje proces autofagii. Biorąc pod uwagę fakt, iż autofagia coraz częściej jest mniej pożądana niż apoptoza w kontekście eliminacji komórek nowotworowych na drodze zaprogramowanej śmierci, taki swoisty przełącznik może stanowić molekularny cel w opracowywaniu nowych skuteczniejszych terapiach [50, 72, 75, 78].

1.8.4. Nekroza

W odróżnieniu od zaprogramowanej śmierci komórki, czyli apoptozy lub autofagii nekroza jest procesem biernym i patologicznym. Ten rodzaj mechanicznej śmierci zachodzi pod wpływem pojedynczych czynników o dużej sile lub nagromadzenia się dużej ilości słabszych czynników. Czynniki indukujące nekrozę możemy podzielić na: fizyczne (np. niska i wysoka temperatura, promieniowanie UV), chemiczne (niektóre cytostatyki) oraz biologiczne (infekcje wirusowe lub bakteryjne). Aby doszło do tego typu śmierci czas działania oraz natężenie szkodliwych czynników musi przekroczyć próg odporności komórek narażonych na ich ekspozycję. Powoduje to pęcznienie i utratę ciągłości ich błony, w wyniku czego komórki pękają, a cała ich zawartość trafia do macierzy zewnątrzkomórkowej. W takich komórkach na początku drastycznie spada poziom ATP, który jest niezbędny do prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych. Deficyt ten następuje w wyniku depolaryzacji błony mitochondrialnej, czego konsekwencją są zaburzenia w transporcie elektronów. Następnie dochodzi do destrukcji organelli, m.in. retikulum endoplazmatycznego, polisomów, jądra komórkowego oraz lizosomów. W wyniku zaburzeń w strukturze błony dochodzi do biernego napływu wody i jonów (głównie wapnia i sodu) do wnętrza komórki. Dochodzi do rekrutacji komórek fagocytarnych. Aktywacja fagocytów w wyniku indukcji nekrozy wiąże się z niemal całkowitym zahamowaniem wytwarzania czynników działających przeciwzapalnie (takich jak interleukina 10) i uwolnieniem cytokin, które wzmagają stan zapalny (np. TNF- α , czy interleukiny 6 i 8). W związku z powyższym nekroza jest wysoce niepożądanym zjawiskiem w kontekście rozwoju chorób nowotworowych oraz w stosowanej w ich leczeniu chemioterapii [65, 79, 80].

2. Cel Pracy

Glejaki to złośliwe i nieuleczalne nowotwory, a obecnie stosowane metody ich leczenia są nieskuteczne, dlatego poszukuje się nowych związków. Ważną rolę w transformacji i złośliwości glejaków odgrywają szlaki regulowane przez receptor TrkB: PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK oraz PLC γ 1-PKC.

Dlatego celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena właściwości przeciwnowotworowych: LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 w kontekście eliminacji ludzkich komórek glejaków III i IV stadium na drodze indukcji zaprogramowanej śmierci. Ponieważ terapia pojedyncza jest mniej skuteczna, dlatego podjęto próbę zbadania skojarzonego działania tych związków.

Przebieg realizowanych badań został podzielony na etapy odpowiadające postawionym hipotezom cząstkowym:

1. Czy badane związki skutecznie inicjują zaprogramowaną śmierć w komórkach glejaków?
2. Czy skojarzone działanie badanych substancji ma wyższy potencjał przeciwnowotworowy niż ich pojedyncza aplikacja?
3. Jaki jest molekularny mechanizm indukcji zaprogramowanej śmierci pod wpływem badanych związków ze szczególnym uwzględnieniem roli kompleksu białek Bcl-2 i beklina-1 w eliminowaniu komórek nowotworowych na drodze apoptozy lub autofagii?
4. Czy pojedyncza jak i skojarzona aplikacja LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 hamuje migrację komórek glejaków?

3. Materiały i metody

3.1. Spis odczynników

Tabela 2. Zastosowane w badaniach odczynniki

FIRMA	ODCZYNNIKI
Sigma Chemicals Company, USA	Akrylamid, bisakrylamid, Tris, Triton X-100, DMSO, SDS, AMPS, DMF, 2-merkaptoetanol, odczynnik Bradford, TEMED, BCIP, NBT, oranż akrydyny, paraformaldehyd, rodamina, falloidyna, Antibiotic-100X (penicylina + streptomycyna), jodek propidionowy, Hoechst 33342, LR White, DiOC ₆ (3), kakodylan sodu, czterotlenek osmu, aldehyd glutarowy, trypsyna, MEM, DMEM, F-12
Sigma Aldrich, USA	Odczynnik Reynoldsa, surowica bydlęca BSA
Whatman, Anglia	Bibuła 3MM
SantaCruz Biotechnology, USA	Mysie monoklonalne przeciwciała: anti-PI3K, anti-Raf, anti-PLC1, anti-TrkB, anti-beklina-1; siRNA: anti-PI3K, anti-Raf, anti-PLC1, anti-TrkB; przeciwciała: AlexaFluor® 488, AlexaFluor® 594; Transfection Reagent, Transfection Medium; RIPA, białko A sprzężone z agarozą,
POCH, Polska	Aceton, HCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , formaldehyd, kwas octowy, metanol,
Standard, Polska	NaOH, gliceryna, glicyna
Millipore, USA	Immobilon P
Schering-Plough, USA	Temozolomid
BAYER, Niemcy	sorafenib
ChemCruz™ Biochemicals, USA	U-73122
Selleck Chemicals, USA	LOXO-101
Polyscience Inc,	Octan uranylu
Agar Scientific,	Miedziane siatki do mikroskopii elektronowej

3.2. Spis buforów

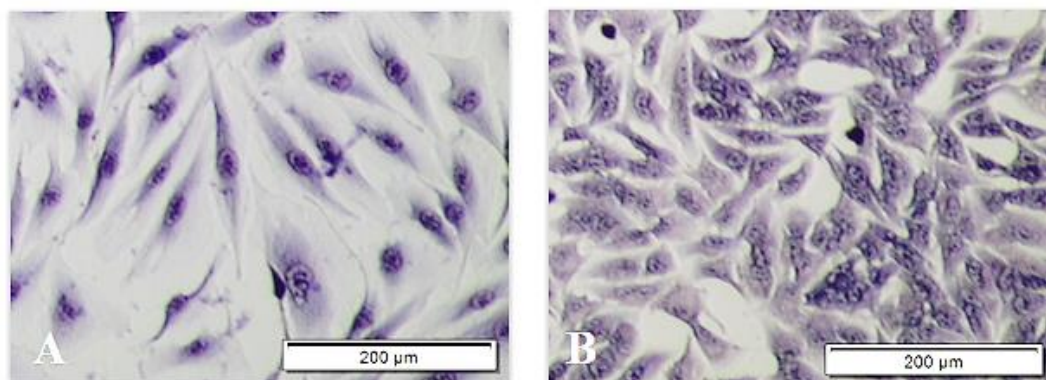
Tabela 3. Zastosowane w badaniach bufor

BUFOR	SKŁAD
Bufor A	NaCl (8g), KCl (0,2g), Na ₂ HPO ₄ (1,44g), KH ₂ PO ₄ (0,2g), H ₂ O _(dest) (1000ml), pH 7,4
Bufor B	125mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 10% glicerol, 100mM DTT
Bufor C	25mM Tris, 195 mM glicyna
Bufor D	25mM Tris, 192 mM glicyna, 20% metanol
Bufor E	10mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,9% NaCl, pH 7,5
Bufor F	100mM Tris-HCl (pH 9,5), 100mM NaCl, 5mM (CH ₃ COO) ₂ Mg, pH 9,5
Bufor G	0,1M kakodylan sodu (Sól sodowa kwasu kakodylowego trihydrat >98%), NaOH, pH 7,4
Bufor H	10mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS, koktajl inhibitorów proteaz

3.3. Linie komórkowe

Badania prowadzone były na komercyjnych liniach ludzkich komórek glejaka:

- gwiaździka anaplastycznego (ang. anaplastic astrocytoma, AA) – MOGGCCM (trzecie stadium złośliwości wg WHO) (ECACC, ang. The European Collection of Authenticated Cell Cultures, numer katalogowy: 86022702)
- glejaka wielopostaciowego (ang. glioblastoma multiforme, GBM) – T98G (czwarte stadium złośliwości wg WHO) (ATCC, ang. American Type Culture Collection, numer katalogowy: CRL-1690™).



Zdjęcie 1: Zdjęcia mikroskopowe badanych linii komórkowych barwionych metodą May-Grünwalda-Giemsy: A: gwiaździak anaplastyczny MOGGCCM, B: glejak wielopostaciowy T98G [opracowanie własne]

Podłoże dla hodowli komórek adherentnych stanowiła mieszanina komercyjnie dostępnych pożywek: DMEM (ang. Dulbecco's Minimal Essential Medium) oraz F-12 Ham zmieszanych w stosunku 1:1 dla linii MOGGCCM i 3:1 w przypadku linii T98G. Podłoża obu hodowli były wzbogacone dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej FBS (ang. Fetal Bovine Serum) oraz antybiotyków: penicyliny i streptomycyny w stężeniu 100µg/ml. Hodowle były prowadzone w sterylnych, kontrolowanych warunkach (37°C, 95% wilgotności, 5% CO₂, inkubator New Brunswick™ Galaxy® 170 R) z wykorzystaniem polistyrenowych butelek do hodowli komórek adherentnych typu Falcon (Nunc™, ThermoFisher), polistyrenowych szalek do hodowli adherentnych o średnicy 35 mm (Nunc™, ThermoFisher), płytek 6- oraz 96-dołkowych, a także na 4- oraz 8-dołkowych szkiełkach z komorami hodowlanymi typu Lab-Tek™ (Nunc™, ThermoFisher).

W badaniach wykorzystano również pierwotną hodowlę ludzkich fibroblastów skóry (HSF, ang. Human Skin Fibroblasts), którą prowadzono w takich samych warunkach jak linie nowotworowe.

3.4. Badane związki

W badaniach zastosowano inhibitory: LY294002, sorafenib (Nexavar), U-73122, LOXO-101 (Larotrektylib) oraz cytostatyk Temozolomid, które zostały rozpuszczone w dimetylosulfotlenku (DMSO) i dodawane do komórek tak aby jego końcowe stężenie nie przekraczało 0,01%. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane z 0,01% DMSO. Obie linie komórkowe zostały poddane 24 godzinnej inkubacji z badanymi substancjami

w określonych stężeniach zarówno w aplikacji pojedynczej jak i skojarzonej według poniższego schematu:

Tabela 4. Stężenia badanych związków

Badany związek	MOGGCCM	T98G
	Stężenie	
Kontrola (K)	-	-
temozolomid (T)	100 μM	50 μM
sorafenib (S)	1 μM	1 μM
LY294002 (L)	10 μM	10 μM
U-73122 (U)	5 μM	15 μM
LOXO-101 (X)	1 μM	1 μM

Badane leki w skojarzonej aplikacji były podawane według schematu:

Tabela 5. Schemat równoczesnej aplikacji badanych związków

KOMBINACJA	SKRÓT
Temozolomid + sorafenib	ST
Temozolomid + LY294002	LT
Temozolomid + U-73122	UT
Temozolomid + LOXO-101	XT
LY294002 + sorafenib	LS
LY294002 + U-73122	UL
LY294002 + LOXO-101	XL
sorafenib + U-73122	US
sorafenib + LOXO-101	XS
U-73122 + LOXO-101	UX
LY294002 + sorafenib + Temozolomid	LST
U-73122 + LY294002 + Temozolomid	ULT
U-73122 + LY294002 + sorafenib	ULS
U-73122 + sorafenib + Temozolomid	UST
LOXO-101 + LY294002 + Temozolomid	XLT
LOXO-101 + LY294002 + sorafenib	XLS
LOXO-101 + sorafenib + Temozolomid	XST
U-73122 + LY294002 + sorafenib + Temozolomid	ULST
LOXO-101 + LY294002 + sorafenib + Temozolomid	XLST

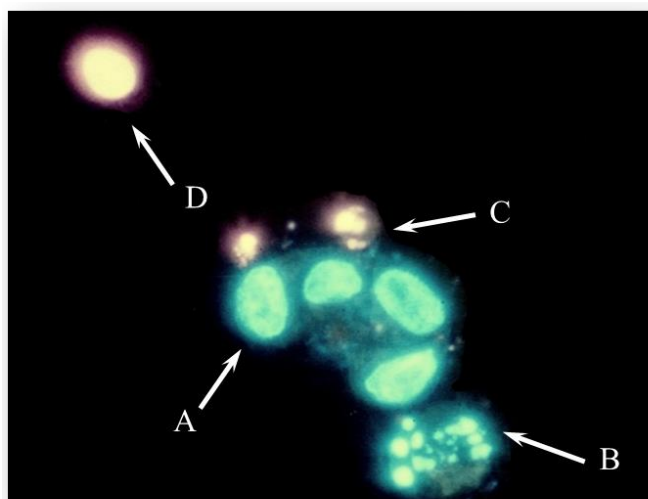
Stężenia leków zostały wybrane eksperymentalnie. W tym celu, komórki linii MOGGCCM i T98G oraz hodowli HSF poddano działaniu LY294002 oraz U-73122 w zakresie stężeń 5-30 μM oraz LOXO-101 w stężeniach 0,5-1 μM . Czas inkubacji z badanymi związkami, a także stężenia Temozolomidu oraz sorafenibu zostały wybrane na podstawie wcześniejszych eksperymentów.

3.5. Metodyka badawcza

3.5.1. Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą barwienia fluorochromami: Hoechst 33342 oraz jodek propidionowy

Identyfikacji komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych dokonano wykorzystując metodę barwienia [81] komórek linii MOGGCCM i T98G.

Do 0,5 ml pożywki, w której hodowano komórki na 8-dołkowych szkiełkach typu Lab-Tek™ (Nunc™, ThermoFisher) dodawano 1,25 μl mieszaniny barwiącej (skład poniżej) i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C w ciemności. Po tym czasie pożywkę wraz z mieszaniną usuwano, nakraplano Bufor A z dodatkiem jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , a komórki przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. W tak przygotowanych preparatach analizowano około 1000 komórek w losowo wybranych polach widzenia przy użyciu mikroskopu konfokalnego Axiovert 200M z głowicą skanującą LSM 5 PASCAL (Zeiss) stosując światło wzbudzające o długości $\lambda=420$ nm. Każdą z analiz powtórzono trzykrotnie.



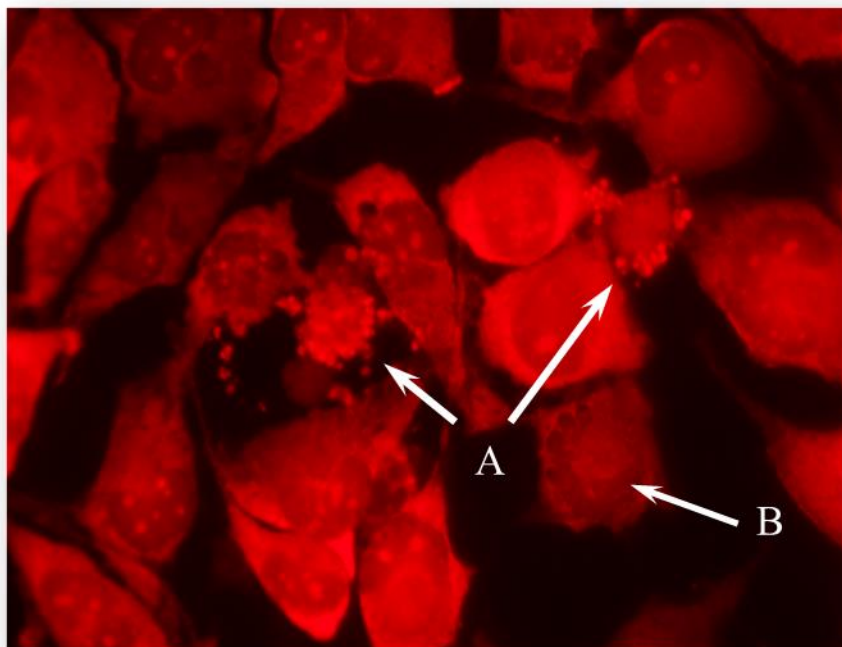
Zdjęcie 2: Zdjęcie komórek glejaków wybarwionych mieszaniną Hoechst 33342 (jądra komórek prawidłowych, ciała apoptotyczne wczesnej fazy) oraz jodku propidionowego (komórki nekrotyczne, ciała apoptotyczne późnej fazy): A – komórki prawidłowe zabarwione na niebiesko, B – wczesna apoptoza z świecącymi na niebiesko ciałkami apoptotycznymi, C – późna apoptoza z ciałkami apoptotycznymi świecącymi na różowo, D – zabarwiona na różowo komórka nekrotyczna [opracowanie własne]

Skład mieszaniny barwiącej:

Hoechst 33342	–	200 μ l roztworu o stężeniu 0,4 mg/ml
Jodek propidionowy	–	300 μ l roztworu o stężeniu 0,5 mg/ml
Woda destylowana	–	500 μ l

3.5.2. Identyfikacja komórek autofagalnych

Identyfikacji komórek autofagalnych dokonano metodą barwienia oranżem akrydyny (3,6-dimetylaminoakrydyna) [82]. Komórki kontrolne oraz inkubowane z badanymi substancjami hodowano na 8-dołkowych szkiełkach typu Lab-Tek™ (Nunc™, ThermoFisher). Do każdej z hodowli dodano 5 μ g/ml oranżu akrydyny (stężenie końcowe) i inkubowano przez 15 minut w ciemności w temperaturze 37°C. Następnie płukano je trzykrotnie buforem A, komory hodowlane zastąpiono szkiełkami nakrywkowymi i obserwowano z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego Axiovert 200M z głowicą skanującą LSM 5 PASCAL (Zeiss) ($\lambda = 526$ nm). Komórki posiadające na terenie cytoplazmy świecące na czerwono pęcherzyki uznano za autofagalne. Analizowano co najmniej 1000 komórek w losowo wybranych miejscach preparatów, a każde badanie powtarzano trzykrotnie.



Zdjęcie 3: Zdjęcie komórek autofagalnych (A) oraz prawidłowych (B) linii T98G po wybarwieniu oranżem akrydyny [opracowanie własne].

3.5.3. Technika mikroskopii elektronowej TEM

Hodowle komórek badanych oraz kontrolnych były prowadzone w polistyrenowych butelkach do hodowli komórek adherentnych w 37°C przy stałym 5% CO₂ i wilgotności przez 24 godziny. Po tym czasie podłoże hodowlane aspirowano i odrzucano, a komórki płukano buforem A i utrwalano przez 2 godziny w 4% roztworze aldehydu glutarowego w buforze G. Po usunięciu roztworu utrwalającego komórki płukano buforem G, a następnie inkubowano 1,5 godziny w 1% roztworze czterotlenku osmu w buforze G. Po tym czasie komórki ponownie płukano buforem G. Cała procedura była prowadzona w temperaturze 4°C. Następnie komórki poddano procesowi odwodnienia poprzez przeprowadzanie ich przez szereg acetonu (30, 40, 60, 70, 80, 100%) w temperaturze pokojowej. Tak przygotowane komórki przesycono mieszkankami acetonu i żywicy LR White (odpowiednio w stosunku 3:1, 1:1, 1:3) zachowując czas 2 godzin na każdą mieszaninę. W ostatnim etapie komórki przeniesiono do czystego polimeru, który poddano polimeryzacji w temperaturze 55°C przez całą noc. Zatopiony materiał trzymowano i krojono na ultracienkie skrawki (<90 nm) z użyciem mikrotomu RMC MT-XL (Tucson, Arizona, USA), które następnie umieszczano na heksagonalnych miedzianych siatkach mikroskopowych o średnicy 3,05 mm i grubości 0,015 mm. Tak przygotowane skrawki były kontrastowane w mieszaninie octanu uranylu i odczynnika Reynoldsa według metody Reynolds'a [cyt]. Preparaty oglądano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym LIBRA120 (Carl Zeiss, rozdzielczość punktowa: 0,34 nm przy napięciu przyspieszającym 120kV).

3.5.4. Barwienie komórek mieszaniną falloidyny i rodaminy

Komórki kontrolne oraz badane hodowano w ilości 3×10^7 na 4-dołkowych szkiełkach typu Lab-Tek™, a następnie płukano trzykrotnie buforem A z jonami Ca²⁺ i Mg²⁺ i utrwalano przez 10 min przy pomocy schłodzonego 3,7% roztworu paraformaldehydu. Po tym czasie komórki poddano działaniu 0,2% roztworu Tritonu X-100 przez 7 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki przepłukano trzykrotnie buforem A, a następnie poddano inkubacji z 200 µl mieszaniny fluorochromów: rodaminy i falloidyny (w stosunku 1:20) przez 30 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, preparaty przepłukano trzykrotnie buforem A, a następnie analizowano z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego Axiovert 200M z głowicą skanującą LSM 5 PASCAL (Zeiss) przy długości fali $\lambda = 526$ nm.

3.5.5. Izolacja białek z materiału badanego

Komórki kontrolne oraz badane hodowane w naczyniach typu Falcon zebrano mechanicznie za pomocą scrapera laboratoryjnego i przeniesiono do świeżych, schłodzonych probówek laboratoryjnych, które następnie odwirowano przy sile odśrodkowej 12000 x G, w temperaturze 4°C przez 10 minut. Po etapie wirowania supernatant odrzucano, a osad komórkowy zawieszano w buforze B, gotowano w łaźni wodnej przez 10 minut i następnie odwirowano (12 000 x G, 20 minut). Otrzymane ekstrakty (płyn z nad osadu) wykorzystano do dalszych analiz.

3.5.6. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w uzyskanych ekstraktach komórek kontrolnych oraz badanych oznaczono według metody Bradford [83].

Skład próby badanej:

800 µl wody destylowanej

1 µl badanego materiału

200 µl odczynnika Bradford

Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 595$ nm, wobec próby kontrolnej, zawierającej 1 µl buforu B zamiast badanego materiału. Ilość białka odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej z użyciem szeregu rozcieńczeń roztworu wzorcowego albuminy surowicy bydlęcej (BSA).

3.5.7. Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym

Jednokierunkową elektroforezę białek w żelu poliakrylamidowym SDS – PAGE przeprowadzono zgodnie z metodą Laemmliego [84]. Próbkę zawierającą 80 µg białka, zawieszoną w buforze B z dodatkiem 0,01% błękitu bromofenolowego oraz 0,02% β-merkaptoetanolu, nanoszono na pojedyncze studzienki żelu poliakrylamidowego zagęszczającego (Tabela 7) pod którym znajdował się dolny 12% żel separujący (Tabela 6).

Tabela 6. Skład żelu separującego

Żel separujący	12%
0,5 M TRIS-HCl pH 8,8	3,75 ml
roztwór 30% akrylamidu i 1% bisakrylamidu	5 ml
10% SDS	150 μ l
10% AMPS	150 μ l
Woda destylowana	5 ml
TEMED	15 μ l

Tabela 7. Skład żelu zagęszczającego

Żel zagęszczający	
0,5 M TRIS-HCl pH 6,8	2,5 ml
roztwór 30% akrylamidu i 1% bisakrylamidu	2 ml
10% SDS	100 μ l
10% AMPS	100 μ l
Woda destylowana	5,2 ml
TEMED	10 μ l

Bezpośrednio przed naniesieniem na żel, próbki gotowano w łaźni wodnej przez 5 minut. Elektroforezę prowadzono w 5-krotnie rozcieńczonym buforze C pod stałym napięciem $U=160$ V, w kierunku od katody do anody.

3.5.8. Immunoblotting

Żel poliakrylamidowy z rozdzielonymi elektroforetycznie białkami umieszczono na membranę PVDF Immobilon P o wielkości porów 40 μ m, pomiędzy warstwami bibuły 3M dobrze zwilżonej rozcieńczonym 5-krotnie buforem D. całość umieszczono pomiędzy grafitowymi elektrodami aparatu do transferu półsuchego FastBlot™ (Biometra), wcześniej nawilżonymi nierozcieńczonym buforem D. Białka przenoszone były na membranę przez przez 30 minut przy natężeniu prądu I=0,3A.

Membranę z białkami inkubowano przez godzinę w 5% odtłuszczonym mleku rozpuszczonym w buforze A, a następnie pozostawiono na całą noc w temperaturze 4°C w roztworze mysich monoklonalnych przeciwciał skierowanych odpowiednio przeciwko:

- PI3K rozcieńczonych w stosunku 1:500
- Raf rozcieńczonych w stosunku 1:500
- PLC γ 1 rozcieńczonych w stosunku 1:500
- TrkB rozcieńczonych w stosunku 1:500
- Bcl-2 rozcieńczonych w stosunku 1:1000
- beklina-1 rozcieńczonych w stosunku 1:1000
- kaspaza 3 rozcieńczonych w stosunku 1:700
- β -aktyna rozcieńczonych w stosunku 1:1000

Następnego dnia membrany płukano trzykrotnie po 5 minut buforem A wzbogaconym 0,05% Tritonem X-100, inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z drugorzędowymi przeciwciałami anti-mysimi, sprzęgniętymi z fosfatazą alkaliczną w rozcieńczeniu 1:30 000, płukano dwukrotnie po 5 minut buforem E oraz przez 5 minut w buforze F.

W celu wizualizacji badanych białek wykorzystano roztwory substratów dla fosfatazy alkalicznej: NBT (ang. nitrotetrazolium blue; 9 mg w 300 μ l H₂O_{dest.} i 700 μ l DMF (ang. N,N-Dimethylformamide) oraz BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; 4,5 mg w 1 ml DMF) rozpuszczone w 25 ml buforu F. Membranę inkubowano w mieszaninie substratów przez około 10 minut, a następnie płukano wodą destylowaną i suszono w temperaturze pokojowej. Poziom ekspresji poszczególnych białek został określony na podstawie pomiarów densytometrycznych uzyskanych prążków z wykorzystaniem programu ImageJ (Scion Corporation, USA).

3.5.9. Badanie aktywności enzymatycznej metodą ELISA

Określanie aktywności kaspazy 3, 8 oraz 9

Poziom aktywności kaspaz 3, 8 oraz 9 został oszacowany w komórkach kontrolnych oraz poddanych inkubacji z badanymi substancjami, hodowanych w płytkach 6-dołkowych, wykorzystując test SensoLyte®AMC Caspase Substrate Sampler Kit (Anaspec). Komórki poddano lizie poprzez 30 minutową inkubację z firmowym buforem do lizy (Lysis Buffer, 300 µl/dołek) w temperaturze 4°C, a następnie odwirowano przez 10 min przy 2500 x G, a supernatant przeniesiono do specjalnych czarnych, nietransparentnych płytek 96-dołkowych, gdzie, zgodnie z protokołem, poddano je 30 minutowej inkubacji z substratem dla danej kaspazy. Tak przygotowane próbki analizowano poprzez pomiar intensywności fluorescencji 7-aminoakumaryny - AMC (ang. 7-aminoacoumarin) przy $\lambda_{Ex/Em} = 354/422$ nm z użyciem czytnika mikropłytek 2030 Multilabel Reader Victor_{TMX} (Perkin Elmer).

Określenie aktywności AKT/ERK

Do określenia aktywności białek AKT i ERK zastosowano AKT/ERK Activation InstantOne ELISATM Kit (Invitrogen by ThermoFisher). Przygotowano lizaty komórek hodowanych na płytkach 24-dołkowych poprzez 30 minutową inkubację z firmowym buforem do lizy (Lysis Buffer, 100 µl/dołek) w temperaturze 4°C. Następnie komórki odwirowano przez 10 min przy 10 000 x G, a supernatant przeniesiono do załączonych płytek 96-dołkowych opłaszczonych odpowiednimi przeciwciałami. Następnie po przejściu wszystkich kroków zawartych w załączonym protokole, do próbek dodano substrat 3,3',5,5'-Tetrametylobenzydinę (TMB) w celu wywołania reakcji enzymatycznej, w wyniku której powstają kolorowe kompleksy. Zmiany w intensywności barwy były odczytywane kolorymetrycznie z zastosowaniem czytnika mikropłytek 2030 Multilabel Reader Victor_{TMX4} (Perkin Elmer) przy $\lambda=450$ nm.

Określenie aktywności PKC

W przypadku określenia aktywności kinazy PKC zastosowano PKC Kinase Activity Assay Kit (ABCAM). Test został wykonany według firmowej procedury. Przygotowano lizaty komórek hodowanych na płytkach 24-dołkowych poprzez 30 minutową inkubację z firmowym buforem do lizy (Lysis Buffer, 100 µl/dołek) w temperaturze 4°C. Następnie komórki odwirowano przez 10 min przy 10 000 x G, a supernatant przeniesiono do

załączonych płytek 96-dołkowych, do których wcześniej dodano firmowy bufor (Kinase Dilution buffer). Następnie do każdego z dołków dodano ATP w celu zainicjowania reakcji kinazy i inkubowano przez 90 minut w 30°C. Po tym czasie dodano fosfospecyficzne przeciwciała pierwszorzędowe i dalej prowadzono inkubację przez 60 minut w temperaturze pokojowej, po czym dodano przeciwciała drugorzędowe na 30 minut. W końcowej fazie testu, po etapach płukania dołków, do każdego z nich dodano substrat TMB, co spowodowało inicjację reakcji enzymatycznej i powstanie kolorowych kompleksów. Zmiany w intensywności barwy były odczytywane kolorymetrycznie z zastosowaniem czytnika mikropłytek 2030 Multilabel Reader VictorTMMX4 (Perkin Elmer) przy 450 nm.

3.5.10. Blokowanie ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1, TrkB, Bcl-2, beklina-1 przy użyciu specyficznych siRNA

Linie komórkowe MOGGCCM oraz T98G o gęstości 2×10^5 hodowano na 8-dołkowych szkiełkach typu Lab-TekTM (NuncTM, ThermoFisher) w 37°C i 5% stężeniu CO₂ przez 24h w mieszaninie DMEM:Han'S F12, z 10% surowicą bydlęcą oraz komercyjną mieszaniną antybiotyków Antibiotic-100X (penicylina w stężeniu 10,000 unitów/ml i streptomycyna w stężeniu 25 μ g/ml). Następnie komórki płukano trzykrotnie buforem A z jonami Ca²⁺ i Mg²⁺ i dodawano do nich pożywkę do transfekcji (Transfection Medium) bez antybiotyków i surowicy. W tym czasie przygotowano mieszaninę blokującą zawierającą 2 μ l specyficznego anti-PI3K, anti-Raf, anti-PLC γ 1, anti-TrkB, anti-Bcl-2 lub anti-beklina-1 siRNA, 2 μ l odczynnika do transfekcji (Transfection Reagent) oraz 250 μ l pożywki do transfekcji. Uzyskaną mieszaninę blokującą dodawano do komórek, inkubowano przez 5 godzin w 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności. Po upływie tego czasu do mieszaniny blokującej dodawano 250 μ l pożywki zawierającej 20% surowicy bydlęcej oraz 200 μ g/ml antybiotyków.

Po 24 godzinach, usuwano mieszaninę blokującą, a komórki zawieszono w standardowej pożywce DMEM:Han'S F12 zawierającej 10% surowicę bydlęcą oraz 100 μ g/ml antybiotyków i pozostawiono w 37°C, 95% wilgotności i 5% CO₂ na kolejne 18 godzin. Następnie płyn hodowlany wymieniono na świeży, a stransfekowane komórki wykorzystano do dalszych analiz (inkubacji z badanymi substancjami, identyfikacji apoptozy, autofagii i nekrozy). Efekt wyciszania genów na poziomie białkowym był analizowany z wykorzystaniem metody immunoblotingu.

3.5.11. Koimmunoprecypitacja

Hodowle komórkowe o gęstości 5×10^7 prowadzono w naczyniach typu Falcon przez 24 godziny w temperaturze 37°C przy stałym dopływie 5% CO_2 oraz wilgotności. Do hodowli dodano 1 ml lodowatego buforu H i inkubowano w lodzie przez 10 minut. Następnie zawiesinę komórek przenoszono do nowych, schłodzonych probówek Eppendorf i wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy $10\,000 \times G$. Uzyskany supernatant przenoszono do nowych probówek, dodawano białko A sprzężone z agarozą i poddawano inkubacji przez 30 minut w temperaturze 4°C . Następnie komórki odwirowano przez 30 sekund przy $1000 \times G$ w 4°C , a uzyskane supernatanty inkubowano z specyficznymi przeciwciałami pierwszorzędowymi w stężeniu $2\mu\text{g/ml}$ przez 2 godziny w 4°C . Po odwirowaniu przy sile odśrodkowej $1000 \times G$ przez 30 sekund w 4°C supernatant odrzucano, a powstałe immunoprecypitaty płukano trzykrotnie w buforze H i poddawano rozdzielni elektroforetycznemu oraz immunoblotingowi.

3.5.12. Immunocytochemia

Komórki kontrolne oraz badane hodowano w ilości 3×10^7 na 4-dołkowych szkiełkach typu Lab-Tek™, a następnie płukano trzykrotnie buforem A z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} i utrwalano przez 10 min schłodzonym 3,7% roztworem paraformaldehydu. Po tym czasie komórki poddawano działaniu 0,2% roztworu Tritonu X-100 przez 7 minut w temperaturze pokojowej. Następnie hodowle przemywano buforem A i inkubowano przez 30 minut w 5% roztworze surowicy bydlęcej BSA (ang. Bovine Serum Albumin). Po tym czasie komórki płukano buforem A i poddano całonocnej inkubacji w temperaturze 4°C z mysimi monoklonalnymi przeciwciałami pierwszorzędowymi anti-Bcl-2 w stosunku 1:200 oraz monoklonalnymi króliczymi anti-beklina-1 w stosunku 1:200. Następnego dnia hodowle płukano trzykrotnie po 5 minut 0,05% roztworem Tritonu X-100 w buforze A i poddawano inkubacji z drugorzędowymi przeciwciałami, antymysimi sprzężonymi z AlexaFluor® 488 lub antykróliczymi sprzężonymi z AlexaFluor® 594, rozcieńczonymi 1:50, przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty płukano wodą destylowaną, komory separujące usuwano i nanoszono szkiełka nakrywkowe. Tak przygotowane preparaty oglądano przy odpowiedniej długości fali $\lambda=488/\lambda=594$ nm z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego Axiovert 200M z głowicą skanującą LSM 5 PASCAL (Zeiss).

3.5.13. Badanie zahamowania migracji komórek glejaków z zastosowaniem Testu Rysy (Wound Assay)

Linie komórkowe hodowano w ilości 5×10^5 w standardowych warunkach (37°C , 95% wilgotności, 5% CO_2) na płytkach hodowlanych o średnicy 35 mm (NuncTM, ThermoFisher) do osiągnięcia konfluencji. Następnie, w uzyskanej monowarstwie (ang. monolayer), końcówką pipety automatycznej (objętość: 200 μl , średnica: 0,9 mm) wykonano rysę i płukano szalki trzykrotnie buforem A w celu usunięcia odklejonych komórek. Następnie dodawano świeże podłoże hodowlane z 10% surowicą oraz 100 μg antybiotykami. Komórki kontrolne inkubowane z 0,01% DMSO oraz poddane aplikacji badanych związków pozostawiono na 24 godziny w standardowych warunkach. Po tym czasie komórki barwiono metodą May-Grünwalda-Giemsy. W celu przygotowania preparatów do barwienia płyn znad komórek usuwano, a komórki przepłukano buforem A z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} . Następnie, do każdej szalki dodano 1 ml barwnika May-Grünwalda i pozostawiono na 3 minuty. Po tym czasie, dodawano taką samą objętość wody destylowanej. Po 3 minutach mieszaninę usuwano, komórki płukano wodą destylowaną i barwiono 1 ml barwnika Giemsy (w rozcieńczeniu 1:20) przez 30 minut. Następnie barwnik odpipetowano, a hodowle płukano wodą destylowaną i pozostawiono do wyschnięcia. Tak przygotowane preparaty obserwowano i mierzono odległości między czółami rys przy pomocy mikroskopu świetlnego BX51 (Olympus) z kamerą oraz programu CellSens. Wyniki przedstawiono w przeliczeniu na procent kontroli. Sporządzono również kontrolę negatywną, tzw. kontrolę rysy, poprzez wybarwienie hodowli bezpośrednio po wykonaniu rysy.

3.5.14. Analiza statystyczna

Uzyskane z co najmniej 3 powtórzeń wyniki, przedstawiono w postaci wykresów ze średnią \pm odchylenie standardowe. Określono także istotność statystyczną między próbami testem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (one-way ANOVA) z testem post-hoc Dunnett'a przy użyciu programu GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., USA). Istotności statystyczne zostały oznaczone w odniesieniu do kontroli i opisane „*” dla $p < 0,05$.

4. Wyniki

4.1. Wpływ LY294002, U-73122 oraz LOXO-101 na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w komórkach glejaków

Identyfikacji komórek apoptotycznych, autofagalnych oraz nekrotycznych w liniach MOGGCCM oraz T98G inkubowanych z LY294002, U-73122 oraz LOXO-101 w różnych stężeniach, dokonano na podstawie zmian morfologicznych komórek wybarwionych specyficznymi barwnikami fluorescencyjnymi: Hoechst 33342, jodkiem propidionowym oraz oranżem akrydyny, wg metody opisanej w rozdziale Materiały i Metody (3.5.1. i 3.5.2.).

4.1.1. LY294002

Analiza mikroskopowa linii MOGGCCM i T98G poddanych 24 godzinnej inkubacji z inhibitorem kinazy PI3K - LY294002, w stężeniach 5, 10, 15 i 30 μM , wykazała, że związek ten skutecznie indukował zaprogramowaną śmierć w komórkach glejaków. Jak przedstawia Figura 1A. LY294002 w stężeniu 15 μM okazał się najskuteczniejszym induktorem zaprogramowanej śmierci w linii MOGGCCM, a autofagia była dominująca (76%). Zjawisku temu towarzyszyła apoptoza, która była obserwowana w około 18% komórek gwiazdki anaplastycznego, jednakże było to skorelowane z wystąpieniem efektu nekrotycznego (powyżej 10%). W przypadku stężenia 10 μM skuteczność indukcji autofagii (45%) oraz apoptozy (9%) była niższa niż w stężeniu 15 μM LY294002, jednakże nie towarzyszył temu efekt nekrotyczny. Z kolei w linii T98G stężenie 10 μM najskuteczniej indukowało PCD. Apoptoza była dominującym typem śmierci (prawie 30%), której towarzyszyło zjawisko autofagii (20%). Nie zaobserwowano znacznego wzrostu nekrozy. Dlatego też stężenie 10 μM LY294002 zostało wybrane do dalszych analiz.

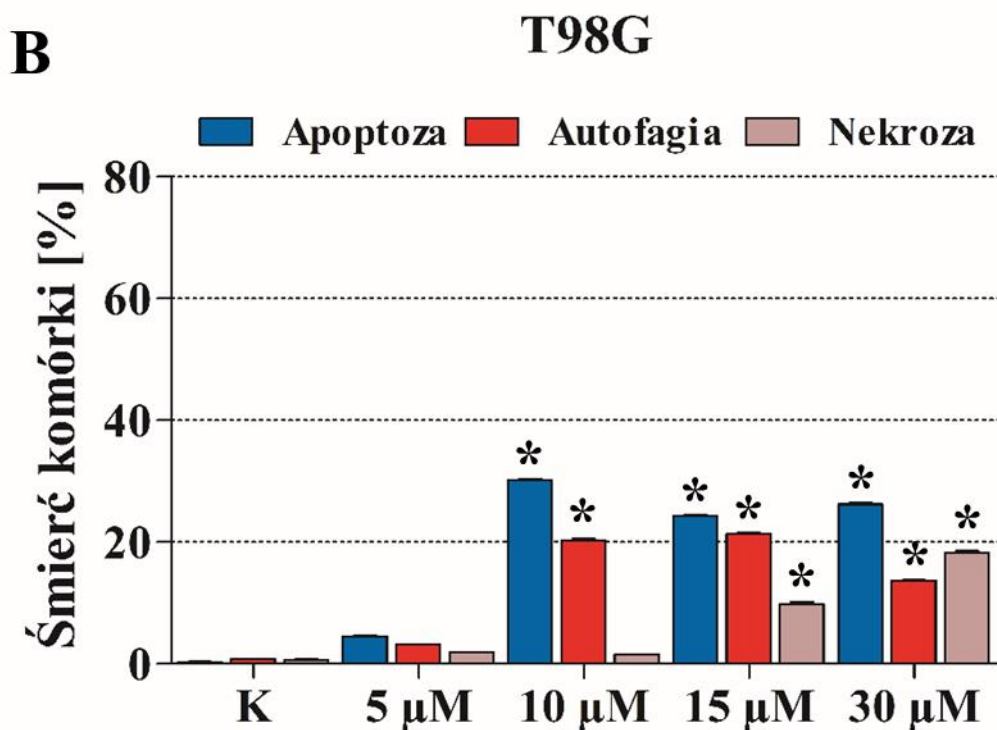
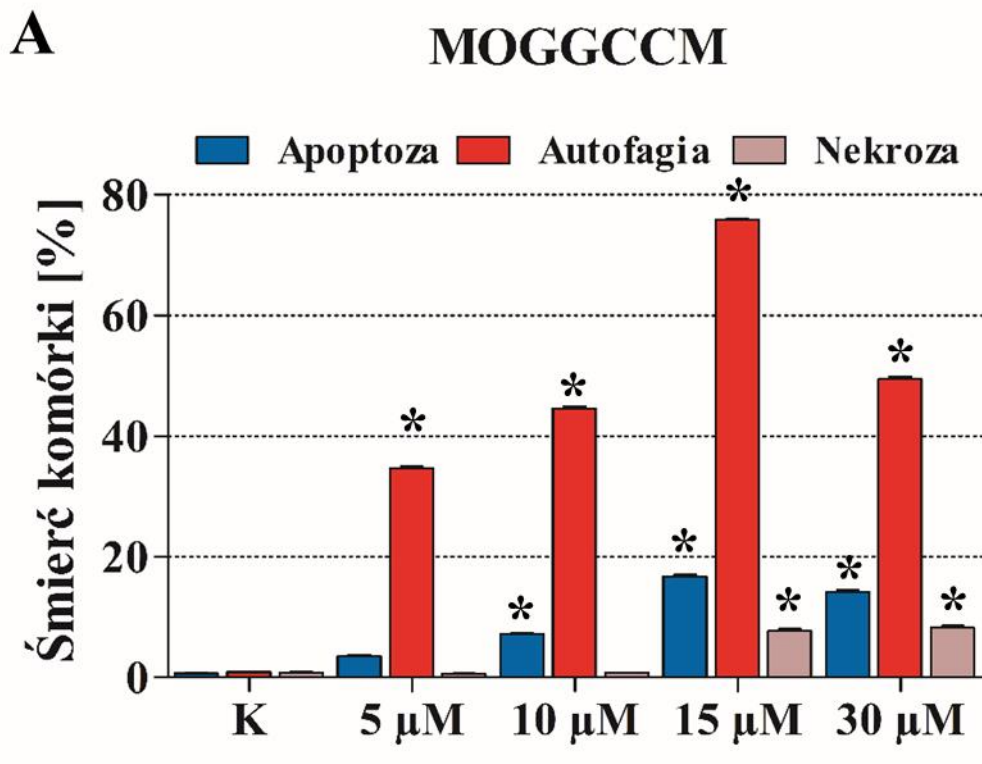


Figura 1. Efekt 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z LY294002 (0-30μM). K - kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

4.1.2. U-73122

Inkubacja komórek gwiazdziaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego z inhibitorem fosfolipazy C γ 1 - U-73122 w stężeniach 0-30 μ M wykazała, że śmiertelność badanych komórek zależała od linii komórkowej. Komórki MOGGCCM (Figura 2A) okazały się być bardziej odporne, niż komórki glejaka wielopostaciowego (Figura 2B). W przypadku linii gwiazdziaka anaplastycznego najskuteczniejsze w indukcji zaprogramowanej śmierci okazało się stężenie 5 μ M, które inicjowało apoptozę w 9,5% populacji, autofagię w 4% zaś nekrozę w mniej niż 1% (Figura 2A). W przypadku stężenia 30 μ M najczęściej obserwowano autofagię (8%), jednakże było to również związane ze wzrostem efektu nekrotycznego (ponad 6%) w stosunku do pozostałych stężeń. Stężenia 10 μ M oraz 15 μ M nie wywierały istotnego wpływu na indukcję śmierci w komórkach MOGGCCM. Z uwagi na ten fakt, stężenie 5 μ M zostało wybrane do dalszych analiz z wykorzystaniem linii MOGGCCM. W przypadku komórek glejaka wielopostaciowego, które okazały się być bardziej podatne na eliminację na drodze zaprogramowanej śmierci, apoptoza była dominująca w każdym stężeniu U-73122 (5-30 μ M). Najwięcej komórek apoptotycznych obserwowano po inkubacji z 30 μ M stężeniem U-73122 (27%), co niestety wiązało się z podwyższeniem poziomu nekrozy (9%). Inkubacja komórek glejaka wielopostaciowego z U-73122 nie inicjowała znacząco autofagii we wszystkich blokowanych stężeniach. Dlatego też do dalszych analiz z wykorzystaniem linii T98G wybrano stężenie 15 μ M, które indukowało głównie apoptozę (24%), a jednocześnie nie wywoływało znacznego efektu nekrotycznego (>1%).

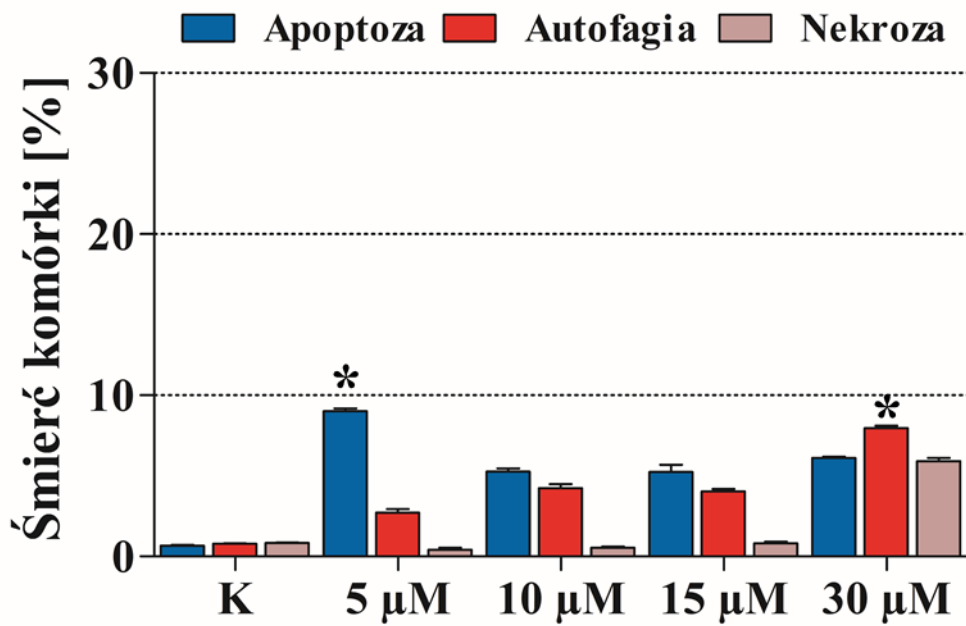
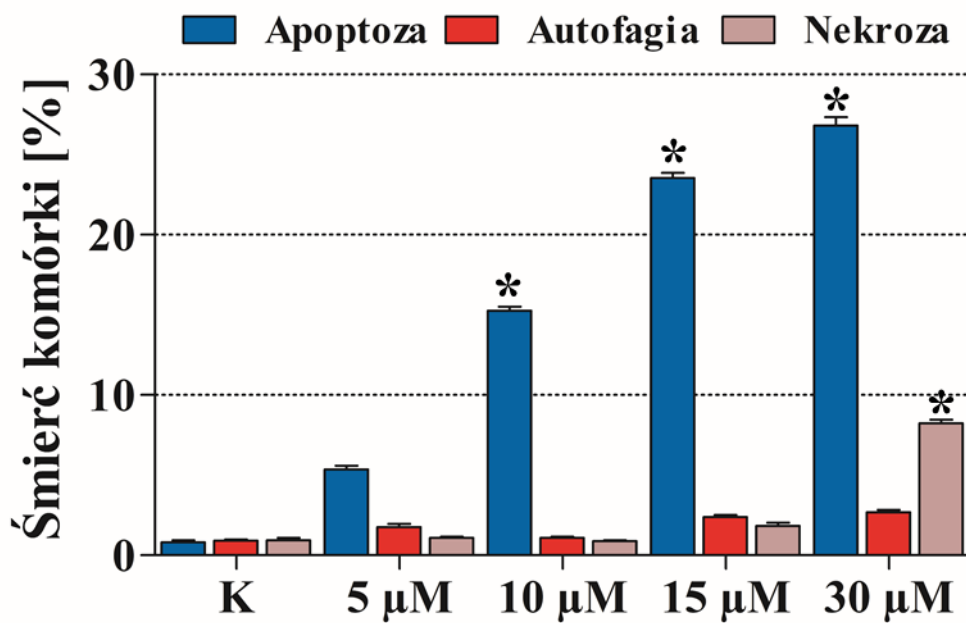
A**MOGGCCM****B****T98G**

Figura 2. Efekt 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z U-73122 (0-30μM). **K** - kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

4.1.3. LOXO-101

Analiza poziomu oraz rodzaju śmierci w linii MOGGCCM indukowanej z inhibitorem receptora TrkB LOXO-101, wykazała, iż związek ten najskuteczniej eliminował komórki gwiaździaka anaplastycznego w stężeniu 1 μM , a dominującym typem śmierci była apoptoza (12%) (Figura 3A). Autofagia oraz nekroza inicjowana była odpowiednio w 2% oraz 1% populacji komórek. W przypadku komórek glejaka wielopostaciowego inhibitor receptora TrkB najskuteczniej indukował apoptozę w stężeniach 0,75 μM (13%) oraz 1 μM (14%) (Figura 3B), czemu nie towarzyszył istotny wzrost ilości komórek autofagalnych czy nekrotycznych. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane po aplikacji LOXO-101 do dalszych badań zostało wybrane stężenie 1 μM zarówno w linii MOGGCCM, jak i T98G.

W dalszych etapach rozprawy doktorskiej, do badań wykorzystano również Temozolomid oraz sorafenib, których najefektywniejsze stężenia eliminujące komórki MOGGCCM oraz T98G na drodze zaprogramowanej śmierci zostały określone we wcześniejszych pracach eksperymentalnych [85–87].

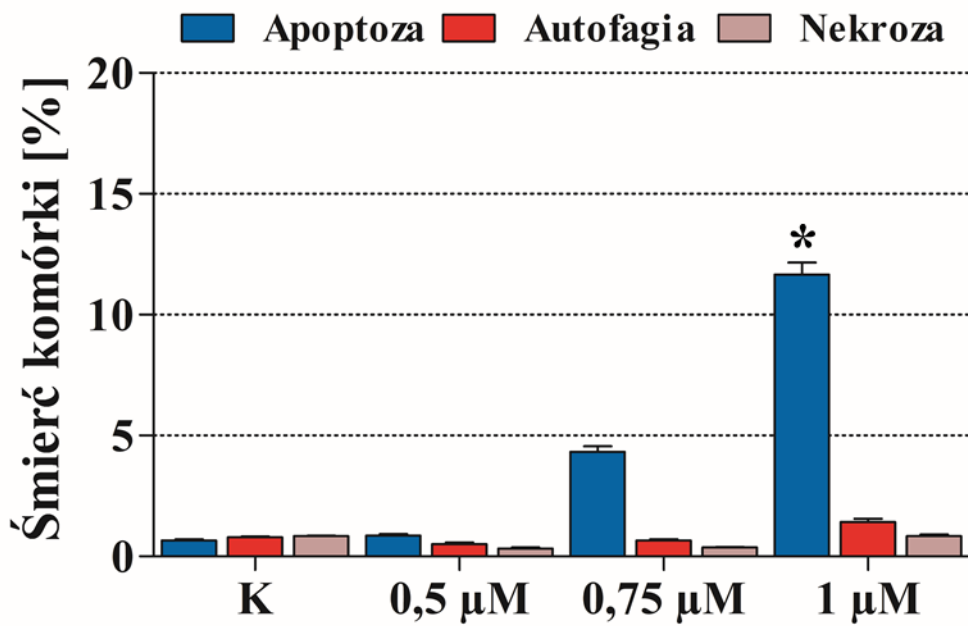
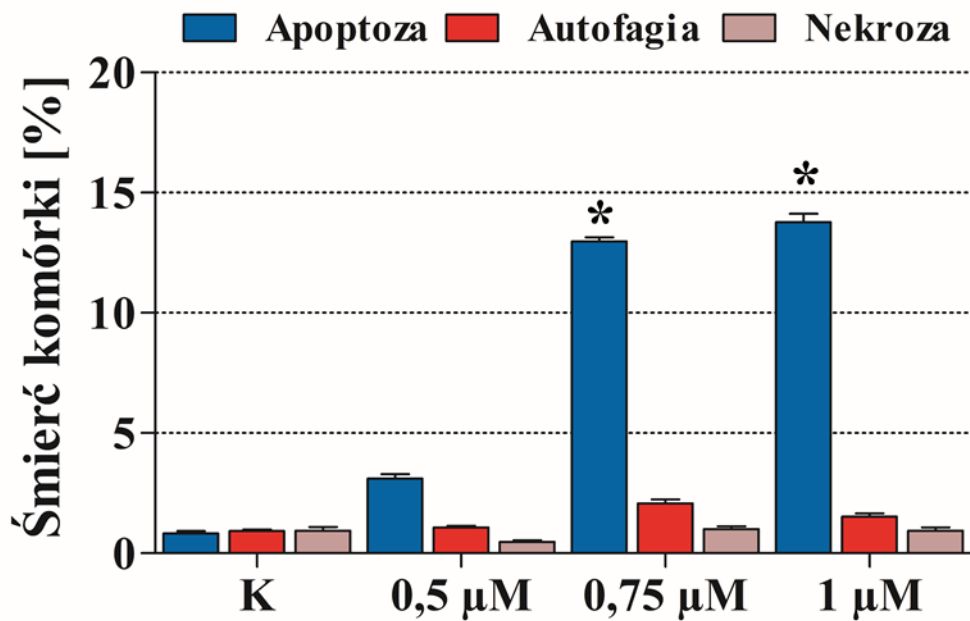
A**MOGGCCM****B****T98G**

Figura 3. Efekt 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z **LOXO-101** (0-1µM). **K** - kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

4.2. Podsumowanie skuteczności LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 w indukcji zaprogramowanej śmierci komórek MOGGCCM i T98G

Wyniki analizy poziomu oraz rodzaju śmierci, jakie indukowały LY294002, sorafenib, Temozolomid, U-73122 oraz LOXO-101, wykazały, że komórki gwiazdki anaplastycznego (Figura 4A) były w większości przypadków bardziej odporne na indukcję zaprogramowanej śmierci w porównaniu do glejaka wielopostaciowego. Wyjątek stanowiła aplikacja LY294002, która okazała się najskuteczniej indukować PCD, a autofagia była dominującym typem śmierci (ponad 40%). W linii glejaka wielopostaciowego (Figura 4B) aplikacja inhibitora kinazy PI3K również powodowała istotny wzrost apoptozy (prawie 30%) oraz autofagii (prawie 20%), jednakże linia ta okazała się być najbardziej wrażliwa na aplikację sorafenibu, a dominującym typem śmierci była autofagia (prawie 40%). Znaczny wzrost poziomu nekrozy nie był obserwowany w żadnej z linii.

Indukcja apoptozy, autofagii i nekrozy zaobserwowane z wykorzystaniem techniki mikroskopii fluorescencyjnej, zostały dodatkowo potwierdzone na poziomie ultrastrukturalnym (mikroskopia elektronowa), a typowe zmiany morfologiczne dla poszczególnych typów śmierci komórkowej zostały przedstawione na Figurze 5.

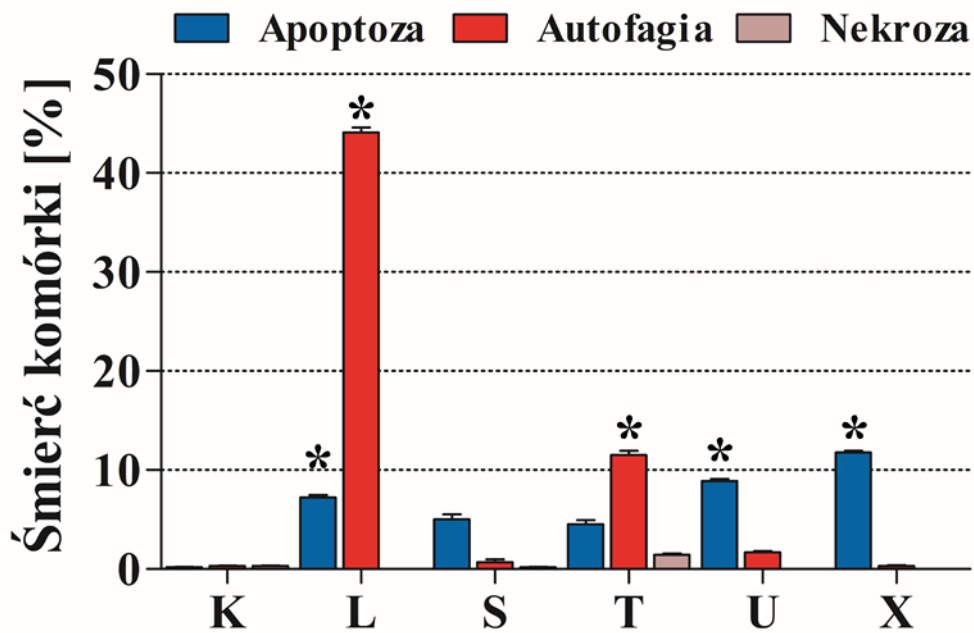
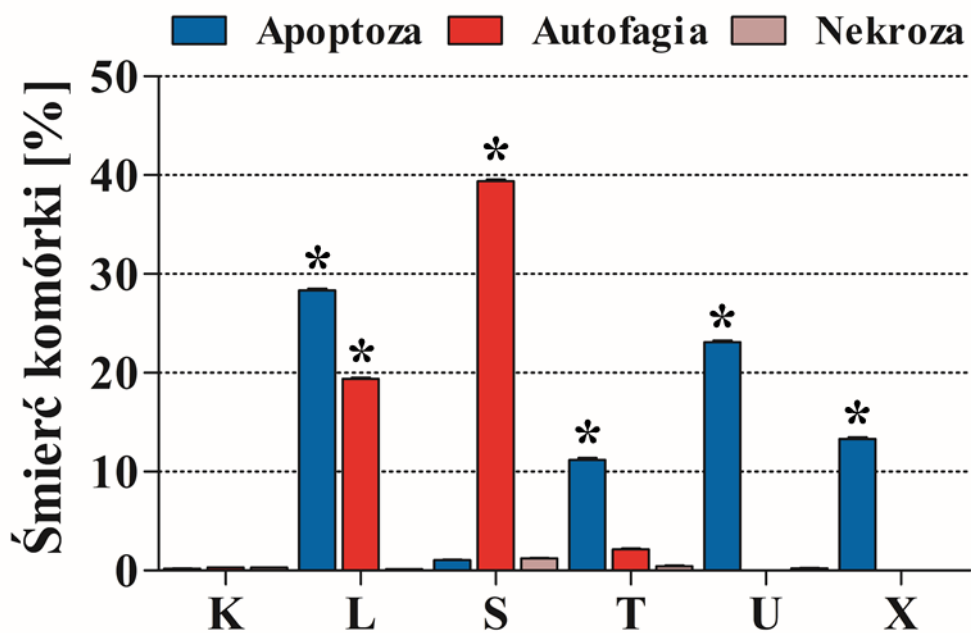
A**MOGGCCM****B****T98G**

Figura 4. Porównanie efektów 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z Temozolomidem w stosunku do badanych inhibitorów. K – kontrola, L – LY294002, S – sorafenib, T – Temozolomid, U – U-73122, X – LOXO-101; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

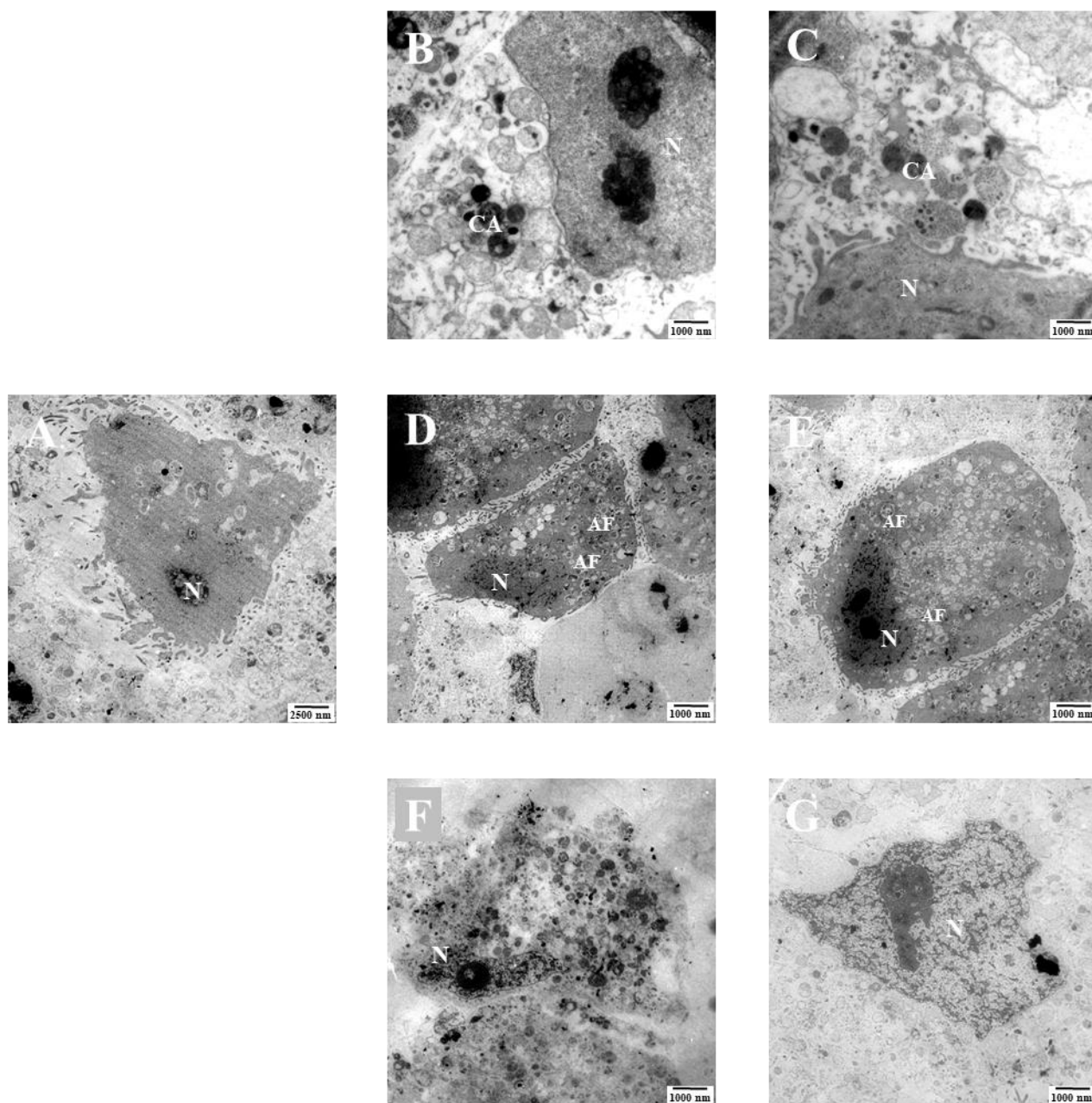


Figura 5. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego kontrolnych komórek T98G (A) oraz poddanych inkubacji z badanymi związkami: komórki T98G (B,C) inkubowane z LY294002; komórki T98G (C,D) inkubowane z sorafenibem; komórki nekrotyczne (F,G) inkubowane z LY294002, sorafenibem, Temozolomidem oraz LOXO-101. N – jądro komórkowe; CA – ciała apoptotyczne; AF – autofagosomy.

4.3. Efekt działania skojarzonej aplikacji LY294002, sorafenibu, Temzolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 w kontekście indukcji zaprogramowanej śmierci w liniach MOGGCCM oraz T98G

Dokonano analizy jednoczesnego działania LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 w kontekście indukcji zaprogramowanej śmierci w komórkach gwiazdki anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego.

Uzyskane wyniki potwierdzają większą skuteczność terapii skojarzonej w stosunku do pojedynczej aplikacji związków, co obserwowano zarówno w komórkach MOGGCCM (Figura 7A) jak i T98G (Figura 7B). Jednakże, podobnie jak w przypadku inkubacji z pojedynczymi substancjami, linia gwiazdki anaplastycznego okazała się być bardziej oporna na indukcję zaprogramowanej śmierci niż komórki glejaka wielopostaciowego. Najskuteczniejsza w linii MOGGCCM okazała się być kombinacja LY294002 oraz TMZ (LT, Figura 6A), która inicjowała autofagię w prawie 40% komórek. Towarzyszyło temu zjawisko apoptozy (24%), natomiast efekt nekrotyczny nie był obserwowany. Wysoką skutecznością w eliminacji komórek gwiazdki anaplastycznego wykazały się również połączenia U-73122, LY294002 i TMZ (ULT) oraz LOXO-101, LY294002 i TMZ (XLT), które indukowały apoptozę w odpowiednio 34% i 33% komórek (Figura 6A) i ten rodzaj śmierci był dominujący. Na szczególną uwagę zasługuje również połączenie inhibitora kinazy PI3K, inhibitora Raf oraz Temozolomidu (LST). Dołączenie do kombinacji LT, która indukowała głównie autofagię (39%), sorafenibu (S) spowodowało niewielkie zwiększenie poziomu apoptozy z 24% na 26%, jednakże znaczące obniżenie poziomu autofagii do niecałych 3% (Figura 6A). Wspomniana kombinacja (LST) okazała się być najskuteczniejszą w indukcji zaprogramowanej śmierci w linii T98G, a dominującym typem śmierci była apoptoza (64%) (Figura 6B). Ten typ PCD dominował również po zastosowaniu kombinacji LS i XST, a ilość martwych na tej drodze komórek wynosił ponad 50%. Wzrost autofagii obserwowano jedynie po inkubacji linii T98G z LY294002 oraz sorafenibu. Jak przedstawiono na Figrze 6. Wszystkie zastosowane kombinacje badanych związków nie miały znacznego wpływu na indukcję nekrozy w komórkach gwiazdki anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego. Jedynym wyjątkiem była jednoczesna inkubacja LY294002, sorafenibu, Temozolomidu oraz LOXO-101, która inicjowała śmierć martwiczą w prawie 10% komórek.

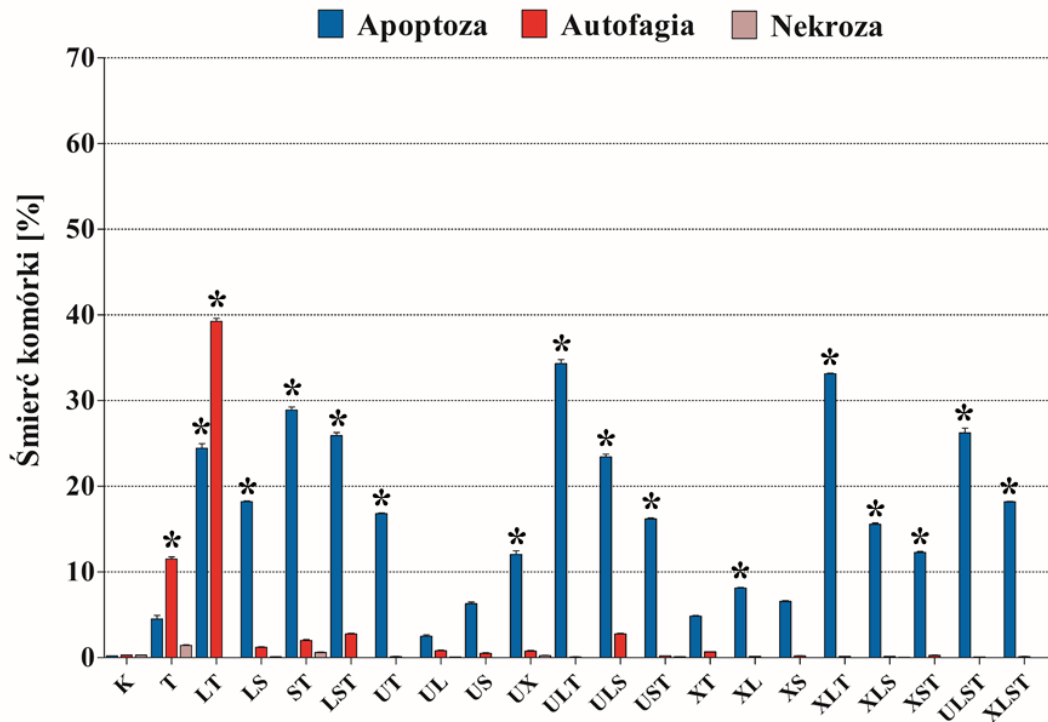
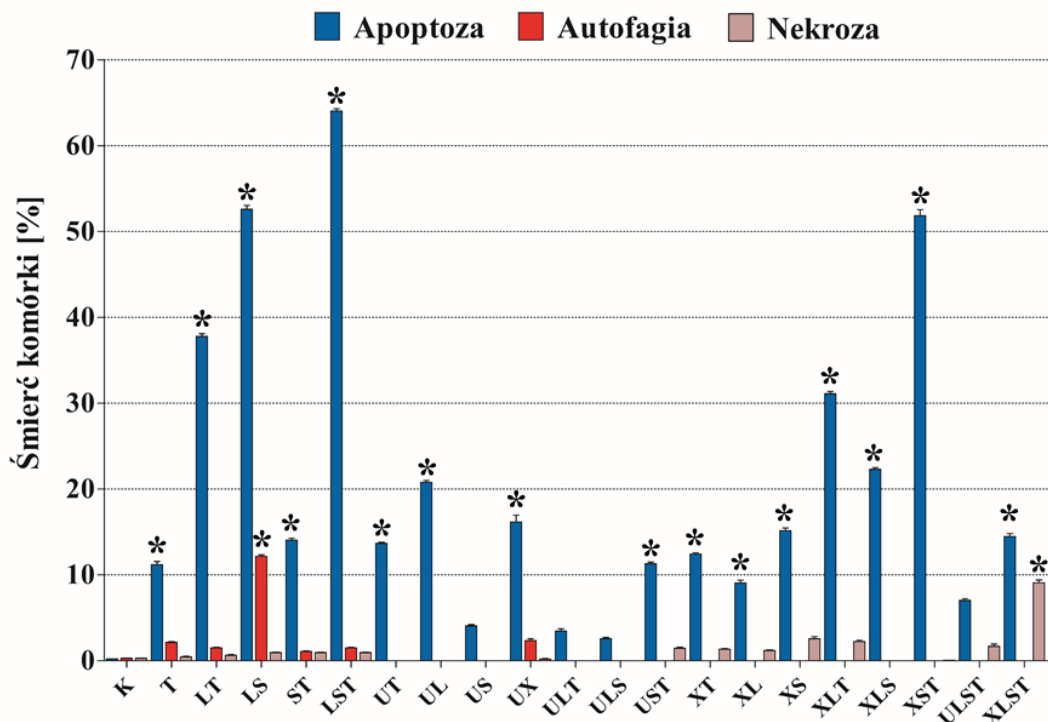
A**MOGGCCM****B****T98G**

Figura 6. Porównanie efektów 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z Temozolomidem w stosunku do kombinacji inhibitorów. **K** – kontrola, **L** – LY294002, **S** – sorafenib, **T** – Temozolomid, **U** – U-73122, **X** – LOXO-101; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

Badanie wpływu równoczesnej aplikacji LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 na indukcję zaprogramowanej śmierci w komórkach gwiaździaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego wykazały ich znaczący i dominujący pro-apoptotyczny potencjał. W kontekście kontrowersyjności mechanizmu autofagii w leczeniu nowotworów, uzyskane wyniki wydają się być bardzo korzystne. Co ważne, pomimo inkubacji komórek ze związkami o różnym mechanizmie działania, nie odnotowano prawie w żadnym z wariantów znacznego efektu nekrotycznego.

Ponieważ nie wszystkie przebadane kombinacje leków eliminowały komórki glejaków na drodze zaprogramowanej śmierci z wysoką skutecznością, do dalszych etapów badań na poziomie molekularnym wybrano tylko te najbardziej efektywne.

KOMBINACJE:

- **LY294002 + Temozolomid (LT)**
 - **LY294002 + sorafenib (LS)**
- **LY294002 + sorafenib + Temozolomid (LST)**
- **U-73122 + LY294002 + Temozolomid (ULT)**
- **LOXO-101 + LY294002 + Temozolomid (XLT)**
- **LOXO-101 + sorafenib + Temozolomid (XST)**

4.4. Poziom ekspresji oraz aktywność białek markerowych

Procesy indukcji zaprogramowanej śmierci w komórkach są na poziomie molekularnym ściśle regulowane poprzez charakterystyczne białka markerowe. Apoptoza podlega m.in. kontroli kaspaz, natomiast autofagia białku beklina-1. Dlatego też, w celu potwierdzenia indukcji zaprogramowanej śmierci pod wpływem pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 w komórkach MOGGCCM oraz T98G przeanalizowano poziom ekspresji aktywnej kaspazy 3 oraz bekliny-1, a także aktywność kaspaz 3, 8 i 9.

4.4.1. Poziom ekspresji kaspazy 3

Poziom ekspresji kaspazy 3 w komórkach MOGGCCM oraz T98G po inkubacji z badanymi związkami po pojedynczej jak i skojarzonej aplikacji, oceniono z wykorzystaniem metody immunoblotingu (Materiały i Metody: **3.5.8.**).

Z przeprowadzonych analiz wynika, że LY294002, sorafenib, Temozolomid, U-73122 oraz LOXO-101 zwiększają poziom ekspresji kaspazy 3 zarówno w linii gwiazdziaka anaplastycznego (Figura 7A) jak i glejaka wielopostaciowego (Figura 8B), jednak skuteczność indukcji zależy od linii komórkowej oraz rodzaju zastosowanej kombinacji. W obu liniach zaobserwowano, że wzrost ilości enzymu był znacznie wyższy w przypadku skojarzonej inkubacji, w porównaniu do pojedynczej aplikacji (Figura 7). W komórkach MOGGCCM jedynie inhibitor fosfolipazy C γ 1 (U) znacząco zwiększał ekspresję kaspazy 3 (o 13% w stosunku do kontroli), podczas gdy taką właściwość wykazywały wszystkie zastosowane kombinacje. Najskuteczniejszym wariantem okazało się być połączenie U-73122, LY294002 oraz TMZ (ULT), które powodowało wzrost ekspresji kaspazy 3 aż o 49% w stosunku do kontroli (Figura 7A). Komórki T98G okazały się być bardziej wrażliwe na zwiększanie poziomu ekspresji badanego markera apoptozy. W przypadku pojedynczej aplikacji istotny efekt obserwowano po zastosowaniu TMZ (T), oraz LOXO-101 (X), a najskuteczniejszy okazał się być inhibitor kinazy PI3K (L) oraz fosfolipazy C γ 1 (U) powodując wzrost ekspresji kaspazy3 odpowiednio o 29% i 27%. W przypadku skojarzonego działania najwyższa ilość enzymu obserwowano po inkubacji komórek T98G z LST (wzrost ekspresji o 73%), LS (wzrost o 67%) oraz XST (wzrost o 65%). Co ciekawe jednoczesne zastosowanie U-73122, LY294002 oraz Temozolomidu (ULT) nie miało wpływu na poziom ekspresji badanego markera apoptozy.

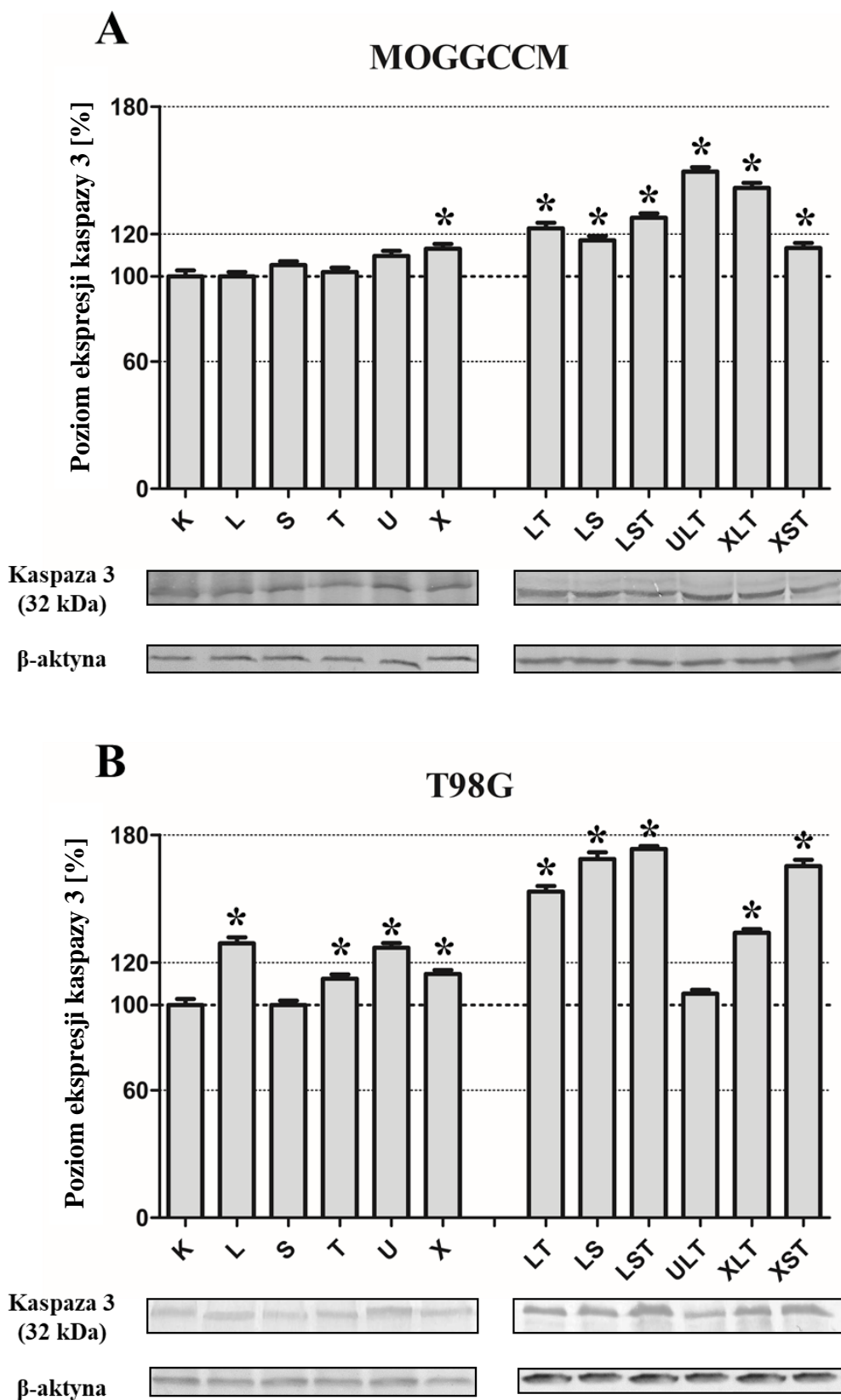


Figura 7. Wpływ 24 godzinnej, pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U), LOXO-101 (X) na poziom ekspresji kaspazy 3 w komórkach MOGGCCM (A) oraz T98G (B). K – kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

4.4.2. Aktywność kaspaz 3, 8 oraz 9

Z danych literaturowych wiadomo, że nie tylko poziom ekspresji, ale także aktywność kaspaz ma wpływ na indukcję apoptozy. Dlatego też, w celu potwierdzenia wcześniejszych badań dotyczących udziału kaspazy 3 we wprowadzaniu komórek MOGGCCM oraz T98G na drogę zaprogramowanej śmierci przeanalizowano wpływ LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 na aktywność tego enzymu. Dodatkowo ocenie poddano aktywność kaspazy 8 i 9 w celu weryfikacji rodzaju szlaku (wewnątrz- lub zewnątrzpochodnego), którym przebiegał sygnał śmierci.

Z przeprowadzonej analizy wynika, że w linii MOGGCCM (Figura 8), pojedyncza aplikacja inhibitorów fosfolipazy C γ 1 (U) oraz receptora TrkB (X), skutecznie zwiększała aktywność kaspazy 3 odpowiednio o 10% i 13% (Figura 8A) w stosunku do kontroli (100%). W przypadku inkubacji komórek gwiazdki anaplastycznego z U-73122 (U) zaobserwowano również istotny wzrost aktywności kaspazy 9 (o 14%) (Figura 8C). Aplikacja LOXO-101 (X) zwiększyła aktywność kaspazy 8 o 23% (Figura 8B). W przypadku jednoczesnej inkubacji podwyższenie aktywności kaspazy 3 (Figura 8A) obserwowano pod wpływem LST (21%), ULT (27%) oraz XST (14%). Dodatkowo kombinacje ULT, LS oraz LST spowodowały istotny wzrost aktywności kaspazy 9 odpowiednio o 29% 16% oraz 23% (Figura 9C). Kombinacja XST w istotny sposób (o 32%) zwiększyła poziom aktywności kaspazy 8 (Figura 8B). Co ciekawe, kombinacje, LS oraz XLT nie aktywowały wykonawczej kaspazy 3, zwiększały natomiast aktywność odpowiednio kaspazy 9 oraz 8 (11%). Jednoczesne zastosowanie LY294002 oraz Temozolomidu (LT) nie miało istotnego wpływu na aktywność żadnej z badanych kaspaz.

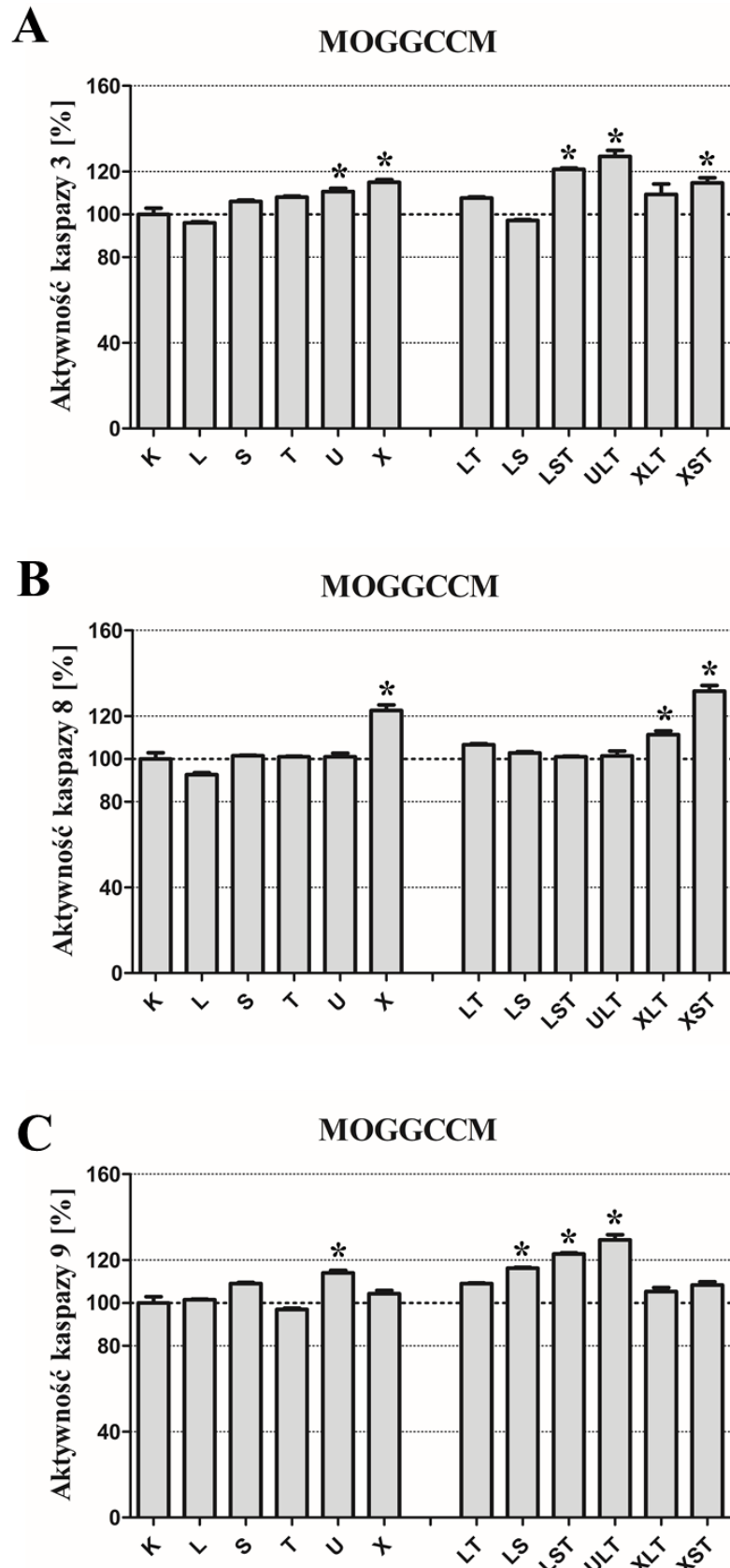


Figura 8. Wpływ 24 godzinnej, pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U), LOXO-101 (X) na aktywność kaspazy 3 (A), 8 (B) oraz 9 (C) w komórkach MOGGCCM. K – kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

Linia T98G (Figura 10), w porównaniu z linią MOGGCCM, okazała się być bardziej wrażliwa na zwiększanie aktywności kaspazy 3 (Figura 9A). W przypadku pojedynczej aplikacji wszystkie badane związki, poza sorafenibem (S), w istotny sposób pobudzały aktywność tego enzymu. Inhibitor kinazy PI3K (L) okazał się najskuteczniejszy i zwiększał ją o 31% (Figura 9A). Dodatkowo, w przypadku LY294002, TMZ oraz U-73122 zaobserwowano, wzrost aktywności kaspazy 9 odpowiednio o 19, 21 i 19% (Figura 9C), zaś inkubacja z LOXO-101 pobudzała aktywność kaspazy 8 o 9% (Figura 10B). Wszystkie kombinacje, poza ULT, w znacznym stopniu zwiększały poziom aktywności kaspazy 3 (LT – 35%, LS – 45%, XLT – 36%, a XST – 42%). Najskuteczniejsza okazała się jednoczesna aplikacja LY294002, sorafenibu i Temozolomidu (LST) (wzrost o 53%) (Figura 10A). Towarzyszył temu wzrost aktywności kaspazy 9 o 32% (Figura 9C) oraz kaspazy 8 (o 8%) (Figura 9B). Aktywację kaspazy 8 oraz 9 obserwowano również po zastosowaniu kombinacji XST, odpowiednio o 16% i 20%. W przypadku aplikacji LT, LS oraz XLT istotne zwiększenie aktywności kaspazy 3 było ściśle skorelowane z aktywacją jedynie kaspazy 9 (Figura 9C), a istotne zmiany w poziomie kaspazy 8 nie były obserwowane (Figura 9B).

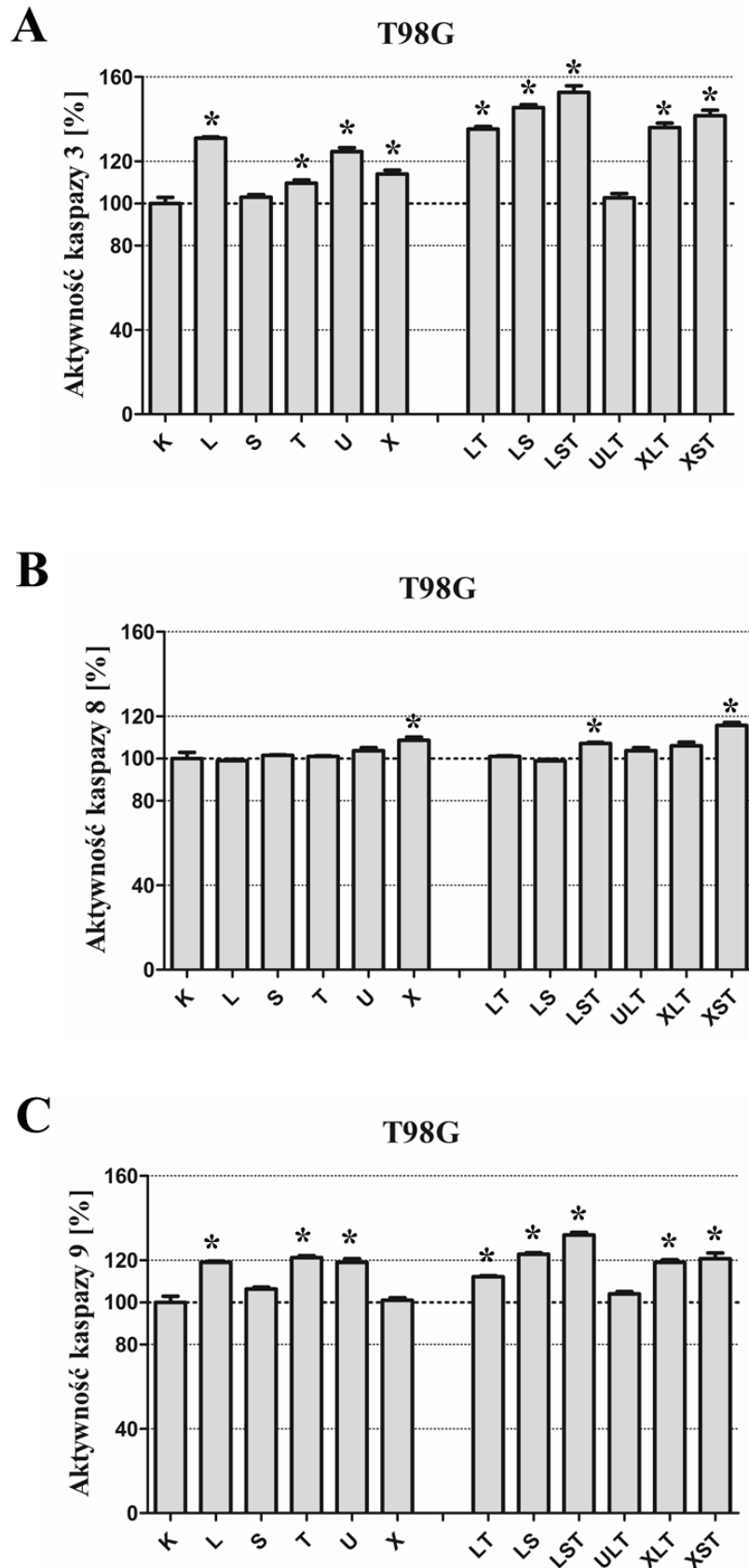


Figura 9. Wpływ 24 godzinnej, pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U), LOXO-101 (X) na aktywność kaspazy 3 (A), 8 (B) oraz 9 (C) w komórkach T98G. K – kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

4.4.3. Analiza poziomu ekspresji bekliny-1

Drugim obserwowanym typem zaprogramowanej śmierci w komórkach T98G oraz MOGGCCM po aplikacji badanych związków była autofagia. Jednym z markerów tego procesu jest białko beklina-1, które reguluje prawidłowy proces powstawania autofagosomów (Wstęp: 1.8.2).

Metoda immunoblotingu wykazała wzrost ekspresji bekliny-1 w komórkach gwiaździaka anaplastycznego jedynie po inkubacji z LY294002 oraz Temozolomidem w pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji (Figura 11A). W przypadku komórek glejaka wielopostaciowego podwyższoną ilość bekliny-1 obserwowano jedynie w przypadku inhibitora kinazy PI3K (L) – o 14% – oraz po zastosowaniu inhibitora kinazy Raf (S) – o 29% (Figura 10B). Co ciekawe, żaden z wariantów skojarzonej aplikacji nie powodował zmian w poziomie ekspresji markera autofagii (Figura 10B).

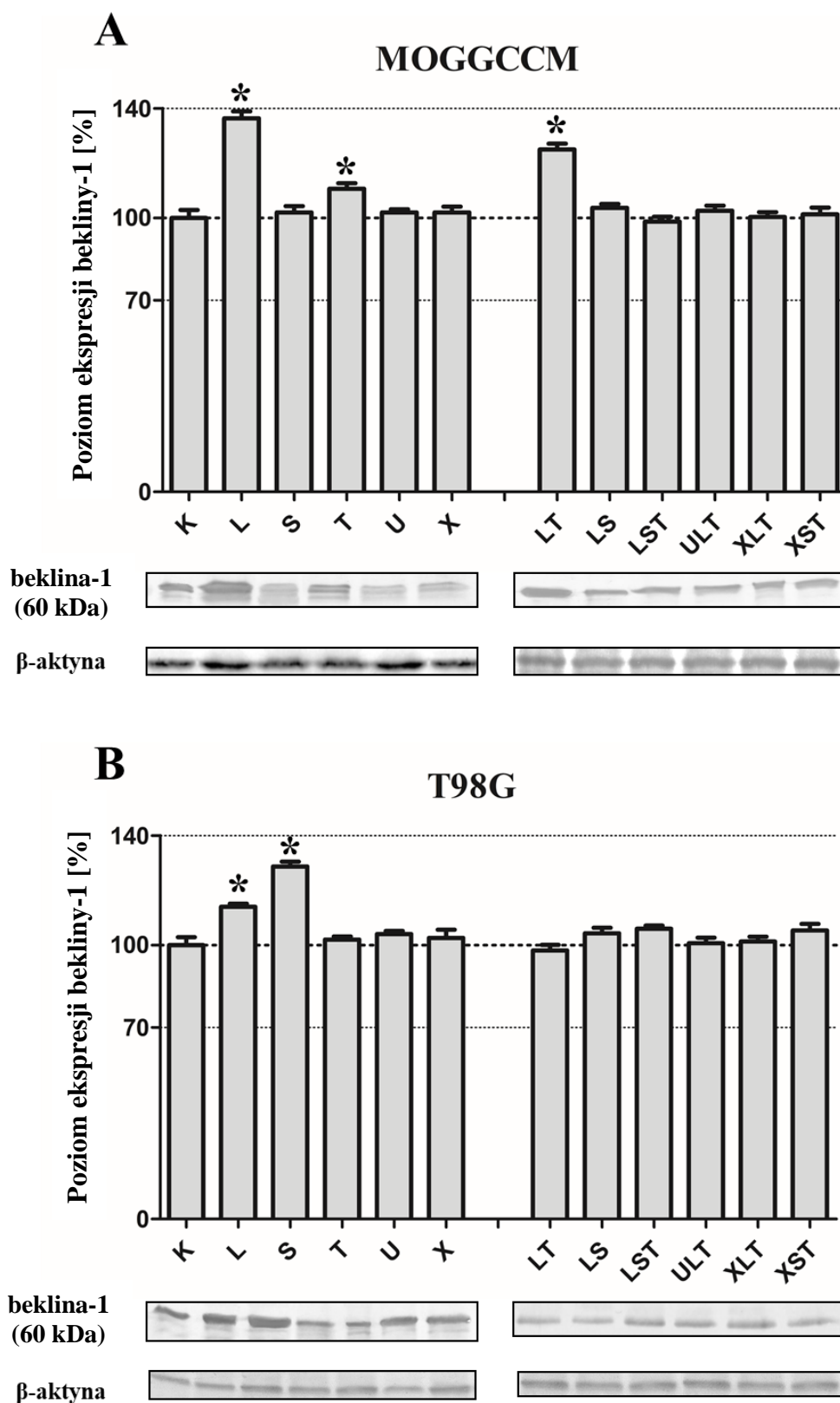


Figura 10. Wpływ 24 godzinnej, pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U), LOXO-101 (X) na poziom ekspresji bekliny-1 w komórkach MOGGCCM (A) oraz T98G (B). K – kontrola; (* wyniki istotnie statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

4.5. Zmiany organizacji wewnątrzkomórkowej gwiazdziaka anaplastycznego (MOGGCCM) oraz glejaka wielopostaciowego (T98G) pod wpływem LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101

Analiza mikroskopowa komórek gwiazdziaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego wybarwionych typowym dla autofagii fluorochromem – oranżem akrydyny – oprócz pęcherzyków autofagalnych, wykazała obecność niewybarwionych, wakuolarnych struktur na terenie cytoplazmy (Figura 12C). W przypadku linii MOGGCCM (Figura 11A) takie pęcherzyki pojawiły się po inkubacji z Temozolomidem (T) w pojedynczej aplikacji (>5%) oraz w połączeniu z inhibitorem kinazy PI3K (LT) (34%). Natomiast w linii T98G (Figura 11B) pęcherzykowate struktury obserwowano po zadziałaniu kombinacji LST (28%), zaś w pozostałych (S, U, X, ULT, XLT, XST) nie były obserwowane, albo były na niskim poziomie (L – 4%; T – 8%; LT – 5%; LS – 3%). W komórkach kontrolnych takich zmian morfologiczne nie zaobserwowano.

Wykorzystanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM, potwierdziło występowanie pęcherzykowych struktur na terenie cytoplazmy komórek MOGGCCM oraz T98G po wpływie opisanych wyżej związków. Dodatkowo towarzyszyło temu zagęszczenie włókien cytoszkieletu (Figura 11D). Mikroskopowa analiza komórek obu linii, wybarwionych mieszaniną fluorochromów: rodaminy i falloidyny, specyficznych dla agregatów komórkowych, wykazała, że opisane wyżej pęcherzyki intensywnie świeciły na czerwono (Figura 11E).

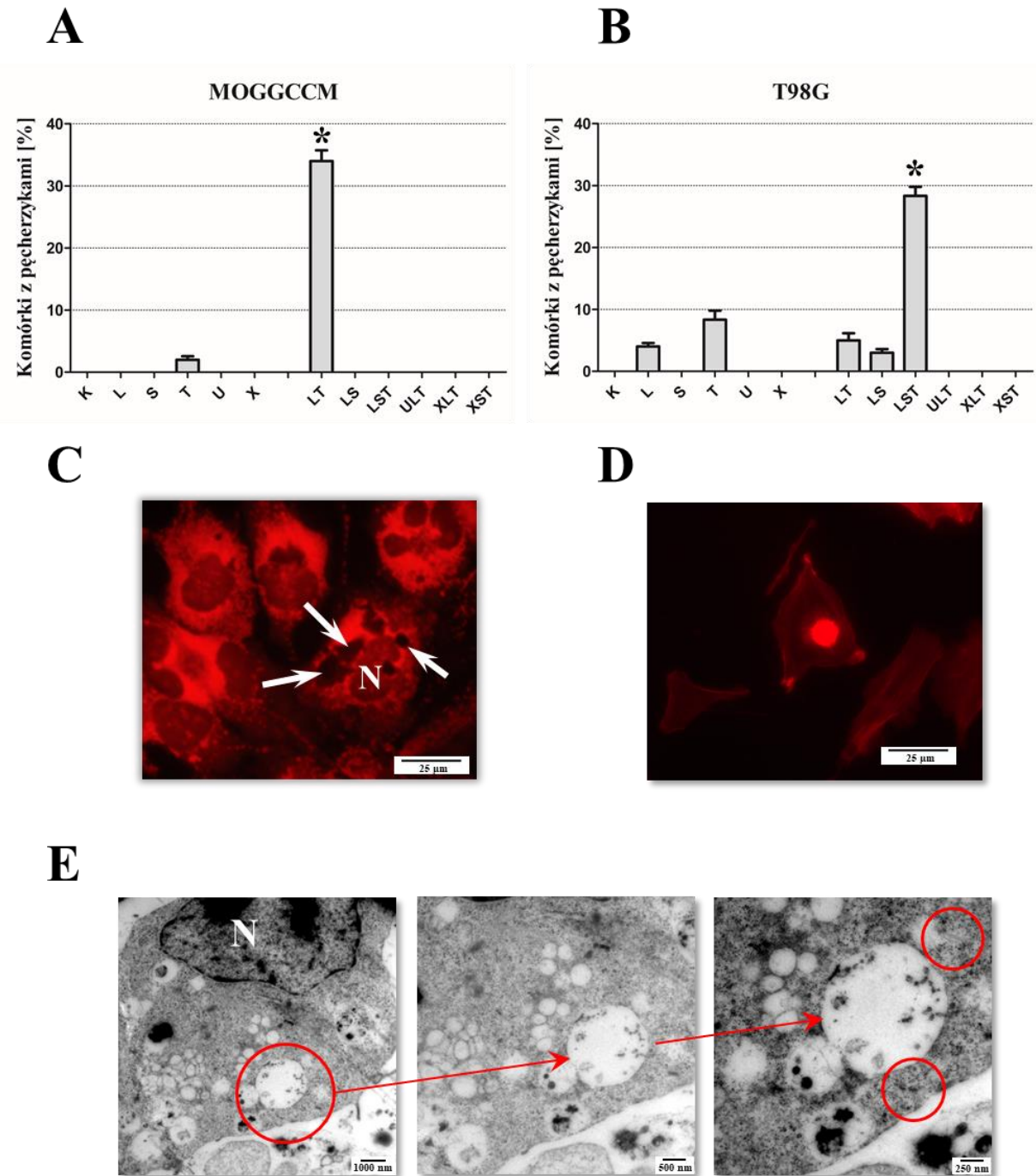


Figura 11. Wpływ aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na obecność pęcherzykowatych struktur w komórkach MOGGCCM (A) oraz T98G (B), K - kontrola. (* oznaczono wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta).

Komórki T98G inkubowane z LST, wybarwione oranżem akrydyny (C) z widocznymi pęcherzykami (białe strzałki) oraz wybarwione rodaminą i falloidyń (D) z widocznym świecącym pęcherzykiem, E: Komórki T98G inkubowane z LST (obraz z TEM) z widocznymi na terenie cytoplazmy strukturami pęcherzykowymi oraz zagęszczeniem włókien cytoszkieletu (zaznaczone na czerwono); N – jądro komórkowe

4.6. Analiza kompleksów białkowych beklina-1 i Bcl-2

Jak wiadomo z danych literaturowych [78, 87] pro-autofagalne białko beklina-1 oraz anty-apoptotyczne Bcl-2 tworzą kompleks, który stanowi swoisty przełącznik molekularny pomiędzy apoptozą a autofagią. Ponieważ obydwie typy śmierci były obserwowane po działaniu pojedynczej, jak i skojarzonej aplikacji badanych związków, postanowiono zbadać udział tych kompleksów w indukcji określonego rodzaju śmierci w komórkach MOGGCCM oraz T98G.

Technika immunoprecypitacji (Figura 12A) jednoznacznie wykazała, iż tworzenie kompleksów beklina-1:Bcl-2 było silnie skorelowane ze wzrostem poziomu apoptozy. Brak połączenia obydwu białek był charakterystyczny dla autofagii (Tabela 8). Wyniki z linii MOGGCCM (Tabela 8) wskazują, że po inkubacji z LY294002 (L) oraz jego kombinacji z Temozolomidem (LT) Bcl-2 oraz beklina-1 nie tworzyły kompleksu, a autofagia była dominującym typem śmierci. Z kolei gdy w populacji komórek obserwowano przede wszystkim apoptozę, dochodziło do połączenia się białek markerowych, co po inkubacji z LS, LST, ULT oraz XLT. Podobne zależności zaobserwowano w linii T98G. Po inkubacji komórek glejaka wielopostaciowego z sorafenibem (S) następował znaczący wzrost poziomu autofagii, czemu nie towarzyszyła obecność kompleksu białek beklina-1 i Bcl-2. Połączenie obu markerów następowało po aplikacji U-73122 (U) czy kombinacjach: LT, LS, XLT czy XST, gdzie dominującym typem śmierci była apoptoza.

Udział kompleksów białek Bcl-2 i beklina-1 w indukcji apoptozy oraz autofagii potwierdzono również metodą immunocytochemii (Materiały i Metody: 3.5.12.) (Figura 12B). Analiza mikroskopowa komórek MOGGCCM i T98G, wykazała, że białko Bcl-2 w stanie wolnym było zlokalizowane na terenie całej komórki, zaś beklina-1 głównie na terenie cytoplazmy, a jej zagęszczenie było obserwowane w pobliżu błony komórkowej. Z kolei w komórkach, w których autofagia była dominującym typem śmierci, beklina-1 lokalizowała się w obrębie pęcherzyków autofagalnych, zaś lokalizacja Bcl-2 pozostała bez zmian. W przypadku, gdy apoptoza była przeważająca oba białka lokalizowały się w pobliżu ciałek apoptotycznych.

Tabela 8: Wpływ inkubacji linii MOGGCCM oraz T98G z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na tworzenie kompleksu beklina-1:Bcl-2. K – kontrola; „+++” – kompleks, „+-”, – brak kompleksu. (* oznaczono wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta) ■ - apoptoza dominująca, ■ - autofagia dominująca

MOGGCCM				
	beklina-1	Bcl-2	apoptoza	autofagia
K	+	-	-	-
T	+	+	4%	12%
S	+	+	5%	1%
L	+	-	7%	45% *
U	+	-	9%	2%
X	+	-	12%	-
LT	+	-	9%	39% *
LS	+	+	19% *	-
LST	+	+	26% *	3%
ULT	+	+	34% *	-
XLT	+	+	33% *	-
XST	+	-	12%	-
T98G				
	beklina-1	Bcl-2	apoptoza	autofagia
K	+	-	-	-
T	+	+	11%	1%
S	+	-	5%	40% *
L	+	-	28%	20%
U	+	+	24% *	-
X	+	-	14%	-
LT	+	+	38% *	1,5%
LS	+	+	52% *	12%
LST	+	+	64% *	1%
ULT	+	-	4%	-
XLT	+	+	32% *	-
XST	+	+	52% *	-

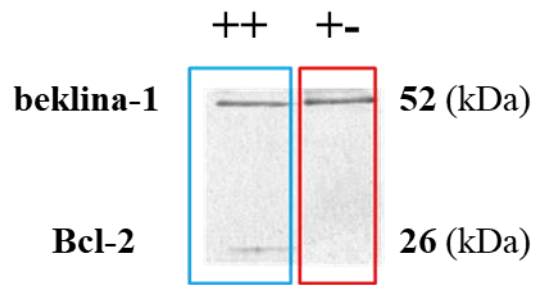
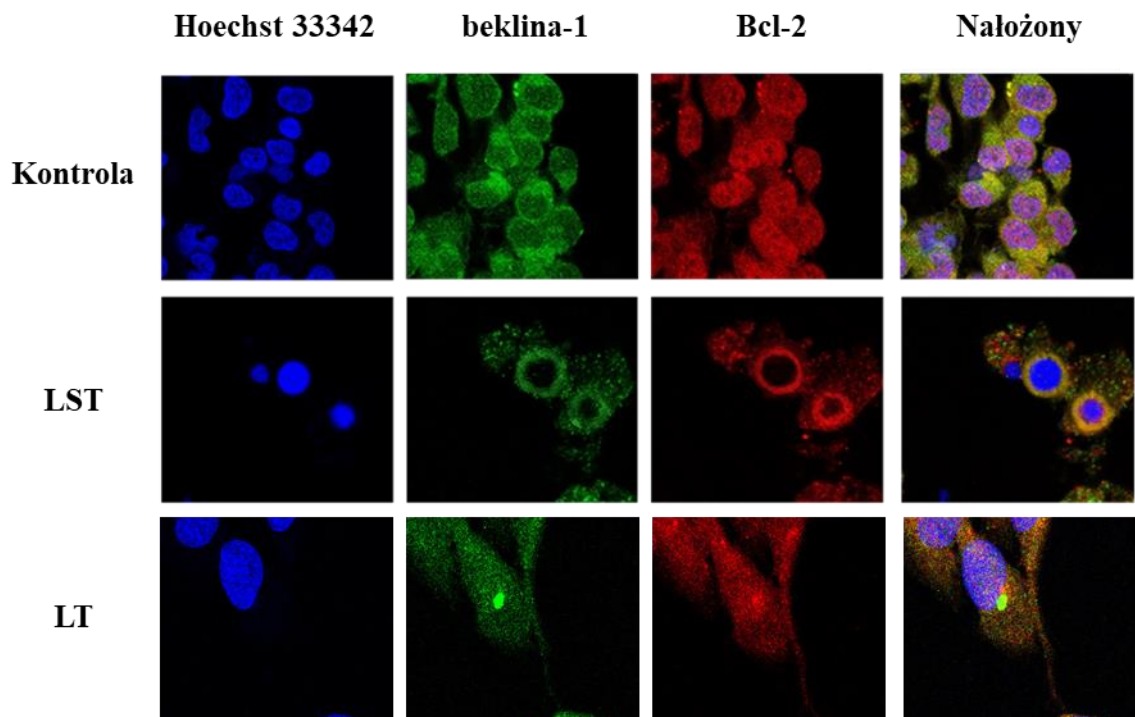
A**B**

Figura 12. Wpływ inkubacji linii MOGGCCM oraz T98G z LY294002 (**L**), sorafenibem (**S**), Temozolomidem (**T**), U-73122 (**U**) oraz LOXO-101 (**X**) na tworzenie kompleksu beklina-1:Bcl-2. **A:** przykładowe bloty obrazujące tworzenie się kompleksu. (++: kompleks, +-: brak kompleksu); **B:** technika immunocytochemii obrazująca zmiany w lokalizacji białek Bcl-2 i beklina-1 w komórkach MOGGCCM po aplikacji **LT** i **LST** (kolor niebieski: jądra komórkowe; kolor zielony: beklina-1; kolor czerwony Bcl-2; kolory żółto-pomarańczowy i fioletowy: obraz nałożony)

4.7. Wpływ LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 na poziom ekspresji oraz aktywność wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału przeżycia w liniach MOGGCCM oraz T98G

Wpływ aplikacji LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 na przekazywanie sygnału poprzez badane szlaki wewnątrzkomórkowe: PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK i PLC γ 1-PKC oceniono dwuetapowo. Najpierw metodą immunoblotingu określono poziom ekspresji receptora TrkB oraz pierwszych enzymów w kaskadach sygnałowych: PI3K, Raf oraz PLC γ 1. Drugi etap dotyczył oceny aktywności enzymów efektorowych odpowiednio: Akt/PKB, ERK, PKC.

4.7.1. Linia MOGGCCM

W linii gwiazdziaka anaplastycznego (Figura 13) każdy z badanych inhibitorów okazał się skutecznie obniżać ilość blokowanego przez siebie białka. W przypadku kinazy PI3K, w komórkach inkubowanych z LY294002 (L), zaobserwowano prawie 40% spadek ekspresji (Figura 13A). Dodatkowe włączenie Temozolomidu (LT) oraz sorafenibu (LS/LST) było również bardzo skuteczne. Zastosowanie sorafenibu w pojedynczej jak i skojarzonej z LY294002 i TMZ (LST) aplikacji spowodowało obniżenie poziomu kinazy Raf w komórkach MOGGCCM o około 20% (Figura 13B). Podobne obserwacje poczyniono z zastosowaniem kombinacji U-73122 z LY294002 oraz Temozolomidem (ULT) (Figura 14C). LOXO-101 (X) okazał się skutecznym inhibitorem receptora TrkB obniżając poziom jego ekspresji o 37% (Figura 14D). Co ciekawe inhibitory PI3K, Raf oraz PLC γ 1 nie wpływały na zmianę ekspresji TrkB, a jedynie po aplikacji XST oraz XLT zaobserwowano znaczny spadek w poziomie receptora (Figura 13D).

W celu potwierdzenia hamującego potencjału badanych inhibitorów, dokonano analizy aktywności białek uczestniczących w wewnątrzkomórkowych szlakach przekazywania sygnału przeżycia: Akt/PKB, ERK oraz PKC.

Zarówno w pojedynczej jak i równoczesnej aplikacji badanych związków w komórkach MOGGCCM zaobserwowano spadek aktywności kinazy Akt/PKB, przy czym w przypadku pojedynczych leków najlepiej działał LY294002 (L) zmniejszając aktywność białka o 34% (Figura 14A), zaś najlepsze z kombinacji okazało się LST, które hamowało aktywności tego białka (Figura 14A) o 53%. W przypadku ERK sorafenib (S) najskuteczniej hamował jego aktywność w 40% komórek MOGGCCM (Figura 14B) w pojedynczej

aplikacji. Z kolei najefektywniejszą kombinacją okazało się LST, które obniżało aktywność ERK w komórkach MOGGCCM o 49% (Figura 14B). Analiza aktywności kinazy PKC wykazała, że najskuteczniejszy w pojedynczej aplikacji okazał się inhibitor PLC γ 1 (U), który powodował obniżenie poziomu aktywności PKC w prawie 60% komórek MOGGCCM (Figura 14C), zaś w połączeniu z LY294002 oraz Temozolomidem (ULT), obniżał aktywność badanego białka aż o 63% (Figura 14C).

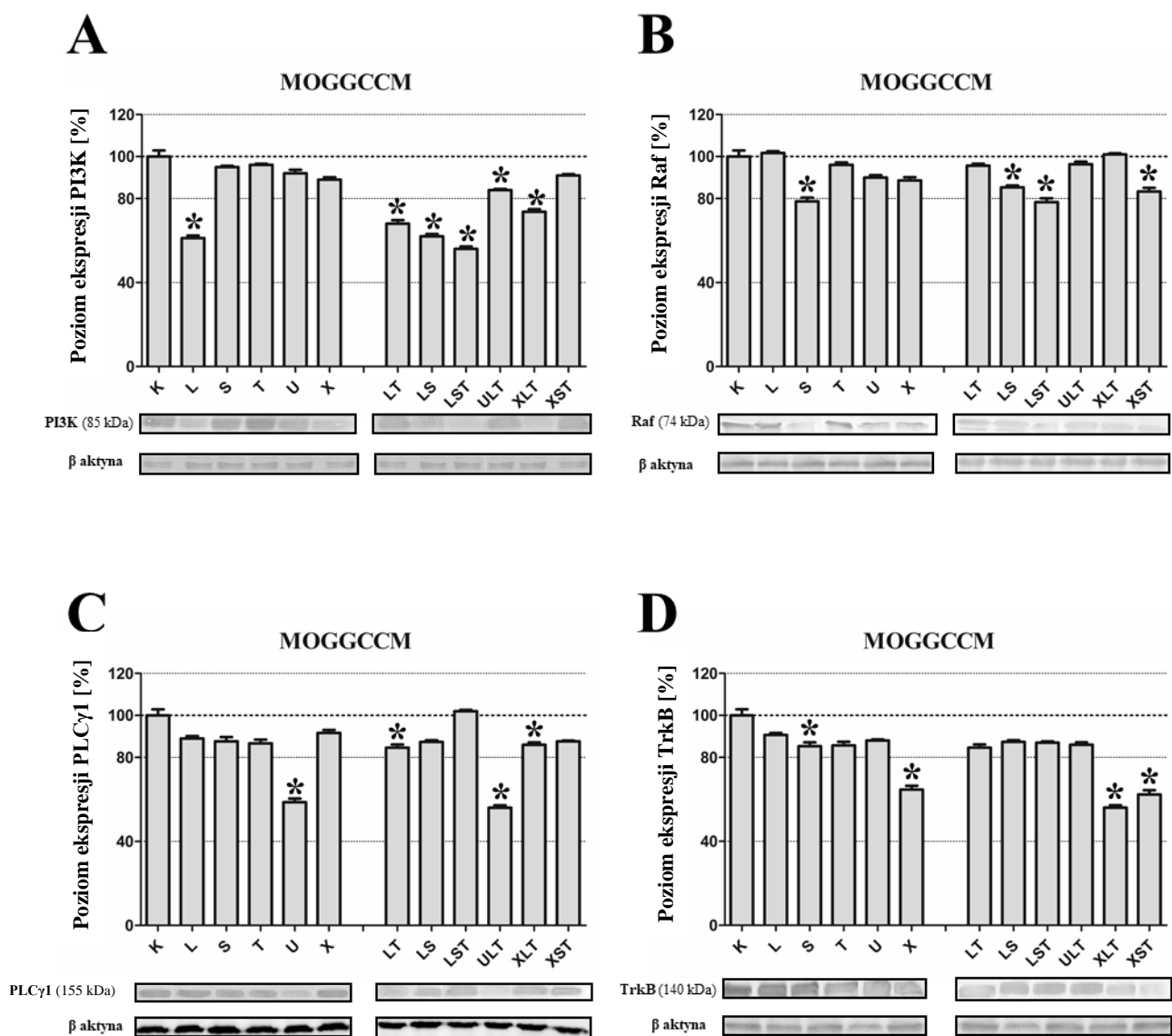


Figura 13. Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii MOGGCCM z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na poziom ekspresji: **A** – PI3K, **B** – Raf, **C** – PLCγ1, **D** – TrkB. **K** – kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

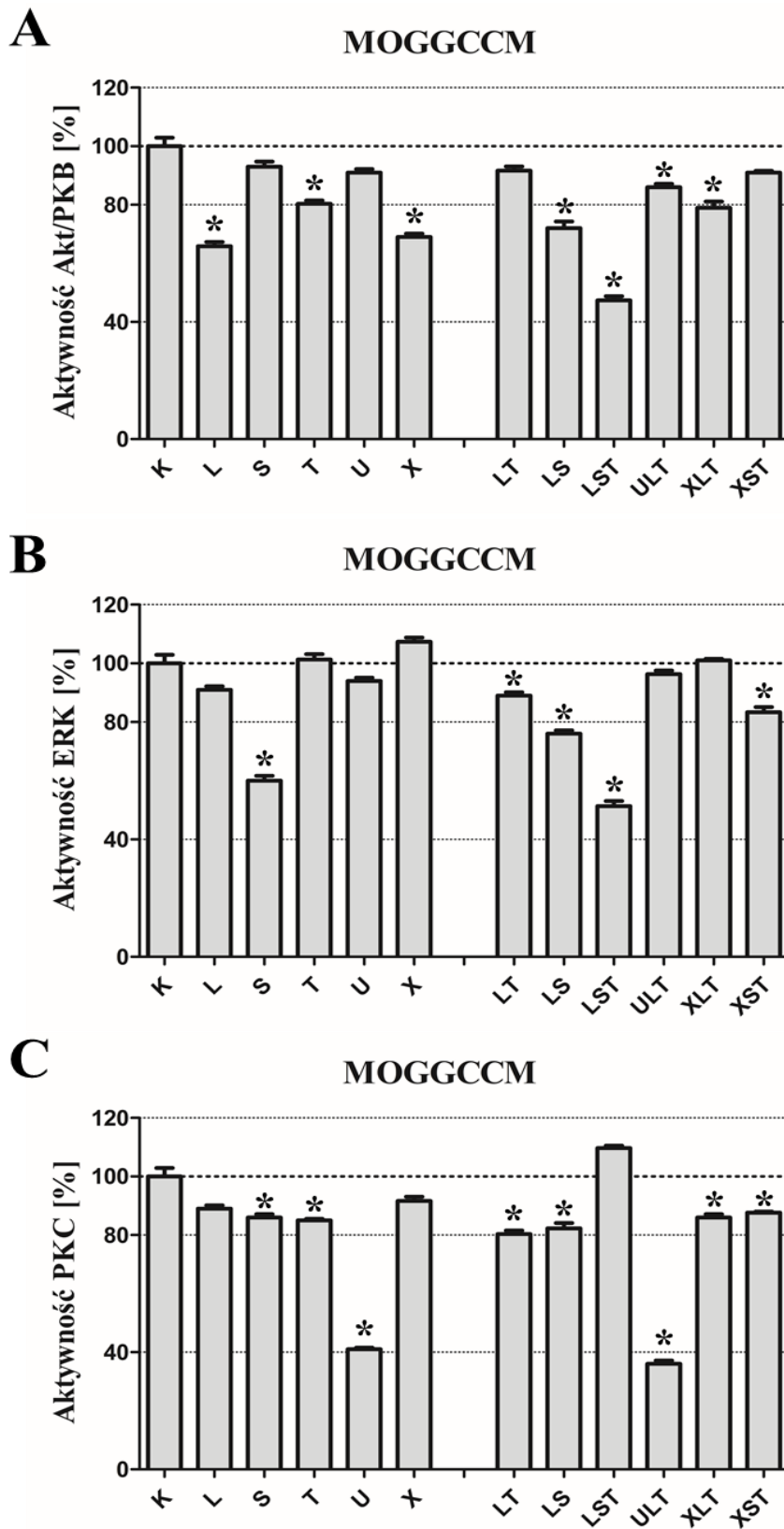


Figura 14. Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii MOGGCCM z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na poziom aktywności: **A** – Akt/PKB, **B** – ERK, **C** – PKC. K – kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

4.7.2. Linia T98G

W linii T98G podczas analizy membran po immunoblotingu zaobserwowano, że na ogół w większości przypadków kombinacje badanych związków okazały się skuteczniej obniżać ekspresję badanych kinaz (Figura 15.). Badanie ekspresji kinazy PI3K w komórkach glejaka wielopostaciowego jest tego bardzo dobrym przykładem. Pojedyncza aplikacja jedynie LY294002 (L) oraz LOXO-101 (X) spowodowała zmniejszenie poziomu ekspresji tej kinazy (Figura 15A). Co ciekawe L obniżało ją w 13% komórek i okazało się być mniej skuteczne niż aplikacja X, które spowodowało obniżenie ekspresji o 15%. Z kolei większość kombinacji skuteczniej niż pojedyncze aplikacje, hamowała ekspresję PI3K w komórkach glejaka wielopostaciowego, a największe, bo aż 35% zahamowanie było obserwowano po indukcji komórek z XLT (Figura 15A). W przypadku analizy poziomu ekspresji kinazy Raf, pojedyncza aplikacja sorafenibu (S) najskuteczniej obniżała jej poziom o 41% (Figura 15B). Z kolei wśród kombinacji, które okazały się skuteczniejsze w hamowaniu ekspresji Raf w komórkach T98G najefektywniejsze okazało się LST, które powodowało aż 65% zahamowanie (Figura 16B). Ciekawych obserwacji dokonano podczas analizy ekspresji PLC γ 1, gdzie w pojedynczym podawaniu leków najskuteczniejszy okazał się jej inhibitor (U), który obniżał jej poziom o 39% (Figura 15C), jednakże wysoką skutecznością wykazał się również sorafenib (S), a jego aplikacja w komórkach T98G spowodowała zahamowanie PLC γ 1 o 32%. W przypadku inkubacji komórek glejaka wielopostaciowego z kombinacjami, najlepszą okazała się ULT, która obniżała ekspresję badanego białka o 44% (Figura 15C). Ostatnia analiza dotyczyła ekspresji receptora TrkB. W linii T98G zastosowanie pojedynczej aplikacji LOXO-101 (X), najskuteczniej hamowało jego ekspresję o 39% (Figura 15D). Natomiast podczas inkubacji komórek z kombinacjami badanych leków, okazało się, że każda znacząco obniżała ekspresję badanego receptora, a najskuteczniejszą była XST, która hamowała ją w 44% populacji komórek (Figura 15D).

Podobnie jak w przypadku MOGGCCM, również w komórkach T98G dokonano analizy aktywności białek biorących udział w przekazywaniu sygnału przeżycia. Badanie aktywności Akt/PKB wykazało, że zarówno pojedyncza jak i równoczesna aplikacja badanych leków jest skuteczna w hamowaniu tego białka (Figura 16A). Największe zahamowanie (45%) w pojedynczych substancjach, zaobserwowano po inkubacji komórek z Temozolomidem (T). Z kolei inkubacja komórek glejaka wielopostaciowego z kombinacjami badanych leków pokazała, że były one skuteczniejsze niż większość pojedynczych aplikacji, a najefektywniejsze były LT oraz XLT, które hamowały aktywność Akt/PKB kolejno o 58% i 63% (Figura 16B). Drugim z badanych białek był ERK, którego aktywność przeanalizowana po inkubacji komórek T98G z pojedynczymi lekami była intensywnie hamowana w każdym z przypadków, a najsilniejszy efekt zhamowania (57%) zaobserwowano po zastosowaniu inhibitora Raf (S). Inkubacja komórek z kombinacjami leków okazała się być równie skuteczna. Największe zahamowanie aktywności ERK obserwowane było po aplikacji LST (65%). Również połączenie LY294002 i sorafenibu (LT) z podobną skutecznością (61%) hamowało aktywność badanego białka (Figura 16B). W ostatnim etapie, w linii T98G, dokonano analizy zmian w aktywności kinazy PKC. Pojedyncza aplikacja inhibitora U-73122 (U) skutecznie hamowała aktywność białka o 34%, ale znaczny spadek zaobserwowano również po aplikacji sorafenibu (S) (22%) oraz Temozolomidu (T) (18%) (Figura 16C). Z kolei w komórkach inkubowanych z kombinacjami badanych leków największe zahamowanie aktywności PKC zaobserwowano w komórkach po inkubacji z ULT (46%) (Figura 16C).

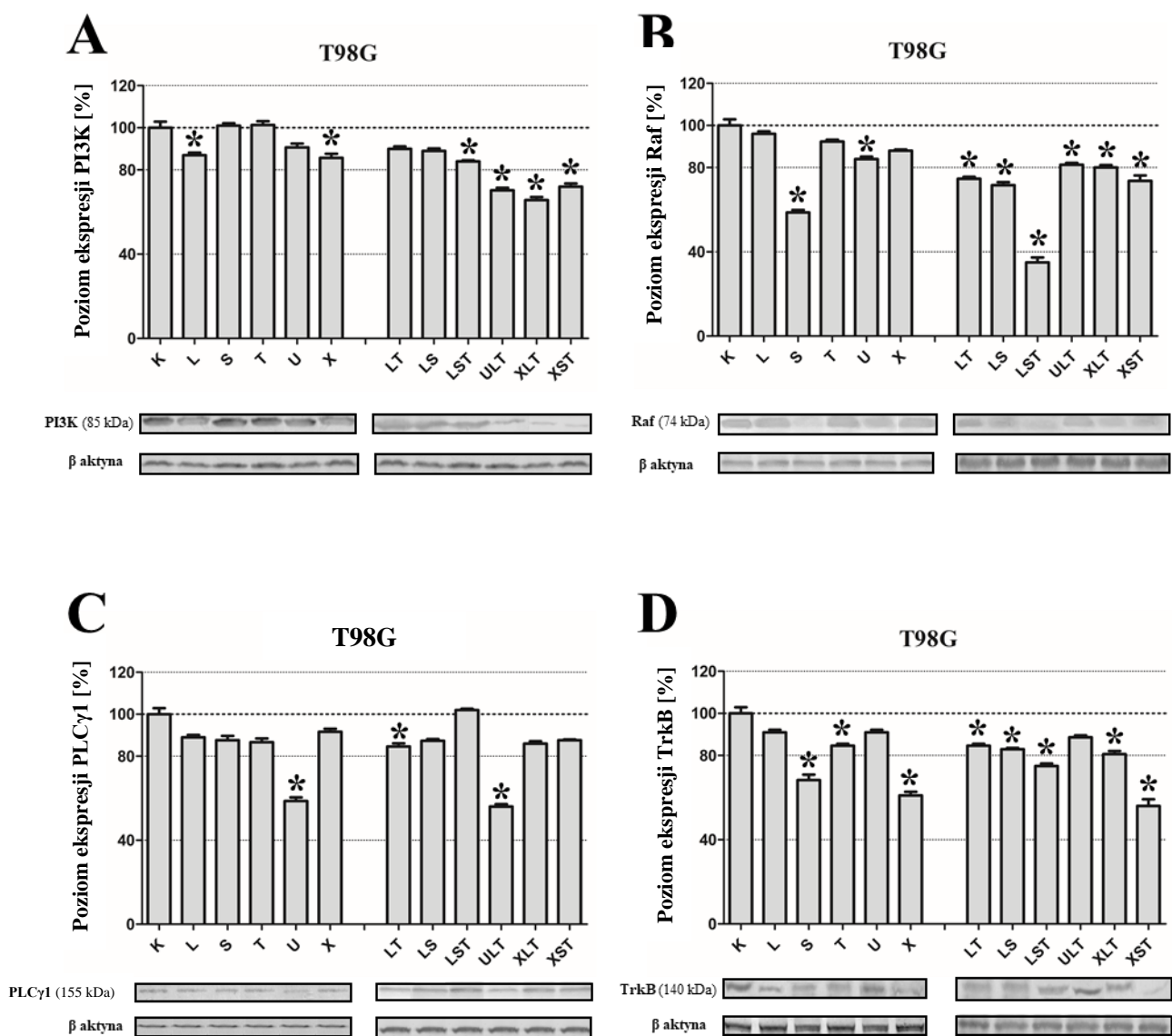


Figura 15. Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii T98G z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na poziom ekspresji: **A** – PI3K, **B** – Raf, **C** – PLCγ1, **D** – TrkB. **K** – kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

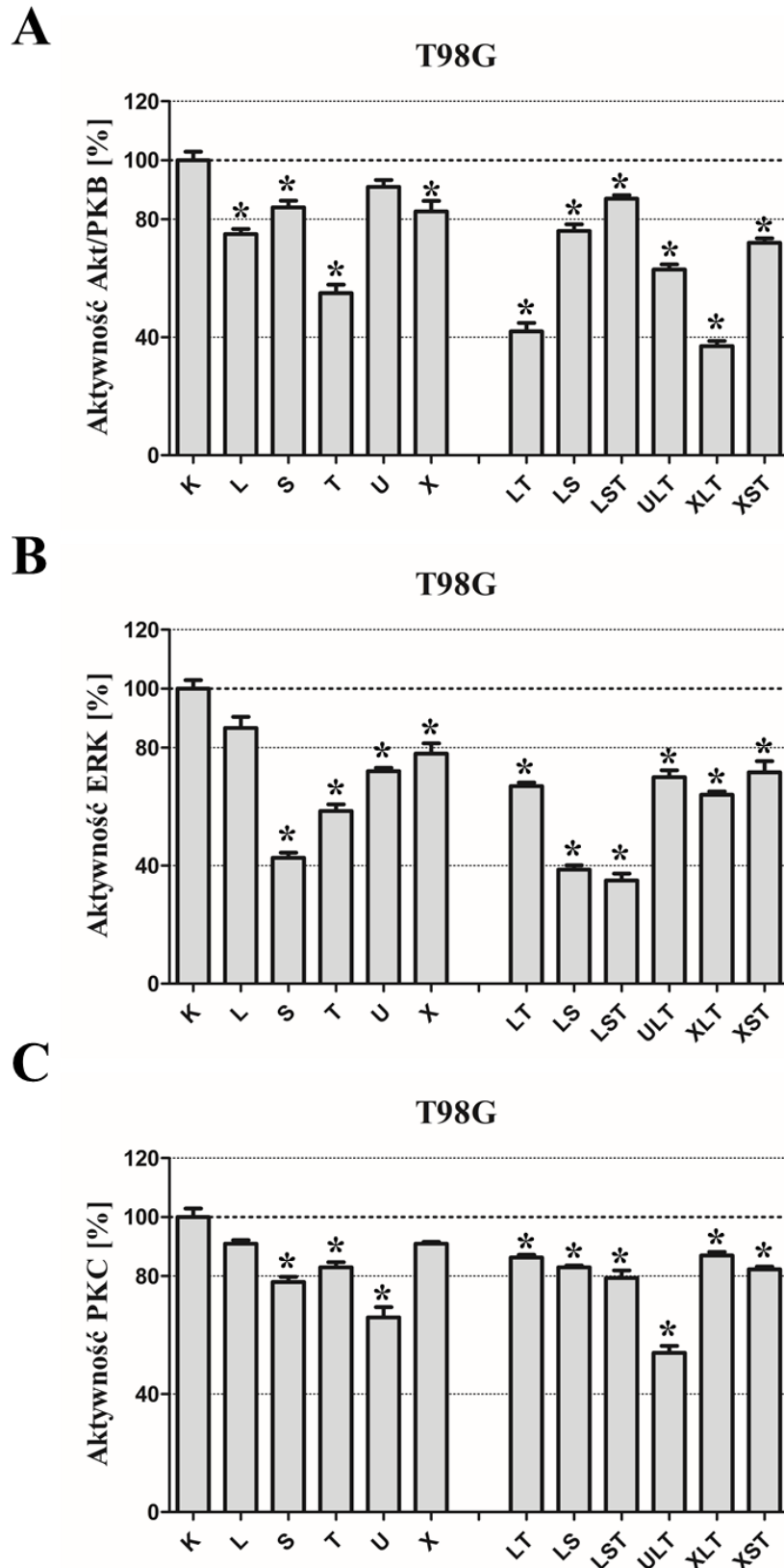


Figura 16. Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii T98G z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na poziom aktywności: **A** – Akt/PKB, **B** – ERK, **C** – PKC. **K** – kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

4.8. Blokowanie ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1 i TrkB oraz potwierdzenie skuteczności działania inhibitorów tych szlaków

W celu otrzymania bezpośredniego dowodu na zaangażowanie wewnątrzkomórkowych szlaków regulowanych receptorem TrkB w przekazywaniu sygnału przeżycia, zablokowano ekspresję pierwszych białek sygnałowych poszczególnych kaskad wykorzystując specyficzne siRNA (Materiały i Metody: **3.5.10.**).

Metoda immunoblotingu wykazała, że wykorzystane w badaniu siRNA specyficznie blokowały poziom ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1 oraz TrkB zarówno w linii MOGGCCM jak i T98G (Figura 17I). Zmniejszeniu ilości badanych białek towarzyszył wzrost ilości martwych komórek. W przypadku linii MOGGCCM zablokowanie ekspresji PI3K najskuteczniej inicjowało zaprogramowaną śmierć, a autofagia była dominująca (prawie 60%, Figura 17IIA). Co ciekawe, znaczny poziom autofagii zaobserwowano również po zastosowaniu kombinacji ST (ponad 20%), jednak nie była ona dominującym typem śmierci. Apoptoza natomiast była obserwowana w stransfekowanych komórkach gwiazdziaka anaplastycznego poddanych inkubacji z sorafenibem (S) (96%). Aplikacja Temozolomidu również inicjowała apoptozę (ponad 80%). Zablokowanie ekspresji Raf w linii MOGGCCM nie miała wpływu na indukcję śmierci komórek. Jednakże dodatkowa aplikacja LY294002 spowodowała wzrost apoptozy do ponad 60%, a w połączeniu z TMZ do ponad 90% (Figura 17IIB). Zablokowanie ekspresji PLC γ 1 czy receptora TrkB okazało się być mniej skuteczne w indukcji zaprogramowanej śmierci, choć apoptoza była w obu przypadkach dominująca (Figura 17IIC,D). Na uwagę zasługuje również fakt, że ani w komórkach po transfekcji z siRNA, ani po dodatkowej inkubacji z badanymi związkami nie obserwowano komórek nekrotycznych.

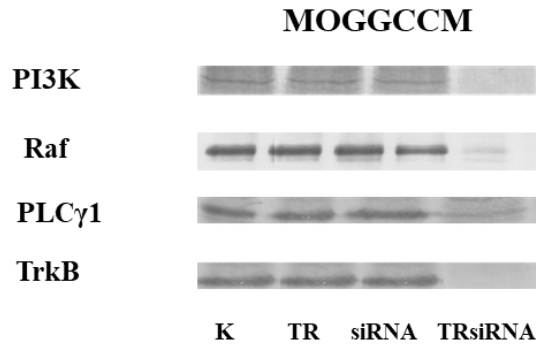
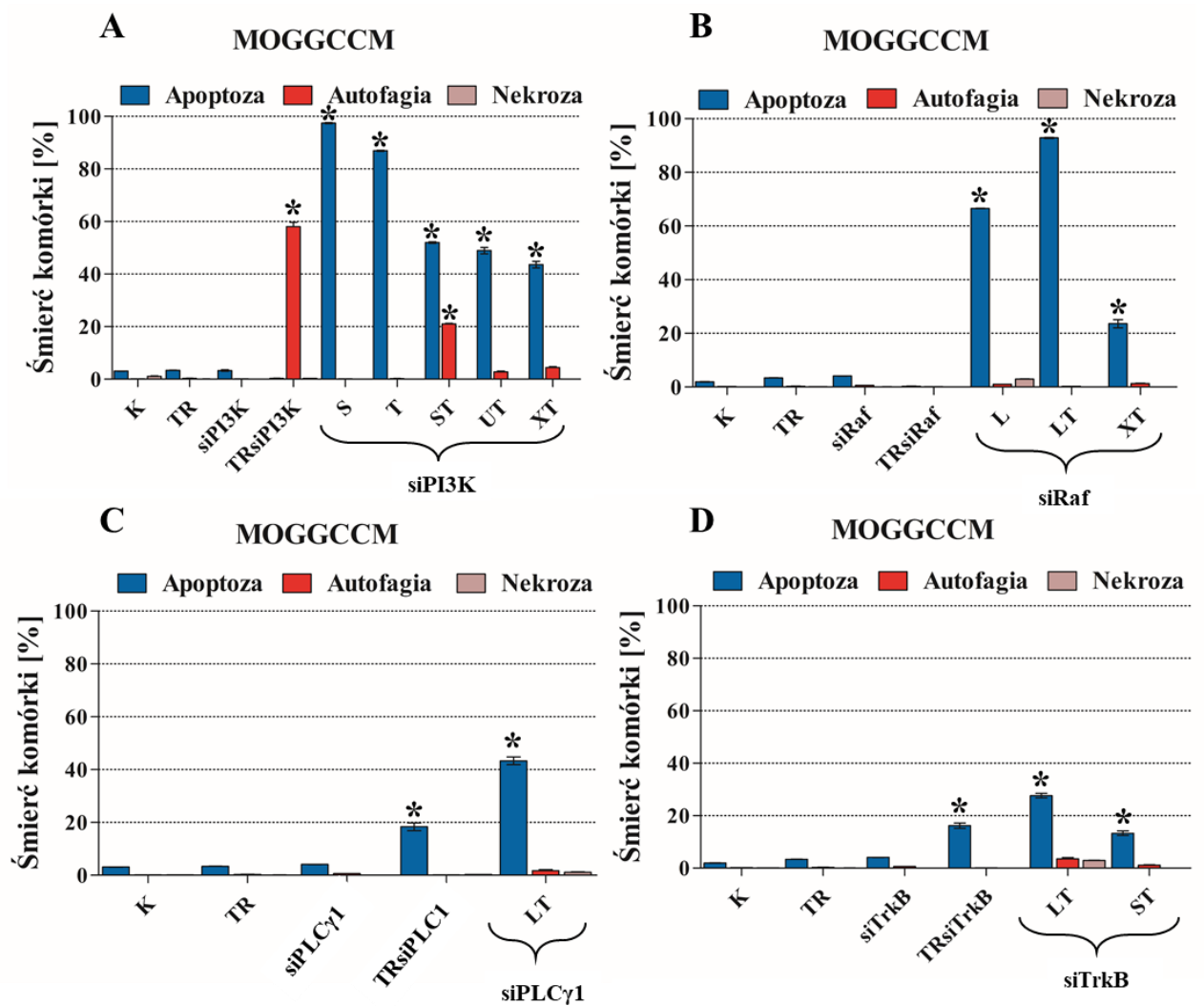
I**II**

Figura 17. I: Wpływ odczynników do siRNA na poziom ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1 oraz TrkB w komórkach MOGGCCM: **TR** – Transfection Reagent **II:** Wpływ blokowania ekspresji PI3K (**A**), Raf (**B**), PLC γ 1 (**C**) oraz TrkB (**D**) specyficznymi siRNA na poziom apoptozy, autofagii i nekrozy pod wpływem LY294002 (**L**), sorafenibu (**S**), Temozolomidu (**T**), U-73122 (**U**) oraz LOXO-101 (**X**) w linii MOGGCCM. **K** – kontrola; (* oznaczono wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

Komórki glejaka wielopostaciowego (Figura 18) okazały się bardziej odporne na indukcję zaprogramowanej śmierci po zablokowaniu ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1 oraz TrkB przy użyciu siRNA w porównaniu z komórkami gwiazdziaka anaplastycznego (Figura 18). Najwięcej martwych na drodze zaprogramowanej śmierci komórek obserwowano po zablokowaniu Raf, co wywołało autofagię w 40% populacji. Dodatkowa inkubacja LOXO-101 w połączeniu z TMZ (XT) spowodowała obniżenie poziomu autofagii na korzyść apoptozy (60%) (Figura 19IIB). Zablokowanie ekspresji PI3K zainicjowało apoptozę w 30% komórek czemu towarzyszyła autofagia (23%) (Figura 18IIA). Prawie 30% poziom apoptozy był obserwowany również po inkubacji z Temozolomidem. Blokowanie PLC γ 1 oraz TrkB przy użyciu siRNA okazało się być najmniej skuteczne w indukcji PCD (Figura 18IIC,D). W komórkach glejaka wielopostaciowego z zablokowanym receptorem TrkB inkubacja z LS oraz w przypadku aplikacji ST zaobserwowano znaczny wzrost ilości komórek apoptotycznych o odpowiednio 25 oraz 31%. Komórki nekrotyczne nie były obserwowane.

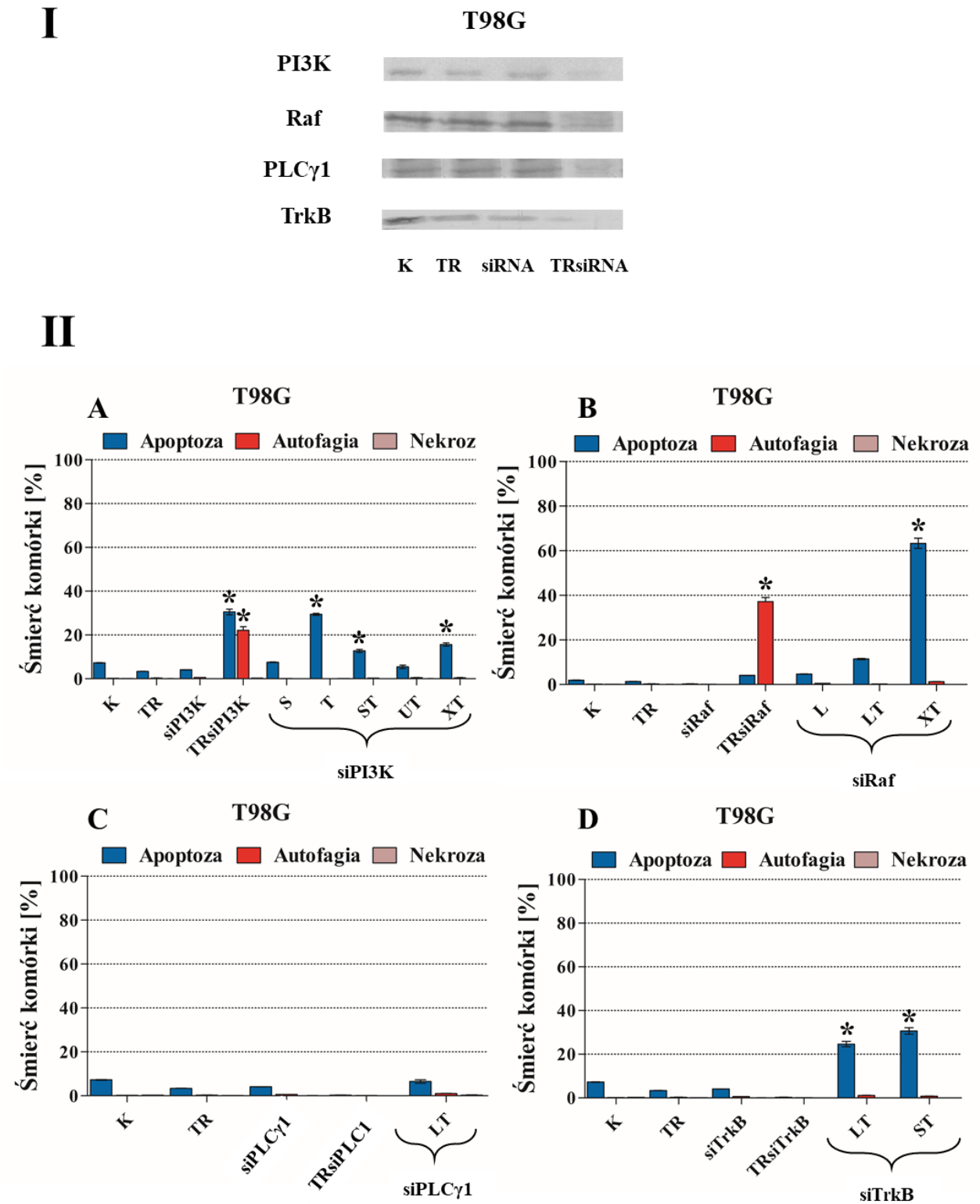


Figura 18. I: Wpływ odczynników do siRNA na poziom ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1 oraz TrkB w komórkach T98G: **TR** – Transfection Reagent **II:** Wpływ blokowania ekspresji PI3K (**A**), Raf (**B**), PLC γ 1 (**C**) oraz TrkB (**D**) specyficznymi siRNA na poziom apoptozy, autofagii i nekrozy pod wpływem LY294002 (**L**), sorafenibu (**S**), Temozolomidu (**T**), U-73122 (**U**) oraz LOXO-101 (**X**) w linii T98G. **K** – kontrola; (* oznaczono wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

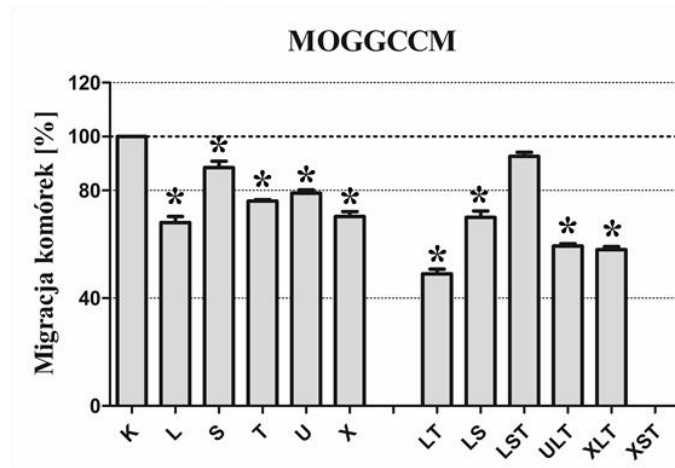
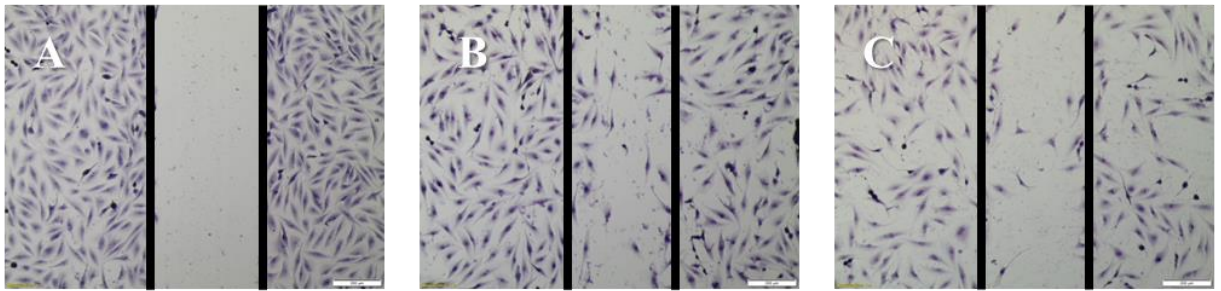
4.9. Ocena wpływu badanych inhibitorów na potencjał migracyjny komórek gwiazdki anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego

W celu potwierdzenia przeciwnowotworowych właściwości LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 w aspekcie analizy zahamowania migracji komórek MOGGCCM i T98G, wykonano Test Rysy (ang. Wound Assay).

Analiza mikroskopowa komórek gwiazdki anaplastycznego wykazała istotne ograniczenie migracji komórek pod wpływem badanych związków, zarówno w pojedynczej jak i równoczesnej aplikacji. Jedynie kombinacja LST nie miała istotnego wpływu na mobilność komórek MOGGCCM (Figura 19I). Najskuteczniejszy spośród pojedynczych inhibitorów okazał się być LY294002, który hamował migrację 32% komórek. W przypadku równoczesnej aplikacji, kombinacja inhibitora PI3K z Temozolomidem (LT), hamowała mobilność aż 50% komórek gwiazdki anaplastycznego.

Komórki glejaka wielopostaciowego okazały się być bardziej wrażliwe na przeciwmigracyjne działanie badanych inhibitorów. Prawie 50% zahamowanie mobilności komórek było obserwowane po zastosowaniu U-73122 (U). Z kolei kombinacja LST ograniczała migrację ponad 60% populacji komórek (Figura 19II). Wyjątkiem było jednoczesne zastosowanie U-73122, LY294002 i TMZ (ULT), po którym nie zaobserwowano ograniczenia w migracji komórek.

I



II

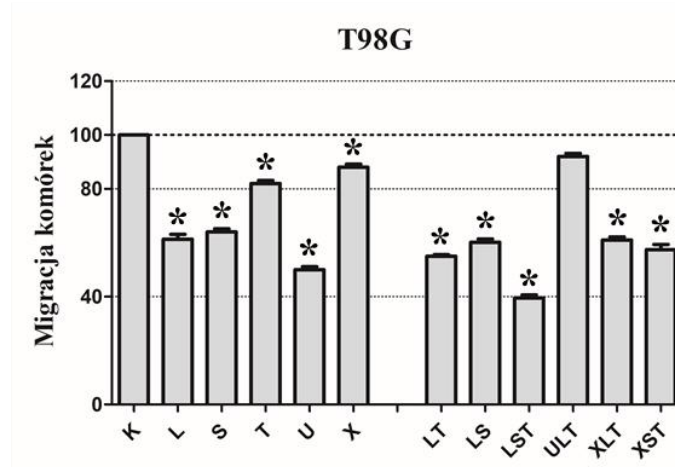
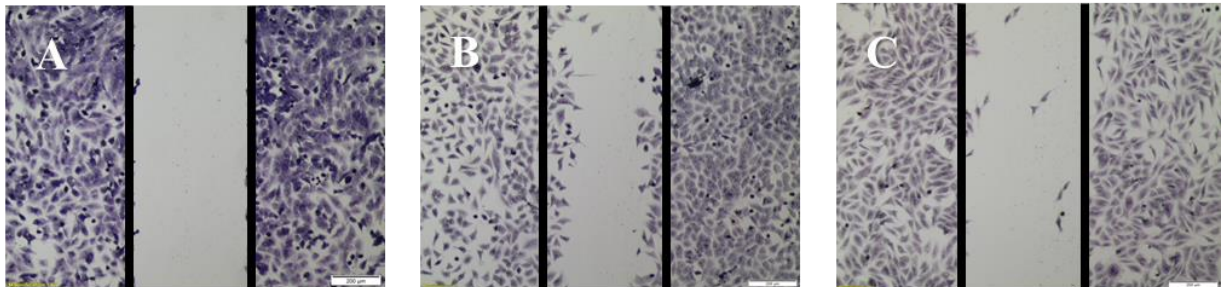


Figura 19. Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii T98G z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na mobilność komórek MOGGCCM (I) oraz T98G (II). K – kontrola; (* wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta)

5. Dyskusja

Gwiaździak anaplastyczny (AA, III^o) oraz glejak wielopostaciowy (GBM, IV^o) należą do najbardziej złośliwych nowotworów centralnego układu nerwowego u człowieka. Prognozy dla pacjentów ze zdiagnozowanym AA lub GBM są bardzo złe. Średni czas przeżycia nieleczonych glejaków oscyluje w przedziale od 9 miesięcy do 5 lat w zależności od stopnia złośliwości, a także od wieku pacjenta. Złośliwy charakter i wysoka śmiertelność tych nowotworów oraz ich oporność na standardowe leczenie przypisuje się nadekspresji wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału przeżycia: PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK, PLC γ 1-PKC, które są regulowane przez receptor TrkB [11, 21, 88].

Dlatego też, celem niniejszej pracy było zbadanie czy zastosowanie inhibitorów wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału przeżycia, regulowanych przez receptor TrkB, będą skutecznie eliminować komórki glejaków na drodze zaprogramowanej śmierci. Dodatkowo podjęto próbę połączenia badanych związków ze stosowanym w leczeniu Temozolomidem i oceny zwiększonej skuteczności przeciwnowotworowego potencjału terapii skojarzonej. Temozolomid jest lekiem alkilującym, którego mechanizm działania opiera się na metylacji guaniny w pozycji O⁶, co powoduje powstawanie o-6-guaniny i jej nieprawidłowe sparowanie z tyminą, co w konsekwencji wprowadza komórki na drogę zaprogramowanej śmierci [31, 51]. Przeprowadzona analiza mikroskopowa linii gwiaździaka anaplastycznego wykazała, że Temozolomid eliminował komórki AA przede wszystkim na drodze autofagii (ponad 10%), co było skorelowane ze wzrostem ekspresji markera tego procesu – bekliny-1. Z kolei w linii glejaka wielopostaciowego, TMZ indukował głównie apoptozę (powyżej 10%) i wiązało się to ze wzrostem ekspresji i aktywności kaspazy 3. Zaobserwowano przy tym brak zwiększenia aktywności kaspazy 8, oraz kaspazy 9, co może sugerować, że mechanizm inicjacji apoptozy związanej z aktywnością kaspazy 3 w komórkach T98G inkubowanych z Temozolomidem może przebiegać z udziałem innych enzymów (np. kaspazy 2 lub 10) [89].

Obiecującym związkiem w eliminowaniu komórek glejaków na drodze zaprogramowanej śmierci może okazać się LY294002, inhibitor kinazy PI3K oraz szlaku PI3K-Akt/PKB-mTOR. Związek ten zmniejszał proliferację i inwazyjność komórek gwiaździaka anaplastycznego (linii U251), czy glejaka wielopostaciowego (linii LN229 oraz U87), co w konsekwencji prowadziło do indukcji apoptozy [13, 37, 40]. Podobne

obserwacje poczyniono w przypadku komórek raka nosogardzieli (linii CNE-2Z) oraz komórek nowotworowych kostniako-mięsaka (linii MG-63), gdzie zastosowanie LY294002 powodowało zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 oraz indukcję apoptozy inicjowanej zarówno przez szlak wewnątrz- i zewnątrzpochodny [59, 90]. Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie, wykazały, że prawie 45% komórek gwiaździstego anaplastycznego (MOGGCCM) zostało wyeliminowanych na drodze autofagii po inkubacji z LY294002. Z kolei w komórkach glejaka wielopostaciowego (T98G) inhibitor PI3K inicjował przede wszystkim apoptozę (prawie 30%). Indukcja autofagii w komórkach AA była skorelowana ze wzrostem ekspresji markera tego procesu - bekliny-1. W przypadku apoptozy w komórkach GBM obserwowano znaczny wzrost ilości oraz aktywności kaspazy 3, a także kaspazy 9, co może sugerować, że ten rodzaj zaprogramowanej śmierci przebiegał szlakiem wewnątrzpochodnym [71]. W komórkach AA, w których dominowała autofagia, aktywność kaspaz nie była znacząca. LY294002 obniżał również ekspresję kinazy PI3K w obu liniach komórkowych oraz aktywność kinazy Akt, co potwierdziło, że LY294002 jest skutecznym inhibitorem szlaku PI3K-Akt / PKB-mTOR oraz, że szlak ten bierze udział w oporności komórek glejaka na indukcję zaprogramowanej śmierci.

Skutecznym inhibitorem szlaku Ras-Raf-MEK-ERK okazał się być sorafenib. Związek ten obniżał poziom ekspresji kinazy Raf oraz aktywność ERK w badanych liniach komórkowych (MOGGCCM i T98G). Towarzyszył temu wzrost indukcji autofagii w linii T98G skorelowany ze wzrostem ekspresji bekliny-1 oraz apoptozy w komórkach MOGGCCM, inicjowanej szlakiem wewnątrzpochodnym z aktywacją kaspazy 3 oraz 9. Pro-apoptotyczny oraz pro-autofagalny potencjał sorafenibu został potwierdzony przez innych naukowców. Wykazano bowiem, że inhibitor ten inicjował autofagię w szczykowych wątrobowych komórkach gwiaździstych (linia LX2) [46], co było związane ze wzrostem ekspresji białek LC3 i bekliny-1. Ponadto aplikacja inhibitora Raf w liniach raka wątrobowokomórkowego (PLC5, Sk-Hep1, HepG2 oraz Hep3B) spowodowała indukcję autofagii, co było związane ze wzrostem aktywności bekliny-1 [91–93]. Z kolei pro-apoptotyczny charakter sorafenibu opisany w badaniach na wykorzystujących linie raka wątrobowokomórkowego Hepa1-6 [60]. Wykazały one, że sorafenib eliminował komórki na drodze apoptozy co wiązało się z zablokowaniem cyklu komórkowego w fazie G1/S i aktywności białek z rodziny Bcl-2. Jednakże dokładny mechanizm selektywności sorafenibu w inicjowaniu określonego rodzaju śmierci nie jest jeszcze dokładnie poznany.

Przeciwnowotworowy potencjał wykazuje również inhibitor fosfolipazy $C\gamma 1$ – U-73122. W doświadczeniach przeprowadzonych na białaczkowych komórkach odpornościowych (limfocyty T - TIB-152) oraz linii raka piersi (MDA-MB-231) wykazano, że aplikacja U-73122 hamowała aktywność enzymu, prowadząc do apoptotycznej śmierci komórek [94–96]. Antyproliferacyjny oraz pro-apoptotyczny potencjał U-73122 wykazano również w komórkach raka żołądka (linii SGC-7901 oraz BGC-823), kostniakomięsaka (MG-63) oraz chłoniaka (SU-DHL-4 oraz SU-DHL-6), w których po inkubacji z tym inhibitorem zaobserwowano znaczne zahamowanie proliferacji względem komórek kontrolnych [48, 62, 97]. Badania niniejszej pracy wykazały, że U-73122 z powodzeniem eliminował komórki T98G na drodze apoptozy, co wiązało się ze wzrostem ekspresji i aktywności kaspazy 3 oraz 9, co sugeruje, że proces przebiegał szlakiem wewnątrzpochodnym. Apoptoza była również dominującym typem śmierci w linii MOGGCCM, przy czym jej wrażliwość na indukcję PCD była mniejsza w porównaniu do linii T98G. Inhibitor $PLC\gamma 1$ obniżał poziom ekspresji fosfolipazy oraz aktywność kinazy PKC, co potwierdziło skuteczność U-73122 w blokowaniu przekazywaniu sygnału szlakiem $PLC\gamma 1$ -PKC.

Wzrost aktywności receptora TrkB jest domeną wielu chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworowych, w tym nowotworów mózgu [32, 33, 98, 99]. Jest to związane z nadmiernym przekazywaniem sygnału poprzez szlaki podległe regulacji TrkB. Jednym z inhibitorów tego receptora jest LOXO-101 [55–57, 100]. Znajduje się on w chwili obecnej w fazie badań klinicznych jako chemioterapeutyk w leczeniu guzów litych, w tym guzów mózgu. Trwają też intensywne badania nad poznaniem molekularnych mechanizmów eliminacji komórek nowotworowych na drodze zaprogramowanej śmierci. Jak wynika z badań przeprowadzonych na liniach MOGGCCM i T98G, LOXO-101 skutecznie hamował ekspresję receptora TrkB i indukował apoptozę, jednakże na poziomie nie przekraczającym 15%. Proces ten w obu liniach był skorelowany ze wzrostem ekspresji oraz aktywności kaspazy 3, czemu towarzyszył wzrost aktywności kaspazy 8, co sugeruje, że apoptoza została zainicjowana szlakiem zewnątrzpochodnym.

Jak wiadomo stosowanie pojedynczych związków w terapii przeciwnowotworowej jest niejednokrotnie mało efektywne. W oporności chorób nowotworowych, a szczególnie złośliwych glejaków bierze udział wiele mechanizmów molekularnych, których pojedyncze zablokowanie może nie być skuteczne. Dlatego też, poszukuje się nowoczesnych terapii, które łączą ze sobą dwa lub więcej związków o różnych mechanizmach działania w tzw. terapii skojarzonej (kombinowanej) [38, 58, 76]. Terapia skojarzona ma na celu spotęgowanie efektu terapeutycznego i przeciwnowotworowego wybranych związków. Bardzo często takie strategie lecznicze projektuje się w oparciu o tzw. molekularne cele [91, 101–103]. Ideę terapii celowanej stanowi zastosowanie inhibitorów białek przekąźnikowych, biorących udział w transmisji sygnału w komórce, związanych ściśle z progresją glejaków. Dotychczasowe badania wykazały, że jednoczesne zastosowanie kilku inhibitorów, hamujących przekazywanie sygnałów od błony komórkowej do jądra przez kaskady kinaz jest efektywniejsze od działania pojedynczych leków. Kombinacja taka wpływa na spadek przeżywalności, proliferacji, migracji i metabolizmu komórek nowotworowych, a dodatkowo prowadzi również do zmniejszenia lekooporności na stosowane chemioterapeutyki. Zaburzenia przekazywania sygnału w komórkach nowotworowych wiąże się z unikaniem zaprogramowanej śmierci i przeżywaniem [104]. Dlatego też poszukuje się substancji, które w terapii skojarzonej skutecznie eliminowałyby komórki glejaków na drodze apoptozy lub autofagii. Wcześniejsze badania prowadzone na liniach MOGGCCM i T98G potwierdzają tę tezę. Wykazały bowiem, że połączenie kwercetyny z sorafenibem lub z Temozolomidem skuteczniej eliminowało komórki gwiaździaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego na drodze PCD niż pojedyncza aplikacja. Dlatego też w swoich badaniach po raz pierwszy podjąłem próbę przebadania wpływu jednoczesnej aplikacji LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 na indukcję zaprogramowanej śmierci w komórkach MOGGCCM i T98G. Analiza mikroskopowa komórek wybarwionych specyficznymi fluorochromami wykazała, iż zarówno w linii gwiaździaka anaplastycznego jak i glejaka wielopostaciowego apoptoza była dominującym typem śmierci, zaś poziom autofagii był znacznie mniejszy. Wyjątek stanowiło, połączenie LY294002 oraz Temozolomidu (LT) w komórkach AA gdzie, poza wysokim poziomem apoptozy (ok. 25%) na jeszcze wyższym (40%) poziomie obserwowano autofagię. Autofagia została szeroko scharakteryzowana jako mechanizm przeżycia komórek nowotworowych, będąc jedną z przyczyn ich oporności na stosowaną w

leczeniu chemioterapię. Jest to spowodowane tym, iż proces ten nie zawsze prowadzi jednoznacznie do śmierci komórki, a może stanowić mechanizm naprawczy w odpowiedzi na niekorzystne warunki życiowe. Dlatego też, opracowanie terapii skutecznie eliminujących komórki nowotworowe na drodze apoptozy, a nie autofagii, wydaje się być pożądane. Najskuteczniejsze w indukcji tego typu śmierci w komórkach gwiazdziaaka anaplastycznego okazało się połączenie inhibitorów PLC γ 1, PI3K oraz Temozolomidu (ULT), które eliminowało około 35% inkubowanych komórek. Było to ściśle związane ze wzrostem ekspresji i aktywności kaspazy 3 oraz 9 co świadczy o inicjacji wewnątrzpochodnego szlaku apoptotycznego. Z kolei w linii glejaka wielopostaciowego najskuteczniejszą kombinacją indukującą apoptozę okazało się połączenie inhibitorów PI3K, Raf oraz Temozolomidu (LST), które eliminowało ponad 60% komórek. Towarzyszył temu wzrost ekspresji i aktywności kaspazy 3 oraz 9, co świadczy o wewnątrzpochodnym przebiegu procesu apoptozy. Wyniki te wskazują na to, że równoczesna aplikacja badanych związków okazała się skuteczniej eliminować komórki obu linii na drodze apoptozy.

Analiza mikroskopowa komórek MOGGCCM oraz T98G poddanych działaniu badanych substancji i wybarwionych oranżem akrydyny, umożliwiła obserwację bardzo ciekawych pęcherzykowych struktur na terenie cytoplazmy. Pojawiły się one po aplikacji jedynie wybranych związków. W przypadku linii MOGGCCM obserwowano je po zastosowaniu kombinacji LY294002 z TMZ (LT, 34%), zaś w linii T98G po dodatkowej aplikacji z sorafenibem (LST, prawie 30 %). Obecność owalnych, wakuolarnych struktur na terenie cytoplazmy potwierdziła metoda TEM. Analiza zawartości pęcherzyków wykluczyła autofagię, ze względu na brak całych lub fragmentarycznych organelli komórkowych. Na uwagę zwracało zagęszczenie włókien cytoszkieletu wokół pęcherzyków. Z danych literaturowych wynika, że opisane struktury pojawiają się w komórkach narażonych na m.in. stres retikularny (ang. ER stress), związany z siateczką śródplazmatyczną [39, 73, 105, 106]. Retikulum endoplazmatyczne jest bowiem ważnym organellum, w którym dochodzi do syntezy oraz poprawnego fałdowania białek. Pod wpływem działania czynników stresowych (m.in. chemioterapii) dochodzi do zaburzenia procesów translacyjnych, w wyniku których dochodzi do nagromadzenia i akumulacji nieprawidłowo zwiniętych lub niesfałdowanych białek, które tworzą nierozpuszczalne agregaty, a w proces ten zaangażowane są sieci mikrotubul [39, 107, 108]. Barwienie rodaminą i falloidyną potwierdziło obecność w pęcherzykach agregatów białkowych. Uzyskane wyniki sugerują, że w komórkach MOGGCCM inkubowanych z kombinacją LY294002 i TMZ (LT) oraz w T98G z LST

doszło do indukcji stresu retikularnego, który spowodował agregację białek w cytoplazmie, co mogło być przyczyną zwiększonej wrażliwości komórek gwiazdziaka anaplastycznego na indukcję autofagii, zaś glejaka wielopostaciowego na inicjację apoptozy.

Jak wiadomo z literatury apoptoza oraz autofagia są dynamicznymi, przełączającymi się procesami. Ich molekularnym przełącznikiem może być kompleks dwóch białek: anty-apoptotycznego Bcl-2 oraz pro-autofagalnego beklina-1 [78]. Białko beklina-1 jest kluczowym markerem autofagii [75], który łącząc się z białkiem Bcl-2 powoduje zahamowanie powstawania struktury przedautofagosomalnej, a tym samym hamuje autofagię, na korzyść apoptozy. Dlatego, gdy białka te są w stanie wolnym, apoptoza jest hamowana przez Bcl-2, a proces autofagii może przebiegać bez przeszkód. Ponieważ w komórkach MOGGCCM i T98G obserwowano zarówno apoptozę jak i autofagię pod wpływem badanych związków, postanowiono ocenić czy tworzenie kompleksów Bcl-2:beklina-1 reguluje rodzaj inicjowanej zaprogramowanej śmierci. Jak wykazała metoda immunoprecypitacji, apoptozie towarzyszyła obecność kompleksów Bcl-2 i beklina-1, zaś gdy autofagia była dominującym typem śmierci, kompleksu nie obserwowano. W komórkach kontrolnych obydwa białka odnajdywane były na terenie cytoplazmy, przy czym beklina-1 bliżej błony komórkowej. W komórkach autofagalnych markerowe białko obserwowano w pobliżu autofagosomów, zaś Bcl-2 nie zmieniało swojej lokalizacji. Z kolei gdy apoptoza była dominującym typem śmierci, kompleks beklina-1:Bcl-2 lokalizował się w okolicy ciałek apoptotycznych.

Ponieważ obserwacje mikroskopowe komórek MOGGCCM i T98G wykazały, że zastosowanie kombinacji badanych związków było skuteczniejsze w eliminacji komórek glejaków na drodze indukcji PCD niż pojedyncza aplikacja postanowiono zbadać ich skuteczność w hamowaniu szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK oraz PLC γ 1-PKC na poziomie molekularnym. Podczas badania ekspresji metodą immunoblotingu oraz aktywności metodą ELISA w linii MOGGCCM zaobserwowano, że zastosowanie kombinacji LY294002 oraz sorafenibu w połączeniu z TMZ (LST) spowodowało największy spadek w poziomie ekspresji kinaz PI3K i Raf oraz aktywności Akt/PKB i ERK, co dowodzi, że szlaki PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz Ras-Raf-MEK-ERK odpowiadają za oporność komórek gwiazdziaka anaplastycznego na działanie Temozolomidu, a ich zablokowanie skutecznie eliminuje komórki AA na drodze apoptozy. Podobne obserwacje zanotowano w linii T98G, gdzie podobnie jak w linii MOGGCCM zastosowanie kombinacji LST spowodowało znaczny spadek ekspresji kinazy Raf, czemu

towarzyszyło zahamowanie aktywności ERK. Może to więc sugerować, że szlaki Ras-Raf-MEK-ERK i PI3K-Akt/PKB-mTOR są również zaangażowane w oporności glejaka wielopostaciowego na indukcję apoptozy poprzez zastosowanie TMZ.

Jak wiadomo z danych literaturowych, naturalne oraz syntetyczne inhibitory enzymów wchodzących w skład wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów nie zawsze działają specyficznie i mogą mieć szersze spektrum działania. Mogą one blokować ekspresję i aktywność innych białek lub szlaków, a nawet oddziaływać między sobą, powodując wzmocnienie zahamowania sygnału biegnącego jedną kaskadą sygnałową [29, 48, 87, 94]. Dlatego też w celu uzyskania bezpośredniego dowodu na specyficzność działania badanych związków, a tym samym na zaangażowanie receptora TrkB i podległych mu szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK oraz PLC γ 1-PKC w oporność komórek glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci zablokowano ekspresję PI3K, Raf, PLC γ 1 oraz TrkB przy użyciu specyficznych siRNA. Badania w obu liniach komórkowych, wykazały, że zastosowane siRNA skutecznie hamowały poziom ekspresji badanych białek, co wiązało się z indukcją apoptozy. W komórkach gwiazdziaka anaplastycznego najwięcej komórek apoptotycznych obserwowano po zablokowaniu szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR i Ras-Raf-MEK-ERK, a w komórkach T98G zablokowanie PI3K-Akt/PKB-mTOR. Ciekawą obserwacją był również fakt, iż komórki glejaka wielopostaciowego były zdecydowanie bardziej odporne na indukcję zaprogramowanej śmierci po aplikacji siRNA, w porównaniu do stransfekowanych komórek MOGGCCM jak i niestranfekowanych komórek T98G inkubowanych z badanymi inhibitorami. Może to sugerować, że zastosowanie inhibitorów wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału przeżycia w komórkach T98G powoduje dodatkowe interakcje z innymi białkami lub szlakami, co bardziej uwrażliwia je na indukcję zaprogramowanej śmierci.

Jak wiadomo literatury, badane szlaki PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK oraz PLC γ 1-PKC biorą udział nie tylko w proliferacji, czy przeżywaniu komórek, wpływając tym samym na oporność komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci, ale są również odpowiedzialne za regulację zdolności motorycznych komórek. Może to w znacznym stopniu wpływać na progresję chorób nowotworowych poprzez zwiększenie potencjału migracyjnego, a co za tym idzie na przerzutowanie. Dlatego też, postanowiono zbadać właściwości przeciwnowotworowe LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 w aplikacji pojedynczej i skojarzonej w aspekcie potencjału migracyjnego, stosując Test Rysy. W linii gwiazdziaka

anaplastycznego najskuteczniejszy okazał się LY294002 (L) w pojedynczej aplikacji oraz w połączeniu z Temozolomidem (LT). Może to świadczyć o silnym zaangażowaniu szlaku PI3K-Akt/PKB-mTOR w zwiększaniu potencjału migracyjnego gwiazdziaka anaplastycznego. Znajduje to potwierdzenie w badaniach eksperymentalnych i klinicznych, z których jasno wynika, że szlak ten zaangażowany jest w nabywanie oporności na apoptozę przez migrujące komórki glejaka. W przypadku linii T98G największe zahamowanie migracji w pojedynczej aplikacji obserwowano po zastosowaniu inhibitora PLC γ 1 - U-73122 (U). Co ciekawe, połączenie go z innymi badanymi związkami nie było tak efektywne. W przypadku inkubacji skojarzonej migracja komórek T98G była najsilniej hamowana pod wpływem połączenia LY294002 z sorafenibem oraz Temozolomidem (LST), co może świadczyć o tym, że w komórkach glejaka wielopostaciowego kluczową rolę w migracji odgrywają szlaki PI3K-Akt/PKB-mTOR i Ras-Raf-MEK-ERK. W obu liniach komórkowych kombinacje badanych związków okazały się być bardziej efektywne w obniżeniu potencjału migracyjnego w porównaniu do pojedynczej aplikacji.

Biorąc pod uwagę wszystkie uzyskane wyniki, można stwierdzić, że skojarzona aplikacja inhibitorów PI3K, Raf, PLC γ 1 oraz TrkB w połączeniu z Temozolomidem może mieć praktyczne znaczenie i stanowić podstawę do dalszych badań nad ich wykorzystaniem w uwrażliwianiu komórek gwiazdziaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego na indukcję apoptozy.

6. Podsumowanie

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem komórek gwiazdziaka anaplastycznego (MOGGCCM) oraz glejaka wielopostaciowego (T98G) wykazały, że LY294002, sorafenib, Temozolomid, U-73122 oraz LOXO-101 skutecznie eliminowały komórki nowotworowe na drodze zaprogramowanej śmierci. Pojedyncza aplikacja badanych związków skutecznie inicjowała autofagię, co wiązało się ze wzrostem ekspresji bekliny-1 oraz apoptozę, czemu towarzyszył wzrost ekspresji i aktywności kaspaz 3, 8 i 9. Obserwowano również blokowanie transdukcji sygnałów poprzez receptor TrkB oraz regulowane przez niego szlaki: PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK oraz PLC γ 1-PKC. Analiza molekularna wykazała, iż zablokowanie szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz PLC γ 1-PKC w połączeniu z Temozolomidem skutecznie eliminowało komórki linii MOGGCCM na drodze apoptozy. Z kolei w komórkach T98G kluczową rolę w inicjacji tego typu śmierci odegrało przerwanie transmisji sygnałów przekazywanych poprzez szlaki PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz Ras-Raf-MEK-ERK. Równoczesna aplikacja badanych substancji okazała się być dużo bardziej efektywna w eliminowaniu komórek MOGGCCM i T98G na drodze zaprogramowanej śmierci, a dominującym typem śmierci była apoptoza. Ponadto skojarzone działanie inhibitorów PI3K i Raf w połączeniu z Temozolomidem skutecznie hamowało zarówno migrację komórek gwiazdziaka anaplastycznego jak i glejaka wielopostaciowego. Dlatego też, dalsze badania nad wykorzystaniem LY294002, sorafenibu, U-73122 oraz LOXO-101 w połączeniu z Temozolomidem może stanowić podstawę do dalszych badań nad ich wykorzystaniem w uwrażliwianiu komórek gwiazdziaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego na indukcję apoptozy.

7. Wnioski

1. Wrażliwość komórek glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci zależała od linii komórkowej oraz rodzaju zastosowanego związku.
2. LY294002, sorafenib, Temozolomid, U-73122 oraz LOXO-101 skutecznie indukowały zaprogramowaną śmierć w komórkach gwiazdziaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego, a równoczesna inkubacja okazała się być skuteczniejsza niż pojedyncza aplikacja.
3. Skojarzone działanie LY294002, sorafenibu, U-73122, LOXO-101 oraz TMZ inicjowało głównie apoptozę, która przebiegała szlakiem wewnątrzpochodnym. Nie zaobserwowano efektu nekrotycznego.
4. Zablockowanie szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz PLC γ 1-PKC w połączeniu z Temozolomidem skutecznie eliminowało komórki linii MOGGCCM na drodze apoptozy. Z kolei w komórkach T98G kluczową rolę w tym procesie odegrało przerwanie transdukcji sygnałów przekazywanych poprzez szlaki PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz Ras-Raf-MEK-ERK.
5. Kompleks bcl-2:beklina 1 odgrywa istotną rolę w przekierowywaniu sygnałów pomiędzy apoptozą i autofagią w komórkach glejaków, co związane jest ze zmianą lokalizacji tych białek w obrębie komórki.
6. Inhibitory szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz Ras-Raf-MEK-ERK (LY294002 i sorafenib) w połączeniu z cytostatykiem (Temozolomidem) skutecznie hamują migrację komórek glejaków III^o i IV^o.

8. Literatura

1. Kass J. H. (1992) The human nervous system. Academic Press, San Diego, USA
2. Gonzalez-Perez O., Lopez-Virgen V., Quiñones-Hinojosa A. (2015). Astrocytes: Everything but the glue. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 2(2): 115–117.
3. Allen N. J., Barres B. A. (2009). Glia — more than just brain glue. *Nature*, 457(7230): 675–677.
4. Urbanska K., Sokolowska J., Szmidt M., Sysa P. (2014). Glioblastoma multiforme - An overview. *Wspolczesna Onkologia*, 18(5): 307–312.
5. Mountz J., Ahmed R., Oborski M., Lieberman F., Hwang M. (2014). Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Management and Research*, 6(1): 149.
6. de Martel C., Georges D., Bray F., Ferlay J., Clifford G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2): 180–190.
7. Khazaei Z., Sohrabivafa M., Momenabadi V., Moayed L., Goodarzi E. (2019). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide prostate cancers and their relationship with the human development index. *Advances in Human Biology*, 9(3): 245.
8. Ostrom Q. T., Coleman W., Huang W., Rubin J. B., Lathia J. D., Berens M. E., Speyer G., Liao P., Wrensch M. R., Eckel-Passow J. E., Armstrong G., Rice, T., Wiencke J. K., Mccoy L. S., Hansen H. M., Amos C. I., Bernstein J. L., Claus E. B., Houlston R. S., Il'yasova D., Jenkins R. B., Johansen C., Lachance D. H., Lai R. K., Merrell R. T., Olson S. H., Sadetzki S., Schildkraut J. M., Shete S., Andersson U., Rajaraman P., Chanock S. J., Linet M. S., Wang Z., Yeager M., Melin B., Bondy M. L., Barnholtz-Sloan J. S. (2019). Sex-specific gene and pathway modeling of inherited glioma risk. *Neuro-Oncology*, 21(1): 71–82.

9. Reuss D. E., Mamatjan Y., Schrimpf D., Capper D., Hovestadt V., Kratz, A., Sahm F., Koelsche C., Korshunov A., Olar A., Hartmann C., Reijneveld J. C., Wesseling P., Unterberg A., Platten M., Wick W., Herold-Mende C., Aldape K., von Deimling A. (2015). IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathologica*, 129(6): 867–873.
10. Pisapia D. J. (2017). The updated world health organization glioma classification: Cellular and molecular origins of adult infiltrating gliomas. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(12): 1633–1645.
11. Back M., Jayamanne D. T., Brazier D., Newey A., Bailey D., Schembri G. P., Hsiao E., Khasraw M., Wong M., Kastelan M., Guo L., Clarke S., Wheeler H. (2019). Influence of molecular classification in anaplastic glioma for determining outcome and future approach to management. *Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology*, 63(2): 272–280.
12. Wesseling P., Capper D. (2018). WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44(2): 139–150.
13. Han Y., Wu Z., Wu T., Huang Y., Cheng Z., Li X., Sun T., Xie X., Zhou Y., Du Z. (2016). Tumor-suppressive function of long noncoding RNA MALAT1 in glioma cells by downregulation of MMP2 and inactivation of ERK/MAPK signaling. *Cell Death & Disease*, 7(3): 2123–2123.
14. Grimm S. A., Chamberlain M. C. (2016). CNS Oncology Anaplastic astrocytoma. *CNS Oncology*, 5: 145–157.
15. Criteria P., Implications P. (1975). Glioblastoma Multiforme and Anaplastic Astrocytoma.
16. Zhang L., Poh C. F., Williams M., Laronde D. M., Berean K., Gardner P. J., Jiang H., Wu L., Lee J. J., Rosin M. P. (2012). Loss of heterozygosity (LOH) profiles-validated risk predictors for progression to oral cancer. *Cancer Prevention Research*, 5(9): 1081–1089.

17. Goel S., Decristo M. J., Watt A. C., Brinjones H., Sceneay J., Li B. B., Khan N., Ubellacker J. M., Xie S., Metzger-Filho O., Hoog J., Ellis M. J., Ma C. X., Ramm S., Krop I. E., Winer E. P., Roberts T. M., Kim H. J., McAllister S. S., Zhao, J. J. (2017). CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*, 548(7668): 471–475.
18. Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1): 1–18.
19. Molinaro A. M., Taylor J. W., Wiencke J. K., Wrensch M. R. (2019). Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology*, 15(7): 405–417.
20. Brito C., Azevedo A., Esteves S., Marques A. R., Martins C., Costa I., Mafra M., Bravo Marques J. M., Roque L., Pojo M. (2019). Clinical insights gained by refining the 2016 WHO classification of diffuse gliomas with: EGFR amplification, TERT mutations, PTEN deletion and MGMT methylation. *BMC Cancer*, 19(1): 1–14.
21. Alifieris C., Trafalis D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 152: 63–82.
22. Hara A., Kanayama T., Noguchi K., Niwa A., Miyai M., Kawaguchi M., Ishida K., Hatano Y., Niwa M., Tomita H. (2019). Treatment Strategies Based on Histological Targets against Invasive and Resistant Glioblastoma. *Journal of Oncology*, 2019: 1–10.
23. Lin Y., Zhai E., Liao B., Xu L., Zhang X., Peng S., He Y., Ca, S., Zeng Z., Chen M. (2017). Autocrine VEGF signaling promotes cell proliferation through a PLC-dependent pathway and modulates Apatinib treatment efficacy in gastric cancer. *Oncotarget*, 8(7): 11990–12002.
24. Trojan J., Cloix J. F., Ardourel M. Y., Chatel M., Anthony D. D. (2007). Insulin-like growth factor type I biology and targeting in malignant gliomas. *Neuroscience*, 145(3): 795–811.
25. Jhaveri N., Chen T. C., Hofman, F. M. (2016). Tumor vasculature and glioma stem cells: Contributions to glioma progression. *Cancer Letters*, 380(2): 545–551.

26. Johnson K. J., Scheurer M. E., Woehrer A., Wiemels J. (2016). Evolving evidence on tumor and germline genetic classification of gliomas: Implications for etiology and survival studies. *Clinical Neuropathology*, 35(1): 31–38.
27. Katedrze P. W., Akademii O. (2008). Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego. 1–105.
28. Killela P. J., Pirozzi C. J., Reitman Z. J., Jones S., Rasheed B. A., Lipp E., Friedman H., Friedman A. H., He, Y., McLendon R. E., Bigner D. D., Yan, H. (2014). The genetic landscape of anaplastic astrocytoma. *Oncotarget*, 5(6): 1452–1457.
29. Szumiło M., Rahden-staroń I. (2008). Fosfolipaza C zależna od fosfatydyloinozytolu w komórkach ssaków – budowa , właściwości i funkcja Phosphoinositide-specific phospholipase C in mammalian cells : Structure , properties , and function. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*: 47–54.
30. Tada M., Nishizawa M., Onodera O. (2016). Roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in spinocerebellar ataxias. *Neurochemistry International*, 94: 1–8.
31. Zhao H. fu Wang J., Shao W., Wu C. peng Chen Z. ping To, S. shun T., Li W. ping. (2017). Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: Current preclinical and clinical development. *Molecular Cancer*, 16(1): 1–16.
32. Xiong J., Zhou L., Lim Y., Yang M., Zhu Y. H., Li Z. W., Zhou F. H., Xiao Z. C., Zhou,X. F. (2013). Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro. *Oncology Reports*, 30(6): 2719–2724.
33. Ohira K., Hayashi M. (2009). A New Aspect of the TrkB Signaling Pathway in Neural Plasticity. *Current Neuropharmacology*, 7(4): 276–285.
34. Doebele R. C., Davis L. E., Vaishnavi A., Le, A. T., Estrada-Bernal A., Keysar S., Jimeno A., Varella-Garcia M., Aisner D. L., Li, Y., Stephens P. J., Morosini D., Tuch B. B., Fernandes M., Nanda N., Low J. A. (2015). An oncogenic NTRK fusion in a patient with soft-tissue sarcoma with response to the tropomyosin-related kinase inhibitor LOXO-101. *Cancer Discovery*, 5(10): 1049–1057.
35. Ultsch M. H., Wiesmann C., Simmons L. C., Henrich J., Yang M., Reilly D., Bass S. H., De Vos A. M. (1999). Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *Journal of Molecular Biology*, 290(1): 149–159.

36. Banfield M. J., Naylor R. L., Robertson A. G. S., Allen S. J., Dawbarn D., Brady R. L. (2001). Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: The crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure*, 9(12): 1191–1199.
37. Nan Y., Guo L., Song Y., Wang L., Yu K., Huang Q., Zhong Y. (2017). Combinatorial therapy with adenoviral-mediated PTEN and a PI3K inhibitor suppresses malignant glioma cell growth in vitro and in vivo by regulating the PI3K/AKT signaling pathway. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(8): 1477–1487.
38. Iwama E., Nakanishi Y., Okamoto I. (2018). Combined therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for non–small cell lung cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 18(3): 267–276.
39. Ciechomska I. A., Gabrusiewicz K., Szczepankiewicz A. A., Kaminska B. (2013). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy in malignant glioma cells undergoing cyclosporine A-induced cell death. *Oncogene*, 32(12): 1518–1529.
40. Nakamura J. L., Karlsson A., Arvold N. D., Gottschalk A. R., Pieper R. O., Stokoe D., Haas-Kogan D. A. (2005). PKB/Akt mediates radiosensitization by the signaling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 71(3): 215–222.
41. Lopez J., Tait S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer*, 112(2014): 957–962.
42. Keating G. M., Santoro A. (2009). Sorafenib: A review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs*, 69(2): 223–240.
43. Matsumoto S., Hiraga T., Hayashi Y., Yoshikawa Y., Tsuda C., Araki M., Neya M., Shima F., Kataoka T. (2018). Molecular Basis for Allosteric Inhibition of GTP-Bound H-Ras Protein by a Small-Molecule Compound Carrying a Naphthalene Ring. *Biochemistry*, 57(36) 5350–5358
44. Jambrina P. G., Rauch N., Pilkington R., Rybakova K., Nguyen L. K., Kholodenko B. N., Buchete N. V., Kolch, W., Rosta E. (2016). Phosphorylation of RAF kinase dimers drives conformational changes that facilitate transactivation. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(3): 983–986.

45. Lawn S., Krishna N., Pisklakova A., Qu X., Fenstermacher D. A., Fournier M., Vrionis F. D., Tran N., Chan J. A., Kenchappa R. S., Forsyth P. A. (2015). Neurotrophin Signaling via TrkB and TrkC Receptors Promotes the Growth of Brain Tumor-initiating Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(6): 3814–3824.
46. Chen W., Wu J., Shi H., Wang Z., Zhang G., Cao Y., Jiang C., Ding Y. (2014). Hepatic Stellate Cell Coculture Enables Sorafenib Resistance in Huh7 Cells through HGF/c-Met/Akt and Jak2/Stat3 Pathways. *BioMed Research International*, 2014: 1–10.
47. Yesilkanal A. E., Rosner M. R. (2018). Targeting raf kinase inhibitory protein regulation and function. *Cancers*, 10(9).
48. Bittremieux M., La Rovere R. M., Akl, H., Martines C., Welkenhuyzen K., Dubron K., Baes M., Janssens A., Vandenberghe P., Laurenti L., Rietdorf K., Morciano G., Pinton P., Mikoshiba K., Bootman M. D., Efremov D. G., De Smedt H., Parys J. B., Bultynck G. (2019). Constitutive IP 3 signaling underlies the sensitivity of B-cell cancers to the Bcl-2/IP 3 receptor disruptor BIRD-2. *Cell Death and Differentiation*, 26(3): 531–547.
49. Klein R. R., Bourdon D. M., Costales C. L., Wagner C. D., White W. L., Williams J. D., Hicks S. N., Sondek J., Thakker D. R. (2011). Direct activation of human phospholipase C by its well known inhibitor U73122. *Journal of Biological Chemistry*, 286(14): 12407–12416.
50. Wang H. G., Pathan N., Ethell I. M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Frank, T. F., Reed J. C. (1999). Ca²⁺-Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD. *Science*, 284(5412): 339–343.
51. Lee S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes and Diseases*, 3(3): 198–210.
52. Gerson S. L. (2004). MGMT: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 4(4): 296–307.
53. Wick W., Weller M., Van Den Bent M., Sanson M., Weiler M., Von Deimling A., Plass C., Hegi M., Platten M., Reifenberger G. (2014). MGMT testing - The challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology*, 10(7): 372–385.

54. Samudra N., Zacharias T., Plitt, A., Lega, B., Pan E. (2019). Seizures in glioma patients: An overview of incidence, etiology, and therapies. *Journal of the Neurological Sciences*, 404: 80–85.
55. Yan L., Zhang W. (2018). Precision medicine becomes reality-tumor type-agnostic therapy. *Cancer communications (London, England)*, 38(1): 6.
56. Ricciuti B., Genova C., Crinò L., Libra M., Leonardi G. C. (2019). Antitumor activity of larotrectinib in tumors harboring NTRK gene fusions: a short review on the current evidence. *OncoTargets and Therapy*, 12: 3171–3179.
57. Scott L. J. (2019). Larotrectinib: First Global Approval. *Drugs*, 79(2): 201–206.
58. Chen L., Han L., Shi Z., Zhang K., Liu, Y., Zheng Y., Jiang T., Pu P., Jiang C., Kang C. (2012). LY294002 enhances cytotoxicity of temozolomide in glioma by down-regulation of the PI3K/Akt pathway. *Molecular Medicine Reports*, 5(2): 575–579.
59. Jiang H., Fan D., Zhou G., Li X., Deng H. (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor(LY294002) induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1): 1–7.
60. Sonntag R., Gassler N., Bangen J.-M., Trautwein C., Liedtke C. (2014). Pro-apoptotic Sorafenib signaling in murine hepatocytes depends on malignancy and is associated with PUMA expression in vitro and in vivo. *Cell Death & Disease*, 5(1): 1030–1030.
61. MacMillan D., McCarron, J. G. (2010). The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca²⁺ release from the intracellular sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store by inhibiting Ca²⁺ pumps in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 160(6): 1295–1301.
62. Lo Vasco V. R., Leopizzi M., Di Maio V., Della Rocca C. (2016). U-73122 reduces the cell growth in cultured MG-63 osteosarcoma cell line involving Phosphoinositide-specific Phospholipases C. *SpringerPlus*, 5(1): 1–21.
63. Pulcinelli F. M., Gresele P., Bonuglia M., Gazzaniga P. P. (1998). Evidence for separate effects of U73122 on phospholipase C and calcium channels in human platelets. *Biochemical Pharmacology*, 56(11): 1481–1484.

64. Szczesna E., Miszczyk E., Mikolajczyk-Chmiela M. (2011). Apoptoza i autofagia - mechanizmy i metody detekcji. *Postępy Biologii Komórki*, 38(2): 247–265.
65. Golstein P., Kroemer G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1): 37–43.
66. Su, Z., Yang Z., Xu Y., Chen Y., Yu Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14(1): 1–14.
67. Larsen K. E., Sulzer D. (2002). Autophagy in neurons: A review. *Histology and Histopathology*, 17(3): 897–908.
68. Hou W., Han J., Lu C., Goldstein L. A., Rabinowich H. (2010). Autophagic degradation of active caspase-8: A crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 6(7): 891–900.
69. Fuchs Y., Steller H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4): 742–758.
70. Lam M., Dubyak G., Chen L., Nunez G., Miesfeld R. L., Distelhorst C. W. (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14): 6569–6573.
71. Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4): 495–516.
72. Adams J., Cory S. (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*, 19(5): 488–496.
73. Jakubowicz-Gil J., Langner E., Bądziul D., Wertel I., Rzeski W. (2013). Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment. *Tumor Biology*, 34(4): 2367–2378.
74. Polewska J. (2012). Autofagia-mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine*/ 921–936.
75. He C., Levine B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2): 140–149.

76. Jakubowicz-Gil J., Paduch R., Ulz Z., Badziul D., Głowniak K., Gawron A. (2012). Cell death in Hela cells upon imperatorin and cisplatin treatment. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(3): 381–391.
77. Singletary K., Milner J. (2008). Diet, autophagy, and cancer: A review. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 17(7): 1596–1610.
78. Decuypere J.-P., Parys J. B., Bultynck G. (2012). Regulation of the Autophagic Bcl-2/Beclin 1 Interaction. *Cells*, 1(3): 284–312.
79. Conrad M., Angeli J. P. F., Vandenabeele P., Stockwell B. R. (2016). Regulated necrosis: Disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(5): 348–366.
80. Sachet M., Liang Y. Y., Oehler R. (2017). The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*, 22(10): 1189–1204.
81. Allen S., Sotos J., Sylte M. J., Czuprynski C. J. (2001). Use of Hoechst 33342 Staining To Detect Apoptotic Changes in Bovine Mononuclear Phagocytes Infected with. *Microbiology*, 8(2): 460–464.
82. Thomé M. P., Filippi-Chiela E. C., Villodre E. S., Migliavaca C. B., Onzi G. R., Felipe K. B., Lenz G. (2016). Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *Journal of Cell Science*, 129(24): 4622–4632.
83. Kruger N. J. (2009). The Bradford Method for Protein Quantitation. In *Basic Protein and Peptide Protocols* (pp. 9–16). New Jersey: Humana Press.
84. Wu X., Koiwa, H. (2012). One-step casting of Laemmli discontinued sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel. *Analytical Biochemistry*, 421(1): 347–349.
85. Jakubowicz-Gil J., Bądziul D., Langner E., Wertel I., Zając A., Rzeski, W. (2017). Temozolomide and sorafenib as programmed cell death inducers of human glioma cells. *Pharmacological Reports*, 69(4): 779–787.
86. Jakubowicz-Gil J., Langner E., Wertel I., Piersiak T., Rzeski W. (2010). Temozolomide, quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1): 190–203.

87. Jakubowicz-Gil J., Langner E., Bądziul D., Wertel I., Rzeski W. (2014). Quercetin and sorafenib as a novel and effective couple in programmed cell death induction in human gliomas. *Neurotoxicity Research*, 26(1): 64–77.
88. Pérez-García V. M., Calvo G. F., Belmonte-Beitia J., Diego D., Pérez-Romasanta L. (2011). Bright solitary waves in malignant gliomas. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 84(2): 1–6.
89. Mohr A., Deedigan L., Jencz S., Mehrabadi Y., Houlden L., Albarenque S. M., Zwacka R. M. (2018). Caspase-10: A molecular switch from cell-autonomous apoptosis to communal cell death in response to chemotherapeutic drug treatment. *Cell Death and Differentiation*, 25(2): 340–352.
90. Zhou Y., Zhu L. B., Peng A. F., Wang T. F., Long X. H., Gao S., Zhou R. P., Liu Z. L. (2015). LY294002 inhibits the malignant phenotype of osteosarcoma cells by modulating the phosphatidylinositol 3kinase/Akt/fatty acid synthase signaling pathway in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 11(2): 1352–1357.
91. Morisaki T., Umebayashi M., Kiyota A., Koya N., Tanaka H., Onishi H., Katano M. (2013). Combining celecoxib with sorafenib synergistically inhibits hepatocellular carcinoma cells In Vitro. *Anticancer Research*, 33(4): 1387–1396.
92. Yeh H. W., Lee S. S., Chang C. Y., Hu C. M., Jou Y. S. (2017). Pyrimidine metabolic rate limiting enzymes in poorly differentiated hepatocellular carcinoma are signature genes of cancer stemness and associated with poor prognosis. *Oncotarget*, 8(44): 77734–77751.
93. Niu L. lei, Cheng C. le, Li M. Y., Yang S. li, Hu B. guang Chong C. C. N., Chan S. L., Ren J., Chen G. G., Lai P. B. S. (2018). ID1-induced p16/IL6 axis activation contributes to the resistant of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *Cell Death and Disease*, 9(9).
94. Tomas N. M., Masur K., Piecha J. C., Niggemann B., Zänker K. S. (2012). Akt and phospholipase C γ are involved in the regulation of growth and migration of MDA-MB-468 breast cancer and SW480 colon cancer cells when cultured with diabetogenic levels of glucose and insulin. *BMC Research Notes*, 5(1): 214.

95. Akekawatchai C., Roytrakul S., Kittisenachai S., Isarankura-Na-Ayudhya P., Jitrapakdee S. (2016). Protein profiles associated with anoikis resistance of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(2): 581–590.
96. Messina J., Messina J. (2019). The Signaling Pathways of Metallothionein- Mediated Chemotaxis in Breast Cancer. University Scholar Projects 53.
97. Zhai E., Liang W., Lin Y., Huang L., He X., Cai S., Chen J., Zhang N., Li J., Zhang Q., He Y., Zeng Z., Chen M., Xu L., Peng S. (2018). HSP70/HSP90-Organizing Protein Contributes to Gastric Cancer Progression in an Autocrine Fashion and Predicts Poor Survival in Gastric Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(2): 879–892.
98. Xiong J., Zhou L., Lim Y., Yang M., Zhu Y. H., Wei Li Z., Fu D. L., Zhou X. F. (2015). Mature brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB are upregulated in human glioma tissues. *Oncology Letters*, 10(1): 223–227.
99. Ohira K., Homma K. J., Hirai H., Nakamura S., Hayashi M. (2006). TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(3): 867–874.
100. Ziegler D. S., Wong M., Mayoh C., Kumar A., Tsoli M., Mould E., Tyrrell V., Khuong-Quang D. A., Pinese M., Gayevskiy V., Cohn R. J., Lau L. M. S., Reynolds M., Cox M. C., Gifford A., Rodriguez M., Cowley M. J., Ekert P. G., Marshall G. M., Haber, M. (2018). Brief Report: Potent clinical and radiological response to larotrectinib in TRK fusion-driven high-grade glioma. *British Journal of Cancer*, 119(6): 693–696.
101. Huang, P. Wang D., Su Y., Huang W., Zhou Y., Cui D., Zhu X., Yan D. (2014). Combination of small molecule prodrug and nanodrug delivery: Amphiphilic drug-drug conjugate for cancer therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 136(33): 11748–11756.
102. Xu X., Ho W., Zhang X., Bertrand N., Farokhzad O. (2015). Cancer nanomedicine: From targeted delivery to combination therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 21(4): 223–232.

103. Cai X., Yu K., Zhang L., Li Y., Li Q., Yang Z., Shen T., Duan L., Xiong W., Wang W. (2015). Synergistic inhibition of colon carcinoma cell growth by hedgehog-gli1 inhibitor arsenic trioxide and phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002. *OncoTargets and Therapy*, 8: 877–883.
104. Jimenez-Pascual A., A. Siebzehnrubl F. (2019). Fibroblast Growth Factor Receptor Functions in Glioblastoma. *Cells*, 8(7): 715.
105. Ren, J. Liu, W. Deng Y., Li G. cai Pan Y. ying Xie S., Jin M., Liu H. guo. (2017). Losartan attenuates aortic endothelial apoptosis induced by chronic intermittent hypoxia partly via the phospholipase C pathway. *Sleep and Breathing*, 21(3): 679–689.
106. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(12): 2977–2992.
107. Blokhuis A. M., Groen E. J. N., Koppers M., Van Den Berg L. H., Pasterkamp R. J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 125(6): 777–794.
108. Dobra I., Pankivskyi S., Samsonova A., Pastre D., Hamon L. (2018). Relation Between Stress Granules and Cytoplasmic Protein Aggregates Linked to Neurodegenerative Diseases. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18(12): 107.

Spis tabel i rysunków

Rysunki:

Rysunek 1. Neurony (kolor czerwony) oraz komórki glejowe – astrocyty (kolor szary).....	8
Rysunek 2. Podział komórek glejowych oraz ich funkcje.....	9
Rysunek 3. Dwa rodzaje astrocytów: zielony – typ I astrocyt protoplazmatyczny, czerwony – typ II astrocyt włóknisty.....	10
Rysunek 4. Przekrój poprzeczny mózgu z widocznym guzem nowotworowym (biała strzałka) gwiazdziaka anaplastycznego.....	13
Rysunek 5. Zdjęcia przedstawiające przekrój poprzeczny mózgu z widocznym guzem nowotworowym (biała strzałka): glejaka wielopostaciowego.....	14
Rysunek 6. Palisadowy układ komórek nowotworowych (biała strzałka) wokół rdzenia martwiczego w glejaku wielopostaciowym (barwienie hematoksyliną eozyną).....	15
Rysunek 7. Schemat transformacji nowotworowej komórek glejowych oraz mutacje jej towarzyszące.....	17
Rysunek 8. Struktury aminokwasowe izoform receptora TrkB.....	21
Rysunek 9. Przekazywanie sygnału przeżycia poprzez szlak TrkB i podległe mu szlaki: PI3K/PKB/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK oraz PLC γ 1/PKC.....	22
Rysunek 10. Schemat działania Temozolomidu na komórki glejaków.....	29
Rysunek 11: Schemat przebiegu apoptozy szlakiem zewnątrz- i wewnątrzpochodnym....	34
Rysunek 12. Schemat przebiegu autofagii z uwzględnieniem roli białka beklina-1 w regulacji tego procesu.....	36
Rysunek 13. Proces przełączania procesów apoptozy i autofagii w kontekście tworzenia się kompleksów białkowych Bcl-2:beklina-1.....	38

Tabele:

Tabela 1. Klasyfikacja glejaków wg czterostopniowej skali złośliwości.....	13
Tabela 2. Zastosowane w badaniach odczynniki.....	41
Tabela 3. Zastosowane w badaniach bufory.....	42
Tabela 4. Stężenia badanych związków.....	44
Tabela 5. Schemat równoczesnej aplikacji badanych związków.....	44
Tabela 5. Skład żelu separującego.....	49
Tabela 7. Skład żelu zagęszczającego.....	49
Tabela 8: Wpływ inkubacji linii MOGGCCM oraz T98G z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na tworzenie kompleksu beklina-1:Bcl-2.....	78

Zdjęcia:

Zdjęcie 1: Zdjęcia mikroskopowe badanych linii komórkowych barwionych metodą May-Grünwalda-Giemsy.....43

Zdjęcie 2: Zdjęcie komórek glejaków wybarwionych mieszaniną Hoechst 33342 oraz jodku propidionowego.....45

Zdjęcie 3: Zdjęcie komórek autofagalnych (A) oraz prawidłowych (B) linii T98G po wybarwieniu oranżem akrydyny.....46

Figury:

Figura 1. Efekt 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z LY294002 (0-30 μ M).....56

Figura 2. Efekt 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z U-73122 (0-30 μ M).....58

Figura 3. Efekt 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z LOXO-101 (0-1 μ M).....60

Figura 4. Porównanie efektów 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z Temozolomidem w stosunku do badanych inhibitorów.....62

Figura 5. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego kontrolnych komórek T98G (A) oraz poddanych inkubacji z badanymi związkami.....63

Figura 6. Porównanie efektów 24h inkubacji komórek MOGGCCM (A) oraz T98G (B) z Temozolomidem w stosunku do kombinacji inhibitorów.....65

Figura 7. Wpływ 24 godzinnej, pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U), LOXO-101 (X) na poziom ekspresji kaspazy 3 w komórkach MOGGCCM (A) oraz T98G (B).....68

Figura 8. Wpływ 24 godzinnej, pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U), LOXO-101 (X) na aktywność kaspazy 3 (A), 8 (B) oraz 9 (C) w komórkach MOGGCCM.....70

Figura 9. Wpływ 24 godzinnej, pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U), LOXO-101 (X) na aktywność kaspazy 3 (A), 8 (B) oraz 9 (C) w komórkach T98G.....72

Figura 10. Wpływ 24 godzinnej, pojedynczej oraz skojarzonej aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U), LOXO-101 (X) na poziom ekspresji bekliny 1 w komórkach MOGGCCM (A) oraz T98G (B).....74

Figura 11. Wpływ aplikacji LY294002 (L), sorafenibu (S), Temozolomidu (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na obecność pęcherzykowatych struktur w komórkach MOGGCCM (A) oraz T98G (B).....76

Figura 12. Wpływ inkubacji linii MOGGCCM oraz T98G z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na tworzenie kompleksu beklina-1:Bcl-2.....79

Figura 13. Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii MOGGCCM z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na poziom ekspresji: A – PI3K, B – Raf, C – PLC γ 1, D – TrkB.....	82
Figura 14 Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii MOGGCCM z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na poziom aktywności: A – Akt/PKB, B – ERK, C – PKC.....	83
Figura 15. Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii T98G z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na poziom ekspresji: A – PI3K, B – Raf, C – PLC γ 1, D – TrkB.....	86
Figura 16. Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii T98G z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na poziom aktywności: A – Akt/PKB, B – ERK, C – PKC.....	87
Figura 17. Wpływ odczynników do siRNA na poziom ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1 oraz TrkB w komórkach MOGGCCM i Wpływ blokowania ekspresji PI3K (A), Raf (B), PLC γ 1 (C) oraz TrkB (D) specyficznymi siRNA na poziom apoptozy, autofagii i nekrozy.....	89
Figura 18. Wpływ odczynników do siRNA na poziom ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1 oraz TrkB w komórkach MOGGCCM i Wpływ blokowania ekspresji PI3K (A), Raf (B), PLC γ 1 (C) oraz TrkB (D) specyficznymi siRNA na poziom apoptozy, autofagii i nekrozy.....	91
Figura 19. Wpływ 24 godzinnej inkubacji linii T98G z LY294002 (L), sorafenibem (S), Temozolomidem (T), U-73122 (U) oraz LOXO-101 (X) na mobilność komórek MOGGCCM (I) oraz T98G (II).....	93

STRESZCZENIE

Glejaki są najbardziej złośliwymi nowotworami centralnego układu nerwowego i stanowią niezwykle istotny problem terapeutyczny, dotykający ludzi na całym świecie. Obecnie dostępne metody leczenia pozwalają jedynie na poprawę jakości życia oraz nieznaczne jego wydłużenie. U podstaw wysokiej oporności na leczenie leży bardzo wysoki potencjał proliferacyjny, migracyjny oraz infiltracyjny komórek. Złośliwy charakter glejaków oraz ich oporność na indukcję zaprogramowanej śmierci jest ściśle związana z nadekspresją receptora TrkB oraz szlaków przez niego regulowanych: PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK oraz PLC γ 1-PKC. Dlatego też, poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych opartych na blokowaniu przekazywania sygnału przeżycia przez te szlaki daje nadzieję na walkę z chorobą, przy zastosowaniu nowatorskich terapii celowanych.

W badaniach przeprowadzonych na ludzkich liniach gwiazdziaka anaplastycznego (MOGGCCM) oraz glejaka wielopostaciowego (T98G) podjęto próbę określenia przeciwnowotworowego działania LY294002 (inhibitor PI3K), sorafenibu (inhibitor Raf), U-73122 (inhibitor PLC γ 1) i LOXO-101 (inhibitor TrkB) oraz cytostatyku Temozolomidu, w pojedynczej jak i równoczesnej aplikacji, w kontekście indukcji zaprogramowanej śmierci komórkowej.

Uzyskane wyniki wykazały, iż zastosowane związki skutecznie indukowały zaprogramowaną śmierć komórkową w obu liniach, a także hamowały migrację komórek. W przypadku autofagii wiązało się to ze wzrostem poziomu ekspresji markera – bekliny-1, a w komórkach apoptotycznych obserwowano wzrost ekspresji i aktywności kaspaz 3, 8 oraz 9.

Równoczesna inkubacja z badanymi substancjami okazała się być skuteczniejsza w eliminacji komórek glejaków poprzez inicjację zaprogramowanej śmierci w porównaniu do pojedynczej aplikacji, a komórki glejaka wielopostaciowego bardziej wrażliwe na zastosowaną terapię niż gwiazdziaka anaplastycznego. W przypadku linii MOGGCCM najwięcej komórek apoptotycznych obserwowano po zastosowaniu kombinacji LY294002, U-73122 i Temozolomidu, co świadczy o zaangażowaniu szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz PLC γ 1-PKC w oporność gwiazdziaka anaplastycznego. Z kolei w linii T98G największą ilość martwych na drodze zaprogramowanej śmierci komórek odnotowano po równoczesnej inkubacji z LY294002, sorafenibem i Temozolomidem, co stanowi dowód, że oporność glejaka wielopostaciowego związana jest z pobudzaniem szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR i Ras-Raf-MEK-ERK.

Zablokowanie ekspresji PI3K, Raf, PLC γ 1 oraz TrkB z użyciem specyficznych siRNA dostarczyło bezpośredniego dowodu na zaangażowanie badanych szlaków w oporności glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci oraz skuteczność inhibitorów w blokowaniu sygnału przeżycia i uwrażliwianie komórek nowotworowych na indukcję apoptozy.

ABSTRACT

Gliomas are the most malignant tumors of the central nervous system and present an extremely important therapeutic problem affecting people around the world. Currently available treatments allow only to improve the quality of life and prolong survival. High resistance to applied therapy is based on the very high proliferative, migration and infiltration potential of cells. The malignant nature of gliomas and their resistance to the induction of programmed death is closely related to the overexpression of the TrkB receptor and its regulated pathways: PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK, and PLC γ 1-PKC. Therefore, the search for new therapeutic strategies based on blocking survival signal transmission through these pathways gives hope for the elimination of the disease using novel targeted therapies.

The aim of the study conducted on human anaplastic astrocytoma (MOGGCCM) and glioblastoma multiforme (T98G) cell lines was to determine the anti-tumor activity of LY294002 (PI3K inhibitor), sorafenib (Raf inhibitor), U-73122 (PLC γ 1 inhibitor), and LOXO-101 (TrkB inhibitor) as well as Temozolomide in a single and simultaneous application by the induction of programmed cell death.

The results showed that the studied compounds effectively eliminated both cell lines on the way of programmed death and inhibited their migration also. Autophagy was associated with an increase of its markers expression - beclin-1, while in apoptotic cells an increase in the expression and activity of caspases 3, 8 and 9 were observed.

Simultaneous application of the studied substances was more effective in the elimination of glioma cells by programmed cell death in comparison to single treatment, while glioblastoma multiforme appeared to be more sensitive to the used therapy than anaplastic astrocytoma. MOGGCCM cells were mostly sensitive to the apoptosis initiation after simultaneous incubation with LY294002, U-73122 and Temozolomide, which indicates the involvement of PI3K-Akt/PKB-mTOR and PLC γ 1-PKC pathways in anaplastic astrocytoma resistance. In turn, the largest number of apoptotic cells were observed in the T98G line after simultaneous incubation with LY294002, sorafenib, and Temozolomide, what suggests that the resistance of glioblastoma multiforme is associated with the stimulation of PI3K-Akt / PKB-mTOR and Ras-Raf-MEK-ERK pathways.

Blocking the expression of PI3K, Raf, PLC γ 1 and TrkB with specific siRNAs provided direct evidence of the involvement of studied pathways in gliomas resistance to programmed cell death initiation and confirmed the effectiveness of studied inhibitors in blocking the survival signal and sensitizing cancer cells to the induction of apoptosis.