



UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie
Instytut Nauk Biologicznych

Joanna Sumorek-Wiadro

**Potencjał terapeutyczny kumaryn w terapii skojarzonej z
temozolomidem w eliminacji ludzkich komórek glejaka na
drodze zaprogramowanej śmierci**

***Therapeutic potential of coumarins in combination therapy with
temozolomide in the elimination of human glioma cells by
programmed death***

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil, prof. UMCS

Lublin, 2022



ROZPRAWA DOKTORSKA

*Składam serdeczne podziękowania Pani Promotor
dr hab. Joannie Jakubowicz-Gil, prof. UMCS,
za życzliwość, cenne uwagi merytoryczne oraz nieocenioną
pomoc, a także za poświęcony czas i zaangażowanie.*

*Dziękuję wszystkim Pracownikom Katedry Anatomii
Funkcjonalnej i Cytobiologii UMCS,
za miłą atmosferę podczas realizacji badań.*

*Dziękuję najbliższym, w szczególności Mężowi, za wsparcie,
cierpliwość i wiarę we mnie.*

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie została opublikowana w następujących artykułach:

1. Sumorek-Wiadro J, Zając A, Langner E, SkalickaWoźniak K, Maciejczyk A, Rzeski W, Jakubowicz-Gil J, 2020, Antiglioma Potential of coumarins combined with sorafenib, *Molecules* 25(21): 5192 (IF = 3,267, Pkt_{MNiSW}= 100)
2. Sumorek-Wiadro J, Zając A, Bądziul D, Langner E, Skalicka-Woźniak K, Maciejczyk A, Wertel I, Rzeski W, Jakubowicz-Gil J, 2020, Coumarins modulate the anti-glioma properties of temozolomide. *European Journal of Pharmacology* 881: 173207; DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173207 (IF=3,17, Pkt_{MNiSW}=100)

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	8
Streszczenie	12
Summary.....	14
I. WSTĘP.....	16
1. Glejaki.....	16
1.1. Klasyfikacja.....	16
1.1.1. Gwiaździatek anaplastyczny	18
1.1.2. Glejak wielopostaciowy	19
1.2. Molekularne podłoże transformacji glejaków.....	20
1.2.1. Szlak RAS-RAF-MEK-ERK.....	20
1.2.2. Szlak PI3K-AKT/PKB-mTOR.....	22
1.3. Metody terapeutyczne	25
1.3.1. Leczenie operacyjne	25
1.3.2. Radioterapia.....	26
1.3.3. Chemioterapia.....	27
1.3.3.1. Temozolomid	27
1.3.4. Nowe strategie terapeutyczne.....	29
1.3.4.1. Sorafenib	29
1.3.4.2. LY294002.....	30
2. Programowana śmierć komórki	32
2.1. Apoptoza	32
2.2. Autofagia.....	35
2.3. Apoptoza a autofagia.....	38
3. Kumaryny i ich właściwości przeciwnowotworowe.....	39
3.1. Kumaryny proste	40
3.1.1. Hydroksylowe pochodne kumaryny	40
3.1.2. Ostol	43
3.2. Furanokumaryny	44
3.2.1. Metoksyłowe pochodne psoralenu	45
3.2.2. Izopentenyloksylowe pochodne psoralenu	47
II. CEL PRACY	50
III. MATERIAŁY I METODY	52
1. Spis odczynników	52
2. Spis buforów	53

3. Linie komórkowe	54
4. Badane związki	55
5. Izolacja kumaryn	56
5.1. Izolacja kumaryn prostych	56
5.2. Izolacja furanokumaryn.....	57
6. Metodyka badawcza.....	58
6.1. Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych.....	58
6.2. Identyfikacja komórek autofagalnych.....	59
6.3. Otrzymywanie ekstraktów bezkomórkowych.....	59
6.4. Oznaczanie stężenia białka.....	59
6.5. Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym	60
6.6. Technika immunoblotingu	60
6.7. Badanie aktywności enzymatycznej metodą ELISA	62
6.7.1. Określanie aktywności kaspazy 3.....	62
6.7.2. Określenie aktywności AKT/ERK	62
6.8. Blokowanie ekspresji kinazy PI3K i Raf	63
6.9. Koimmunoprecypitacja	63
6.10. Test rysy	64
6.11. Test Chou-Talalay	64
6.12. Analiza statystyczna.....	66
IV. WYNIKI.....	67
1. Wpływ kumaryn na indukcję zaprogramowanej śmierci w ludzkich komórkach glejaka.....	67
1.1. Kumaryny proste	67
1.2. Furanokumaryny	70
2. Przeciwnowotworowe właściwości skojarzonego działania kumaryn oraz temozolomidu	72
2.1. Wpływ skojarzonej aplikacji kumaryn oraz temozolomidu na indukcję zaprogramowanej śmierci	72
2.1.1. Kumaryny proste + temozolomid.....	72
2.1.2. Furanokumaryny + temozolomid	74
2.2. Wpływ ostolu, imperatoryny i temozolomidu na potencjał migracyjny.....	76
2.3. Wpływ ostolu, imperatoryny i temozolomidu na molekularne mechanizmy zaprogramowanej śmierci w glejakiach.....	78
2.3.1. Poziom i aktywność kaspazy 3	78
2.3.2. Poziom bekliny 1	81

2.3.3.	Poziom białka Bcl-2	82
2.3.4.	Obecność kompleksów białek Bcl-2:beklina1	83
2.3.5.	Poziom kinaz PI3K i RAF	84
2.3.6.	Aktywność Akt/PKB i ERK	86
2.4.	Wpływ kumaryn oraz inhibitorów szlaków RAS-RAF-MEK-ERK (sorafenib) i PI3K-AKT/PKB-mTOR (LY294002) na indukcję zaprogramowanej śmierci	89
2.4.1.	Aplikacja skojarzona z sorafenibem	89
	Kumaryny proste + sorafenib	89
	Furanokumaryny + sorafenib	91
2.4.2.	Aplikacja skojarzona z LY294002	93
	Kumaryny proste + LY294002	93
	Furanokumaryny + LY294002	95
2.4.3.	Wpływ kumaryn w aplikacji z inhibitorami PI3K (LY294002) i RAF (sorafenib) na poziom kaspazy 3 i bekliny 1	97
2.4.4.	Wpływ ostolu i imperatoryny w aplikacji skojarzonej z LY294002 i sorafenibem na potencjał migracyjny komórek glejaka	100
2.4.5.	Blokowanie ekspresji PI3K i RAF	103
V.	DYSKUSJA	106
VI.	WNIOSKI	117
VII.	SUPLEMENT - ocena skuteczności aplikacji skojarzonej	118
2.5.	Ostol	118
2.6.	Imperatoryna	122
VIII.	BIBLIOGRAFIA	126
IX.	SPIS RYCIN	141
X.	SPIS TABEL	147
XI.	ANEKS – ŻYCIORYS NAUKOWY	148

Wykaz stosowanych skrótów

AA – gwiaździak anaplastyczny, ang. *anaplastic astrocytoma*

ABC – transportery wiążący ATP, ang. *ATP-binding cassette transporters*

ACNU – nimustyna, ang. *1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl) 3-nitrosourea hydrochloride*

AIF – czynnik indukujący apoptozę, ang. *apoptosis inducing factor*

AKT/PKB – kinaza białkowa typu B, ang. *protein kinase B*

Apaf-1 – apoptotyczny czynnik aktywujący proteazę, ang. *apoptosis protease-activating factor 1*

Apo1 – antygen apoptozy 1, ang. *apoptosis antigen 1*

ATCC – Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych, ang. *American Type Culture Collection*

Atg – gen związany z autofagią, ang. *autophagy-related gene*

Bad – białko proapoptotyczne, ang. *Bcl-2 antagonist of cell death*

Bax – białko proapoptotyczne, ang. *Bcl-2-associated X protein*

BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolilo fosforan, ang. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*

Bcl-2 – rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy, ang. *B-cell lymphoma 2*

Bcl-XL – białko antyapoptotyczne, ang. *B-cell lymphoma-extra large*

BCNU – karmustyna, ang. *1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea*

BH – domena Bcl-2 homologiczna, ang. *Bcl-2 homology domain*

BSA – albumina surowicy bydłowej, ang. *bovine serum albumin*

CARD – domena rekrutacji kaspaz, ang. *caspase recruitment domain*

CCNU – lomustyna, ang. *1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea*

CD95 – antygen różnicowania, ang. *cluster of differentiation 95*

CDK – kinaza zależna od cyklin, ang. *cyclin-dependent kinase*

CI – wskaźnik kombinacji, ang. *combination index*

CK2 – kinaza kazeinowa 2, ang. *casein kinase 2*

c-KIT – receptor kinazy tyrozynowej, ang. *tyrosine kinase receptor*

c-src – protoonkogenna niereceptorowa kinaza tyrozynowa, ang. *cellular proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase*

DD – domena śmierci, ang. *death domain*

DED – efektorowa domena śmierci, ang. *death effector domain*

DISC – kompleks zapoczątkowujący śmierć komórki, ang. *death-inducing signaling complex*

DRI – wskaźnik redukcji dawki, ang. *dose reduction index*

ECACC – Europejska Kolekcja Linii Komórkowych, ang. *European Collection of Cell Cultures*

EGFR – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu, ang. *endothelial growth factor receptor*

EGFRvIII – zmutowany wariant III EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor variant III*

ERK – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym, ang. *extracellular signal-regulated kinase*

FADD – białko oddziałujące z domeną śmierci FAS, ang. *Fas-associated death domain protein*

FIP200 – białko wchodzące w skład kompleksu uczestniczącego w inicjacji autofagii, ang. *focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*

FLT – receptor kinazy tyrozynowej, ang. *fms-related tyrosine kinase receptor*

GBM – glejak wielopostaciowy, ang. *glioblastoma multiforme*

HIF-1 – czynnik indukowany hipoksją 1, ang. *hypoxia-inducible factor 1*

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa, ang. *high-performance liquid chromatography*

HPLC-DAD – wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem diodowym, ang. *high-performance liquid chromatography with diode-array detection*

HSCCC – wysokosprawna chromatografia przeciwprądowa, ang. *high speed counter current chromatography*

Hsp – białka szoku cieplnego, ang. *heat shock proteins*

IAP – rodzina białek będących inhibitorami apoptozy, ang. *inhibitors of apoptosis protein family*

IDH – dehydrogenaza izocytrynianowa, ang. *isocitrate dehydrogenase*

LAMP-2 – białko związane z błoną lizosomu 2, ang. *lysosome-associated membrane protein 2*

LC3 – lekkie łańcuchy białka związanego z mikrotubulami, ang. *microtubule-associated protein light chain 3*

Mcl-1 – białko antyapoptotyczne, ang. *induced myeloid leukemia cell differentiation protein*

MEK – kinaza aktywowana mitogenami, ang. *mitogen activated protein kinase*

MGMT – metylotransferaza O-6-metyloguaniny, ang. *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*

MMP – macierzowe metaloproteinazy, ang. *matrix metalloproteinases*

MRI – magnetyczny rezonans jądrowy, ang. *magnetic resonance imaging*

MSN – mezoporowate nanocząstki krzemionkowe, ang. *mesoporous silica nanoparticles*

mTOR – ssaczy cel rapamycyny, ang. *mammalian target of rapamycin kinase*

mTORC – kompleks kinazy mTOR, ang. *mammalian target of rapamycin complex 1*

NBT – chlorek nitroblękitu tetrazolu, ang. *nitrotetrazolium blue*

NF1 – neurofibromina 1, ang. *neurofibromin 1*

NSF – ATPaza zaangażowana w fuzję błon, ang. *N-ethylmaleimide sensitive Fusion protein*

P53 – białko P53, ang. *tumor protein 53*

PCB – prokarbazyna, ang. *procarbazine*

PCD – zaprogramowana śmierć komórki, ang. *programmed cell death*

PDGFR – receptor czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego, ang. *platelet-derived growth factor receptor*

PDK1 – kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu, ang. *phosphoinositide-dependent kinase 1*

PH – domena homologii plekstryny, ang. *pleckstrin homology domain*

PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, ang. *phosphoinositide 3-kinase*

PIM1 – protonkogenna kinaza serynowo-treoninowa, Pim-1, ang. *Pim-1 proto-oncogene serine/threonine kinase*

PIP2 – 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu, ang. *phosphatidylinositol bisphosphate*

PIP3 – 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu, ang. *phosphatidylinositol triphosphate*

PTEN – homolog fosfatazy i tensyny, ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome10*

PTP – mitochondrialne kanały błonowe, ang. *permeability transition pore*

Rac1 – związany z Ras substrat 1 toksyny botulinowej C3, ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RAF – serynowo-treoninowa kinaza RAF, ang. *rapidly accelerated fibrosarcoma kinase*

RAS – białko Ras, ang. *Rat sarcoma virus protein*

RB – białko siatkówczaka, ang. *retinoblastoma protein*

RIP – białko oddziałujące z receptorem, ang. *receptor interacting protein*

SDS-PAGE – elektroforeza w warunkach denaturujących, ang. *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

Smac/DIABLO – białko proapoptotyczne; wtórny mitochondrialny aktywator kaspazy/białko wiążące IAP o niskim pI, ang. *secondary mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*

SMAD – przekaźniki drugiego rzędu aktywowane nadrodziną białek TGF- β , ang. *Smad and Mad related proteins*

SMAD4 – białko pośredniczące SMAD, ang. *SMAD family member 4*

SNARE – receptory rozpuszczalnych białek wiążących NSF, ang. *soluble NSF-attachment protein receptor*

TMZ – temozolomid, ang. *temozolomide*

TNF – błonowy receptor śmierci, ang. *tumor necrosis factor*

TNF – czynnik martwicy nowotworu, ang. *tumor necrosis factor*

TNF-R – receptor czynnika martwicy nowotworu, ang. *tumor necrosis factor receptor*

TRADD – białko oddziałujące z domeną śmierci TNFR1, ang. *TNFR1-associated death domain*

TRAIL – ligand czynnika martwicy nowotworu, ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

TRAIL-R – receptor dla TRAIL, ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor*

ULK1/2 – kinaza serynowo-treoninowa, uczestnicząca w inicjacji autofagii, ang. *uncoordinated-51-like autophagy activating kinase*

UVRAG – gen kodujący białko oddziałujące z beklina 1, związany z opornością na promieniowanie UV, ang. *UV resistance associated gene*

VEGFR – receptor dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu, ang. *vascular endothelial growth factor receptor*

Vps34 – klasa III PI3K, ang. *vacuolar protein sorting 34*

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia, ang. *World Health Organization*

Streszczenie

Gwiaździak anaplastyczny i glejak wielopostaciowy to nowotwory centralnego układu nerwowego, które wiążą się z niezwykle złym rokowaniem. Aktualnie stosowane metody leczenia pozwalają jedynie na wydłużenie życia pacjenta oraz poprawę jego jakości. Ze względu na naciekowy charakter wzrostu glejaków, całkowita resekcja chirurgiczna jest praktycznie niemożliwa, zaś w trakcie radio- i chemioterapii bardzo często dochodzi do nabywania oporności na stosowane leczenie. Z tego względu poszukiwane są nowe związki, mogące wspomóc stosowaną terapię. Biorąc pod uwagę powszechną dostępność oraz szerokie spektrum działania wiele uwagi poświęca się w tym aspekcie naturalnym kumarynom. Wielokrotnie wykazano bowiem, że sprzężenie działania tych związków z chemioterapią potęguje przeciwnowotworowe działanie cytostatyków, działając jednocześnie protekcyjnie na komórki prawidłowe. Wykazano również, że duży wpływ na właściwości biologiczne kumaryn ma ich struktura chemiczna. Dlatego też w niniejszej pracy podjęto próbę określenia wpływu obecności oraz lokalizacji określonych podstawników na aktywność przeciwnowotworową wybranych kumaryn prostych (ostol, 4-hydroksykumaryna, umbeliferon i eskulina) i furanokumaryn (imperatoryna, izoimperatoryna, bergapten i ksantotoksyna).

Na poziomie molekularnym transformacja glejaków związana jest ze wzmożonym przekazywaniem sygnału przeżycia przez dwa kluczowe szlaki sygnałowe RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR, dlatego opracowanie nowych strategii terapeutycznych, uwzględniających blokowanie aktywności wspomnianych szlaków poprzez specyficzne inhibitory może mieć duże znaczenie w leczeniu tych nowotworów. Z danych literaturowych wiadomo również, że stosowanie pojedynczych związków w chemioterapii jest mniej skuteczne od tzw. terapii skojarzonej, wykorzystującej kilka związków o różnych mechanizmach działania. Dlatego też, działanie badanych kumaryn zostało sprzężone z temozolomidem – lekiem aktualnie stosowanym w terapii przeciwko glejakom oraz z inhibitorami szlaków RAS-RAF-MEK-ERK (sorafenib) i PI3K-AKT/PKB-mTOR (LY294002).

Przeprowadzone analizy mikroskopowe wykazały, że wszystkie badane związki indukowały zaprogramowaną śmierć w ludzkich komórkach glejaka (linia MOGGCCM i T98G), a dominującym typem śmierci była apoptoza. Zaobserwowano jednocześnie, że wrażliwość komórek glejaków na stosowaną terapię w dużej mierze zależała od zastosowanej linii komórkowej oraz budowy strukturalnej badanych związków. Wyższa

aktywność proapoptotyczna, zarówno kumaryn prostych jak i furanokumaryn, uwarunkowana była obecnością ugrupowania izoprenyloвого, występującego w strukturze ostolu i imperatoryny. Z kolei zastąpienie podstawnika metoksylowego (występującego w cząsteczce ostolu) przez pierścień furanu (obecny w strukturze imperatoryny) obniżało cytotoksyczność związku w stosunku do obu badanych linii komórkowych. Jednoczesna aplikacja temozolomidu z badanymi kumarynami znacząco redukowała odsetek komórek autofagalnych. Stosując technikę immunoblottingu wykazano, że na poziomie molekularnym aktywność proapoptotyczna ostolu i imperatoryny w aplikacji pojedynczej, jak i skojarzonej z temozolomidem, związana była z ich zdolnością do zwiększania poziomu oraz aktywności kaspazy 3, a także zmniejszania ilości antyapoptotycznego białka Bcl-2. Indukcji autofagii towarzyszył z kolei wzrost poziomu bekliny 1. Metodą immunoprecypitacji wykazano również, że kluczową rolę w kierowaniu śmiertelnego sygnału na drogę apoptozy odgrywa obecność kompleksów białek Bcl-2:beklina 1.

Z przeprowadzonych badań wynika, że zarówno ostol jak i imperatoryna posiadały zdolność do zmniejszania poziomu oraz aktywności białek biorących udział w przekazywaniu sygnału przeżycia od błony komórkowej do jądra, wchodzących w skład szlaków RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR. Co więcej, skojarzona aplikacja inhibitorów tych szlaków: sorafenib (inhibitor RAF) i LY294002 (inhibitor PI3K) znacznie zmniejszała oporność komórek glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci przez ostol i imperatorynę. Zablokowanie ekspresji wspomnianych kinaz przy pomocy specyficznych siRNA w jeszcze wyższym stopniu zwiększyło wrażliwość komórek glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci. Obok właściwości proapoptotycznych, związki te zmniejszały potencjał migracyjny komórek glejaków, co wykazano stosując test rysy.

Biorąc pod uwagę powszechną dostępność oraz wysoki potencjał przeciwnowotworowy badanych pochodnych kumaryny, uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do opracowywania nowych strategii terapeutycznych, uwrażliwiających komórki glajaka na indukcję zaprogramowanej śmierci. Poznanie funkcji, jaką pełnią poszczególne ugrupowania w aktywności przeciwnowotworowej pochodnych kumaryny ułatwi z kolei konstruowanie i przewidywanie skutków ich zastosowania.

Słowa kluczowe: furanokumaryny, kumaryny proste, glejaki, zaprogramowana śmierć, temozolomid, sorafenib, LY294002

Summary

Anaplastic astrocytoma and glioblastoma are central nervous system tumors with extremely poor prognosis. Current treatment allows only to prolong survival, and enhance the quality of patient's life. Due to their infiltrative nature, they are practically impossible to remove surgically, and resistance mechanisms are often observed during radio- and chemotherapy. For this reason, new compounds that can support the applied therapy are sought. Considering the widespread availability and wide spectrum of activity, a lot of attention is paid to natural coumarins. It has been shown many times that the conjugation of the action of these compounds with chemotherapy enhances the anti-cancer effect of cytostatics. The cytotoxicity of coumarins towards cancer cells depends on their chemical structure; therefore, understanding the effect of various substituents on the anti-tumor properties of these compounds will result in more effective planning of therapeutic strategies. Therefore, in this study an attempt was made to determine the influence of the presence and location of specific substituents on the antitumor activity of selected simple coumarins (osthole, 4-hydroxycoumarin, umbeliferon and esculin) and furanocoumarins (imperatorin, isoimperatorin, bergapten and xanthotoxin).

At the molecular level, gliomas are characterized by the presence of mutations within genes, the products of which are involved in enhancement of intracellular signal transmission from the cell membrane to the nucleus. This applies in particular to the pro-survival pathways responsible for the regulation of cell proliferation and differentiation: RAS-RAF-MEK-ERK and PI3K-AKT/PKB-mTOR. It has been described that blocking the signal transmission would be beneficial in increasing glioma cell sensitivity. It is also known that combination therapy, especially with natural compounds, would increase the anticancer potential of clinically used pharmacotherapy. Therefore, the effect of the studied coumarins was coupled with temozolomide - a drug currently used in the treatment of glioblastomas and with inhibitors of the RAS-RAF-MEK-ERK (sorafenib) and PI3K-AKT / PKB-mTOR (LY294002) pathways.

The microscopic analyzes performed showed that all coumarins induced programmed death in human glioblastoma cells (MOGGCCM and T98G), and dominated type of death was apoptosis. It was also observed that the sensitivity of glioblastoma cells to the applied therapy largely depended on the cell line used and the structure of the tested compounds. The higher pro-apoptotic activity of both simple coumarins and furanocoumarins was due to

the presence of isoprenyl group in the structure of osthole and imperatorin. On the other hand, the replacement of the methoxy substituent (present in the osthole molecule) with the furan ring (present in the imperatorin structure) decreased the cytotoxicity of the compound in relation to both tested cell lines. The simultaneous application of temozolomide with tested coumarins significantly reduced the level of autophagy. As revealed by the immunoblotting technique, the pro-apoptotic activity of ostole and imperatorin, alone and in combination with temozolomide, was associated with the increased level and activity of caspase 3, and the reduce amount of the anti-apoptotic protein Bcl-2. Induction of autophagy, in turn, was accompanied by an increase in the level of beclin 1. Immunoprecipitation also showed that the presence of the Bcl-2: beclin 1 complexes played a key role in directing the lethal signal to the apoptotic pathway.

The conducted studies have shown that both osthole and imperatorin had the ability to reduce the level and activity of proteins involved in the transmission of the survival signal from the cell membrane to the nucleus, which are part of the RAS-RAF-MEK-ERK and PI3K-AKT / PKB-mTOR pathways. Moreover, combination therapy using inhibitors of these pathways: sorafenib (RAF inhibitor) and LY294002 (PI3K inhibitor) significantly decreased glioma cell resistance to induction of programmed death by osthole and imperatorin. Blocking the expression of these kinases with specific siRNAs further increased the sensitivity of glioblastoma cells to the induction of programmed death. Moreover, in addition to their pro-apoptotic properties, these compounds reduced the migration potential of glioblastoma cells.

Taking into account the widespread availability and high antitumor potential of the studied coumarin derivatives, the obtained results may constitute the basis for the development of new therapeutic strategies, sensitizing glioblastoma cells to the induction of programmed death. Understanding the function of particular substituents in the antitumor activity of coumarin derivatives will, in turn, facilitate the construction and prediction of the effects of their application.

Key words: furanocoumarins, simple coumarins, gliomas, programmed cell death, temozolomide, sorafenib, LY294002

I. WSTĘP

1. Glejaki

1.1. Klasyfikacja

Glejaki są najczęściej występującymi nowotworami ośrodkowego układu nerwowego i stanowią około 30 – 40% guzów wewnątrzczaszkowych. Rozwijają się, z pełniących funkcje podporowe i odżywcze, komórek glejowych, które obok neuronów, stanowią główny składnik tkanki nerwowej. W zależności od miejsca występowania, wyróżnia się, tworzące ośrodkowy układ nerwowy: ependymocyty, astrocyty, oligodendrocyty i mikroglej oraz wchodzące w skład obwodowego układu nerwowego: komórki płaszczowe (satelitarne) i limfocyty. Rodzaj komórek, który uległ transformacji nowotworowej pozwala na klasyfikację glejaków na gwiaździaki (wywodzące się z astrocytów), wyściółczaki (z ependymocytów), skąpodrzewiaki (z oligodendrocytów) oraz glejaki mieszane (z astrocytów i oligodendrocytów). Wśród nich najczęściej występują gwiaździaki, które stanowią około 75% wszystkich glejaków. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. WHO – *World Health Organization*), w oparciu o histologiczną ocenę złośliwości, dokonuje podziału glejaków za pomocą czterostopniowej skali (I-IV). Guzy I i II stopnia charakteryzują się niskim stopniem złośliwienia, a interwencja chirurgiczna w większości przypadków pozwala na całkowite wyleczenie. Z kolei stopień III i IV stanowią naciekające i unaczynione glejaki o wysokim stopniu inwazyjności, a średni czas przeżycia chorych nie przekracza odpowiednio pięciu i dwóch lat od momentu postawienia diagnozy [Brito, 2019; Szala, 2012; Potemski, 2010]. W 2016 roku wprowadzono nową klasyfikację glejaków, uwzględniającą występowanie lub brak mutacji w obrębie genu dehydrogenazy izocytrynianowej *IDH1* i/lub *IDH2* (ang. *isocitrate dehydrogenase*), a także obecność bądź brak kodelecji 1p/19q. Na tej podstawie wyróżniono glejaki oraz gwiaździaki IDH- (bez mutacji) oraz IDH+ (z mutacją), a także skąpodrzewiaki z mutacją IDH+ bądź aberracją 1p/19q. Brak natomiast danych dotyczących klasyfikacji wyściółczaków (Tab.1). Mutacje w obrębie genów *IDH1* i *IDH2* obejmują zazwyczaj substytucję pojedynczych nukleotydów, odpowiednio w 132 lub 172 kodonie. W ponad 80% glejaków II i III stopnia oraz wtórnych glejakach wielopostaciowych (GBM – ang. *glioblastoma multiforme*) obserwuje się tranzycję guaniny na adeninę w genie *IDH1*. Zmiany tego typu bardzo rzadko występują w pierwotnych GBM oraz wyściółczakach. Dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH) jest enzymem zaangażowanym w cykl Krebsa, który katalizuje przekształcenie izocytrynianu do

α -ketoglutaranu. Następstwem nagromadzenia zmutowanej wersji genu *IDH* jest niedobór substratu dla hydroksylaz prolylowych (α -ketoglutaran) oraz wzrost stabilności HIF-1 α (ang. *hypoxia inducible factor 1*) – czynnika wzrostu nowotworów w warunkach niedotlenienia. Odpowiada on za aktywację onkogenów i inaktywację genów supresorowych, zwiększając stopień proliferacji oraz ułatwiając przeżycie i rozprzestrzenianie się komórek w warunkach zmniejszonego dostępu tlenu. Zatem, z klinicznego punktu widzenia, obecność mutacji *IDH* oraz wiążący się z nim spadek stężenia HIF-1 wpływa niekorzystnie na rozrost guza, a rokowania dla chorych, u których je wykryto, są znacznie lepsze w porównaniu do pacjentów, u których mutacje w obrębie tego genu nie występują. Charakterystyczna dla ponad 80% skąpodrzewiaków oraz skąpodrzewiaków anaplastycznych jest kodelecja 1p/19q, polegająca na utracie krótkiego ramienia chromosomu 1 sprzężonej z utratą długiego ramienia chromosomu 9. Abberacja ta wiąże się ze zwiększoną wrażliwością na chemioterapię oraz lepszym rokowaniem dla pacjentów [Louis, 2016; Cohen, 2013; Houillier, 2010; Potemski, 2010; Zhao, 2009].

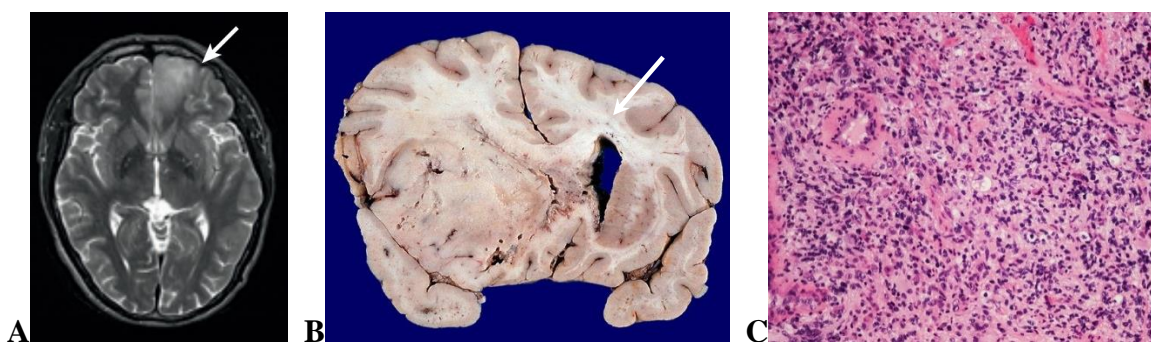
Tabela 1. Klasyfikacja nowotworów pochodzenia glejowego według WHO.

Typ nowotworu	wyściółczak	gwiazdziak	skąpodrzewiak	glejak mieszany
Warianty IDH	brak danych	IDH+ i IDH-	IDH+	IDH+ i IDH-
Kodelecja 1p/19q	brak danych	-	+	-

Ponad 50% wszystkich glejaków stanowi glejak wielopostaciowy, a częstość występowania tego typu guzów wynosi ok. 3,3/100 000 osób. Znacznie mniejszym współczynnikiem zachorowalności cechują się pozostałe gwiazdziaki (0,89/100 000), skąpodrzewiaki (0,36/100 000) oraz wyściółczaki (0,42/100 000). Ogólna częstość występowania glejaków wzrasta wraz z wiekiem. Najniższa jest u dzieci i wynosi 0,15/100 000, podobnie jak u dorosłych w wieku 18-64 lat – 0,41/100 000. Z kolei w grupie wiekowej 65-75 lat oraz 75-84 lata liczba diagnozowanych przypadków jest znacznie wyższa i wynosi odpowiednio 13,1 i 15 (na 100 000 osób). Co ciekawe, zaobserwowano, że glejaki częściej występują u mężczyzn niż u kobiet, co może mieć związek z żeńskimi hormonami płciowymi [Weller, 2015].

1.1.1. Gwiaździak anaplastyczny

Gwiaździak anaplastyczny (AA, łac. *anaplastic astrocytoma*) to nowotwór pochodzenia astrocytarnego, wg WHO klasyfikowany jako III stadium złośliwości. Stanowi około 10% wszystkich glejaków, a jego współczynnik zachorowalności wynosi około 0,47 (na 100 000 osób). Około 25% guzów powstaje *de novo*, podczas gdy pozostałe 75% to skutek transformacji nowotworowej gwiaździaków o niższym stopniu złośliwości. Prognozy dla pacjentów z wykrytym guzem nie są dobre i w znacznej mierze zależą od podłoża genetycznego rozwijającego się nowotworu. Wykazano, że 80% guzów posiada mutacje w genie *IDH* (IDH+), które korzystnie wpływają na dalsze rokowania. Średni wiek pacjentów, u których postawiono diagnozę AA IDH+, wynosi około 36 lat, a czas przeżycia waha się od 9 do 10 lat. Mediana przeżycia chorych na AA typu dzikiego (nie posiadający mutacji, IDH-) jest znacznie niższa i wynosi około 2 lat, a średni wiek osób, u których guz został wykryty, wynosi 52 lata [Molinaro, 2019; Grimm, 2016; Weller, 2015].

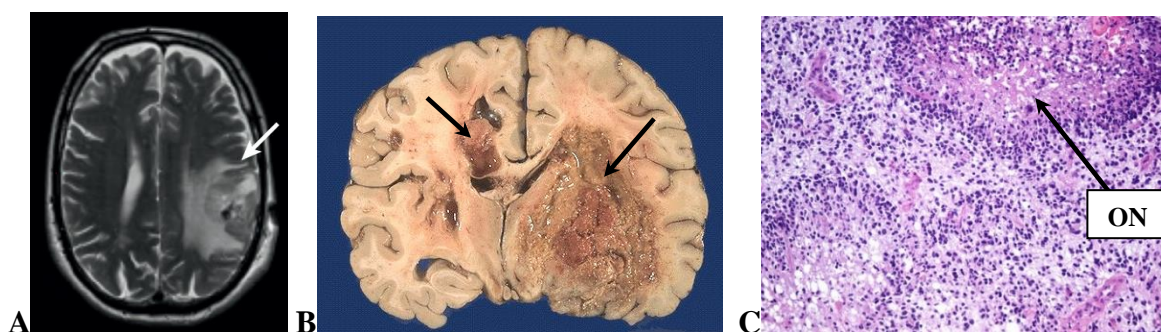


Rycina 1. Gwiaździak anaplastyczny: A- obraz otrzymany techniką MRI T2 (ang. *T2-weighted magnetic resonance imaging*) [zmodyfikowane na podstawie Weller, 2015], B- przekrój poprzeczny mózgu z dużym, słabo zaznaczonym guzem w lewym obszarze czołowo-skroniowym bez rażącej martwicy i ognisk krwotocznych [http1], C- obraz histologiczny AA (10x) otrzymany przez barwienie hematoksyliną–eozyną [http2].

Pod względem histologicznym, AA charakteryzuje się anaplazją oraz bogatokomórkowością. W obrębie guza mogą występować również obszary ubogokomórkowe, jednak z wysokim indeksem mitotycznym (Ryc 1C). W obrazie z magnetycznego rezonansu jądrowego (MRI – ang. *magnetic resonance imaging*) zauważalny jest nieregularny kształt guza oraz brak wyraźniej granicy pomiędzy tkanką prawidłową, a transformowaną (Ryc. 1A-B). Bardzo często centralną część guza stanowi rdzeń nekrotyczny (Ryc 1C), natomiast brak charakterystycznych dla GBM, palisadowych ognisk martwiczych [Caccese, 2020; Grimm, 2016].

1.1.2. Glejak wielopostaciowy

Glejak wielopostaciowy (GBM, łac. *glioblastoma multiforme*) jest najbardziej inwazyjnym oraz najczęściej występującym guzem mózgu (Ryc. 2), który dotyka przede wszystkim osoby pomiędzy 55 a 85 rokiem życia. Mediana przeżycia chorych wynosi zaledwie 16 miesięcy, a jedynie 1-3% pacjentów przeżywa więcej niż 3 lata. GBM może rozwijać się *de novo*, jako guz pierwotny (pierwszorzędowy) bądź poprzez transformację glejaków o niższym stopniu złośliwości, jako GBM wtórny (drugorzędowy). Biorąc pod uwagę obecność mutacji w obrębie genu *IDH*, glejak wielopostaciowy typu dzikiego (*IDH*-) stanowi ponad 90% przypadków i dotyczy głównie osób powyżej 55 roku życia. Najczęściej odpowiada on klinicznie zdefiniowanemu glejakowi pierwotnemu. Znacznie rzadszy (około 10%) mutant *IDH* (*IDH*+) występuje głównie jako guz wtórny u pacjentów poniżej 45 roku życia [Louis, 2016; Bigos, 2014]. Jak udowodniono, GBM *IDH*+ jest bardziej wrażliwy na terapię w porównaniu do typu dzikiego. Mediana czasu przeżycia pacjentów *IDH*- i *IDH*+, u których zastosowano resekcję chirurgiczną i radioterapię, wynosi odpowiednio 10 i 24 miesiące. Dodatkowe zastosowanie chemioterapeutyków wydłuża ten czas do 15 (GBM pierwotny) i 31 miesięcy (GBM wtórny) [Ohgaki, 2013].



Rycina 2. Glejak wielopostaciowy: A- obraz otrzymany techniką MRI T2 [zmodyfikowane na podstawie Weller, 2015], B- przekrój poprzeczny mózgu z widocznym guzem, w obrębie którego znajdują się obszary martwicy i ogniska krwotoczne [http3], C- obraz histologiczny GBM (10x) uzyskany przy pomocy barwienia hematoksyliną–eozyną z widocznym palisadowym układem komórek (zaznaczone strzałką) wokół ognisk nekrotycznych (ON) [http4].

W obrazie histopatologicznym (Ryc. 2C) oba typy GBM są bardzo podobne. Cechują się bogatą komórkowością oraz wysokim wskaźnikiem proliferacji. Dodatkowo w obrazie mikroskopowym obserwowane są palisadowe układy komórek występujące wokół ognisk nekrotycznych. Typowe dla GBM jest również swoiste unaczynienie oraz obecność struktur Scherera, czyli nagromadzenie komórek nowotworowych w pobliżu neuronów oraz naczyń krwionośnych. Taka lokalizacja transformowanych nowotworowo komórek świadczy o ich wysokim potencjale migracyjnym i inwazyjnym [Bigos, 2014].

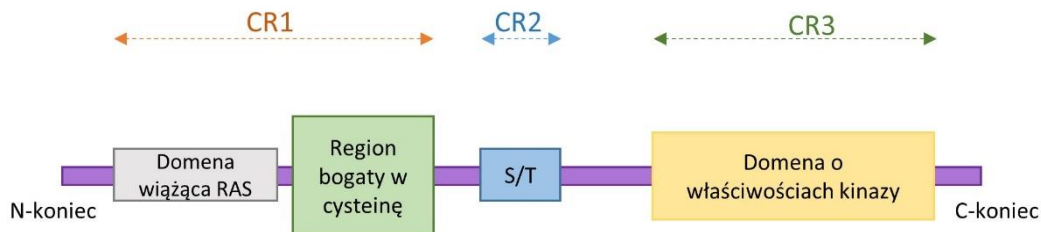
1.2. Molekularne podłoże transformacji glejaków

Transformacja nowotworowa glejaków związana jest z występowaniem mutacji w obrębie genów, których produkty są zaangażowane w przekazywanie sygnału od błony komórkowej do jądra. W glejakach, konsekwencją nieprawidłowej ekspresji tych genów jest aktywacja kluczowych szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za przeżycie komórek: RAS-RAF-MEK-ERK (ang. RAS – *Ras protein*, RAF – *rapidly accelerated fibrosarcoma*, MEK – *mitogen activated protein kinase*, ERK – *extracellular signal-regulated kinase*) i PI3K-AKT/PKB-mTOR (ang. PI3K – *phosphoinositide 3-kinase*, AKT/PKB – *protein kinase B*, mTOR – *mammalian target of rapamycin kinase*) oraz inaktywacja szlaków kontrolowanych przez białka: RB (ang. *retinoblastoma*) i P53 (ang. *tumor protein 53*).

1.2.1. Szlak RAS-RAF-MEK-ERK

RAS-RAF-MEK-ERK to wewnątrzkomórkowy szlak transdukcji sygnału, który odpowiada za regulację proliferacji, przeżycia i różnicowania komórek. W przypadku nowotworów, bardzo często obserwowane są aberracje występujące w obrębie genów kodujących te białka, które skutkują nadmierną aktywacją szlaku oraz niekontrolowanym wzrostem guza.

Pierwszym elementem wspomnianego szlaku jest białko RAS. Proteina w kompleksie z trifosforanem guanozyny (GTP) przyjmuje aktywną konformację, umożliwiającą wiązanie i aktywację efektorów niższego rzędu, np. RAF. Mutacje w genie *RAS* występują w ponad 30% wszystkich nowotworów, jednak sporadyczne w GBM (2%). Co ciekawe, mimo braku zmian w obrębie genu, w ponad 50% glejaków obserwuje się znaczący wzrost poziomu białka RAS [Degirmenci, 2020; Nakada, 2011; Jeuken, 2007].



Rycina 3. Struktura kinazy RAF [opracowanie własne]; S/T – region bogaty w serynę i treoninę; CR1- region zawierający domenę wiążącą RAS; CR2 - region bogaty w serynę i treoninę; CR3 – region o właściwościach kinazy.

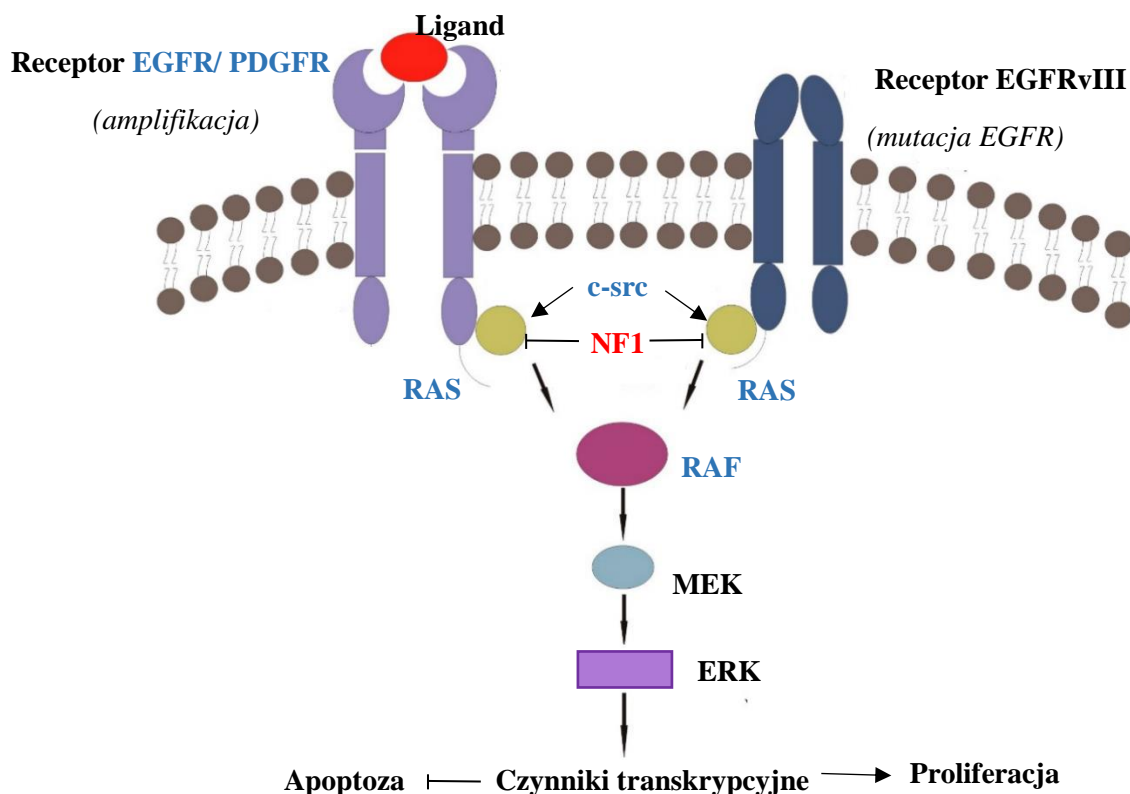
Efektorem aktywnego białka RAS jest serynowo-treoninowa kinaza RAF. Może ona występować w trzech izoformach: ARAF, BRAF i CRAF, przy czym to BRAF odgrywa

największe znaczenie w onkogenezie. Wszystkie warianty białka w swojej budowie posiadają trzy konserwatywne regiony: CR1 – zawiera domenę wiążącą RAS; CR2 - jest bogaty w serynę i treoninę oraz CR3 – posiada właściwości kinazy (Ryc. 3). Mutacje w obrębie genu *RAF*, podobnie jak *RAS*, rzadko występują w przypadku złośliwych glejaków [Degirmenci, 2020, Nakada, 2011].

Aktywne *RAF* fosforyluje reszty serynowe kinazy *MEK* w pozycjach 217 i 221. Białko *MEK*, będące kinazą o podwójnej specyficzności, ma zdolność do fosforylacji zarówno tyrozyny, jak i treoniny kinazy *ERK*, odpowiednio w pozycjach 185 i 183. Aktywowane w ten sposób białko przemieszcza się do jądra i aktywuje czynniki transkrypcyjne, pobudzające cykl komórkowy oraz hamujące apoptozę. Nadmierna transmisja tego sygnału prowadzi do transformacji komórek i oporności na indukcję zaprogramowanej śmierci [Nakada, 2011].

Ze względu na sporadyczne mutacje w obrębie genów *RAS*, *RAF* i *MEK*, nadmierne przekazywanie sygnału przeżycia poprzez szlak *RAS-RAF-MEK-ERK* występujące w glejakach, przypisywane jest nadekspresji genów kodujących receptory *EGFR* (ang. *endothelial growth factor receptor*) i *PDGFR* (ang. *platelet-derived growth factor receptor*), których pobudzenie prowadzi do aktywacji związanych z nimi białek *RAS*. U ponad połowy pacjentów z *GBM* występują nieprawidłowości w obrębie genu *EGFR* w postaci jego amplifikacji bądź mutacji *EGFRvIII* (wariant III mutacji *EGFR*), prowadzącej do sygnalizacji niezależnej od liganda (Ryc. 4). Znacznie rzadziej (ok 15%) występuje amplifikacja receptora czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego alfa (*PDGFR α*). Alternatywny mechanizm aktywacji białka *RAS* zachodzi z udziałem kinazy *c-src* (ang. *cellular proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase*), której zwiększony poziom również obserwowany jest w *GBM* [Nakada, 2011].

W glejakach niekiedy dochodzi też do unieczynnienia genu supresorowego *NF1*, kodującego białko *NF1* (ang. *neurofibromin 1*). Odpowiada ono za inaktywację białka *RAS*, a brak jego funkcjonalności powoduje niekontrolowaną proliferację [Nakada, 2011].



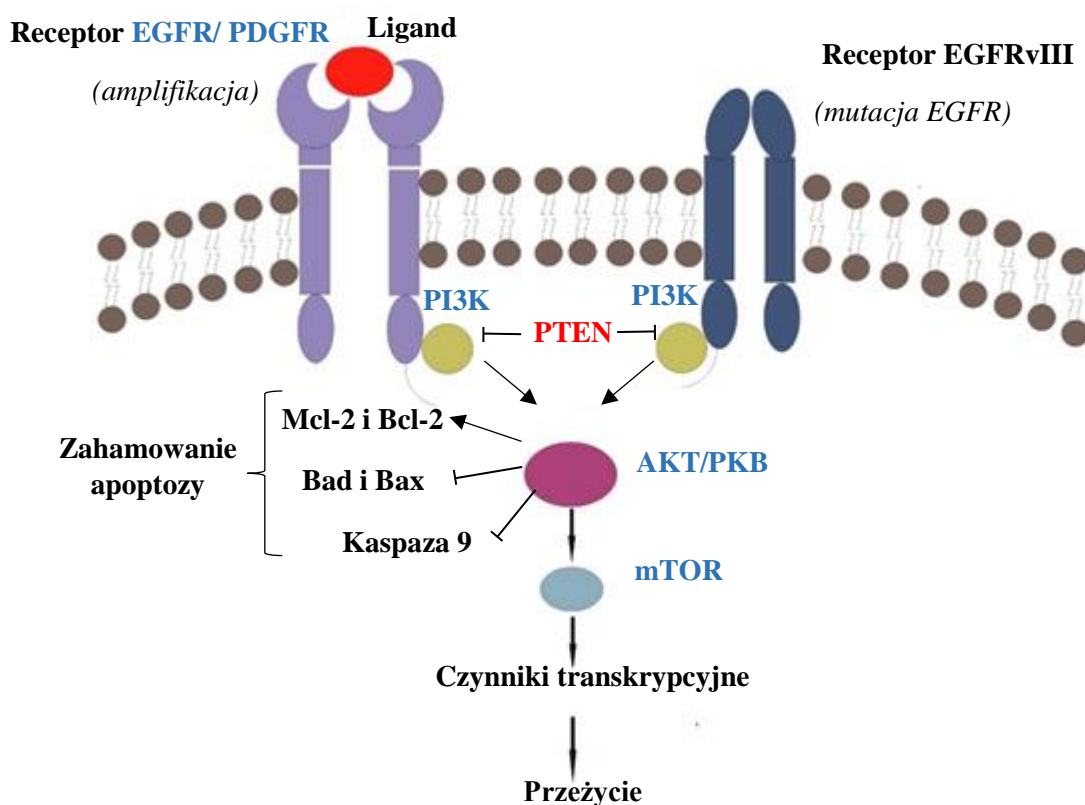
Rycina 4. Uproszczony schemat transmisji sygnału za pomocą szlaku RAS-RAF-MEK-ERK w glejakiach i jego regulatory [opracowanie własne]. Nadmierne pobudzenie szlaku związane jest z amplifikacją genów EGFR bądź PDGFR oraz obecnością mutacji EGFRvIII, prowadzącą do sygnalizacji niezależnej od obecności liganda. W odpowiedzi na sygnał z tych receptorów bądź poprzez kinazę c-src dochodzi do aktywacji białka RAS, które aktywuje kinazę serynowo-treoninową RAF. Ta z kolei fosforyluje kinazę MEK, odpowiedzialną za przyłączenie reszty fosforanowej w obrębie ERK. Aktywowane ERK przemieszcza się do jądra, aktywując czynniki transkrypcyjne zaangażowane w cykl komórkowy i hamowanie apoptozy. Kolorem niebieskim zaznaczono zwiększony, a czerwonym zmniejszony poziom białek w komórkach glejaków.

1.2.2. Szlak PI3K-AKT/PKB-mTOR

PI3K-AKT/PKB-mTOR to kolejny szlak przeżycia, którego pobudzenie obserwowane jest w niemal 90% gliomów (Ryc. 5).

Pierwszym elementem tego szlaku jest kinaza lipidowa PI3K, zaangażowana w proliferację, różnicowanie, migrację, metabolizm i przeżycie komórek. Rodzina PI3K obejmuje trzy klasy (I, II i III), w której każda zbudowana jest z podjednostki katalitycznej oraz regulatorowej. Kinazy klasy I mogą być aktywowane przez sygnały receptorów związanych z kinazami tyrozynowymi (klasa IA) bądź białkami G (klasa IB). Aktywne PI3K klasy I katalizują przekształcanie 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₂) w 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytydu (PIP₃) – cząstkę sygnałową rekrutującą do błony szeroką gamę białek sygnałowych. Aktywności tej nie mają pozostałe dwie klasy PI3K (II i III). Ilość

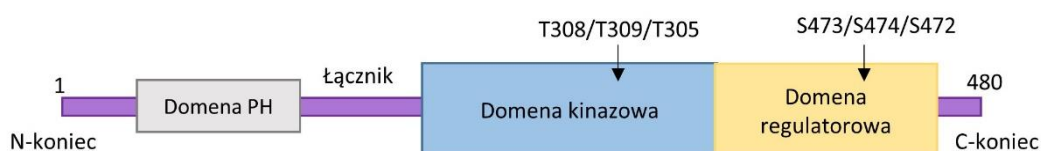
PIP3 w błonie komórkowej jest regulowana m.in. przez fosfatazę PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*). Białko to katalizuje reakcję odłączania grupy 3'-fosforanowej od 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu i tym samym hamuje przekazywanie sygnału przeżycia poprzez szlak PI3K-AKT/PKB-mTOR. Utrata funkcji PTEN w wyniku delecji genu lub mutacji w jego obrębie obserwowana jest u ok. 40% chorych na GBM i prowadzi do konstytutywnej aktywacji wspomnianego szlaku, co sugeruje supresorowy charakter tej fosfatazy.



Rycina 5. Uproszczony schemat transmisji sygnału za pomocą szlaku PI3K-AKT/PKB-mTOR w glejakiach i jego regulatory [opracowanie własne]. W odpowiedzi na sygnał z receptorów EGFR bądź PDGFR dochodzi do aktywacji kinazy PI3K, która fosforyluje serynowo-treoninową kinazę AKT. Proteina, poprzez interakcje z białkami zaangażowanymi w przebieg apoptozy, hamuje ten proces a także odpowiada za fosforylację mTOR. W konsekwencji dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za przeżycie. Negatywnym regulatorem PI3K jest fosfataza PTEN, której zmniejszony poziom obserwowany jest w glejakiach. Kolorem niebieskim zaznaczono zwiększony, a czerwonym zmniejszony poziom białek w komórkach glejaków.

Głównym efektem PI3K jest kinaza serynowo – treoninowa AKT (PKB), odpowiedzialna za fosforylację wielu białek zaangażowanych w podstawowe procesy komórkowe. U ssaków występują trzy izoformy AKT/PKB: AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β)

i AKT3 (PKB γ), w strukturze których wyróżniono trzy domeny: N-terminalną domenę PH (ang. *pleckstrin homology domain*), centralną domenę kinazową oraz C-terminalną domenę regulatorową (Ryc. 6). Aktywność kinazy zapewnia fosforylacja treoniny (T308 (AKT1), T309 (AKT2) bądź T305 (AKT3)) i seryny (S473 (AKT1), S474 (AKT2) bądź S472 (AKT3)), zachodząca z udziałem PDK1 (ang. *phosphoinositide-dependent kinase 1*) zależnej od PIP3. Zwiększona aktywność AKT/PKB, bądź amplifikacja genu kodującego to białko, obserwowana jest w około 80% glejaków. Skutkuje to opornością komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci. Kinaza AKT ma bowiem zdolność do hamowania apoptozy, oddziałując z białkami zaangażowanymi w regulację tego procesu. Fosforylując proapoptotyczne białko Bad (ang. *Bcl-2-associated death promoter*) uniemożliwia jego wiązanie z Bcl-XL (ang. *B-cell lymphoma-extra large*) i tym samym blokuje uwalnianie cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy. Innym białkiem z rodziny Bcl-2, którego aktywność również jest hamowana przez AKT/PKB jest białko Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*), zwiększające przepuszczalność błony komórkowej. Kolejnym celem kinazy, zaangażowanym w proces apoptozy, jest kaspaza 9. Nieprawidłowa fosforylacja nieaktywnej prokaspazy 9 hamuje jej proteolityczne dojrzewanie, uniemożliwiając tym samym jej aktywację i pobudzenie kaspaz efektorowych. Co ciekawe, AKT/PKB zwiększa również ekspresję genów kodujących białka antyapoptotyczne: Mcl-1 (ang. *induced myeloid leukemia cell differentiation protein*) i Bcl-2 [Krześlak, 2010; Jakubowicz-Gil, 2009; Cheng, 2008].



Rycina 6. Struktura AKT. W domenie katalitycznej i regulatorowej zaznaczono reszty treoniny i seryny, których fosforylacja jest konieczna do aktywacji izoform AKT: AKT1 – T308 i S473, AKT2 – T309, S474, AKT3 – T305 i S472 [opracowanie własne].

Efektorem białka AKT/PKB jest również serynowo-treoninowa kinaza mTOR, która występuje w dwóch funkcjonalnie odrębnych formach, jako mTORC1 (ang. *mammalian target of rapamycin complex 1*) i mTORC2 (ang. *mammalian target of rapamycin complex 2*). Pierwsza z nich umożliwia translację białek kluczowych dla proliferacji i przeżycia, druga zaś, poprzez regulację funkcji cytoszkieletu, wpływa na migrację komórek nowotworowych [Saxton, 2017].

Podobnie jak w przypadku szlaku RAS-RAF-MEK-ERK, nadmierna aktywność szlaku PI3K-AKT/PKB-mTOR związana jest również z nadekspresją genów kodujących receptory EGFR i PDGFR, a także konstytutywnym pobudzeniem receptorów EGFRvIII [Nakada, 2011].

1.3. Metody terapeutyczne

Głównym celem terapii u chorych z rozpoznaniem gwiaździakiem anaplastycznym bądź glejakiem wielopostaciowym jest przedłużenie oraz poprawa jakości życia. Aktualnie, obok resekcji chirurgicznej stosowana jest radio- i chemioterapia jako podstawowe metody leczenia.

1.3.1. Leczenie operacyjne

Początkowym postępowaniem stosowanym w leczeniu glejaków jest zabieg chirurgiczny. Jego przebieg zależy od wielu czynników, m.in.: wieku i stanu ogólnego pacjenta, a także, w przypadku choroby nawrotowej, czasu od ostatniej operacji. Jednak największe znaczenie ma umiejscowienie i wielkość guza oraz jego odległość od ważnych czynnościowo struktur mózgu. Ze względu na wyjątkowo naciekający charakter gwiaździaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego makroskopowe usunięcie tkanki nowotworowej jest praktycznie niemożliwe. Dlatego leczenie operacyjne ma na celu maksymalne usunięcie guza, które nie doprowadzi do deficytu neurologicznego. Mediana przeżycia chorych, u których zastosowano wyłącznie leczenie chirurgiczne w postaci maksymalnie radykalnego wycięcia guza wynosi około 13 miesięcy, podczas gdy średni czas przeżycia pacjentów, u których usunięto jedynie części guza wynosi 9 miesięcy. Obok redukcji wielkości tkanki nowotworowej, głównym celem leczenia chirurgicznego jest pozyskanie materiału do badania histopatologicznego, które umożliwi określenie typu nowotworu oraz zaplanowanie dalszych strategii terapeutycznych. W przypadku guzów nieoperacyjnych jedynym sposobem na określenie rodzaju nowotworu jest biopsja otwarta lub stereotaktyczna [Grimm, 2016; Bigos, 2014; Stupp, 2007].

Skuteczność leczenia chirurgicznego w przypadku AA i GBM nie jest wysoka, dlatego w leczeniu pooperacyjnym stosowana jest radio- i chemioterapia.

1.3.2. Radioterapia

Radioterapia jest standardową metodą leczenia pooperacyjnego, stosowaną w przypadku rozpoznania nowotworu anaplastycznego. Rodzaj wykorzystanej metody radioterapeutycznej zależy od stanu neurologicznego pacjenta i jego rokowań, a także od rozległości zastosowanego uprzednio zabiegu chirurgicznego. Aktualnie na szeroką skalę stosowany jest schemat radioterapii frakcjonowanej, zakładającej podanie łącznej dawki 60 Gy w ciągu 30 – 33 seansów napromieniania. Wykazano bowiem, że taki model leczenia maksymalnie wydłuża życie pacjenta. Mediana przeżycia chorych, u których zastosowano dawki w zakresie 51 – 60 Gy, to około 42 tygodnie, podczas gdy dla 50 Gy wynosi ona 28 tygodni. Napromieniowanie wyższymi dawkami nie wykazuje istotnych różnic [Balloni, 2019; Bigos, 2014; Stupp, 2007].

W przypadku guzów o średnicy nie przekraczającej 3,5 – 5 cm stosowane jest leczenie stereotaktyczne bądź brachyterapia śródtkankowa. Metody te polegają na naświetlaniu wysoką dawką promieniowania małego obszaru guza w krótkim czasie. Wykorzystywane dawki prowadzą do całkowitego zniszczenia struktur w napromieniowanym obszarze, dlatego do zabiegu rekrutowane są tkanki o małej zawartości komórek prawidłowych. Przykładem może być radiochirurgia stereotaktyczna, polegająca na jednorazowym podaniu dawki 15 – 16 Gy (na objętość guza około 10 ml) oraz stereotaktyczna frakcjonowana radioterapia, gdzie dawka całkowita wynosi 36 – 50 Gy i jest podawana we frakcjach 3,5 – 5 Gy (na objętość guza 14 – 15 ml). Brachyterapia z kolei pozwala na równomierny rozkład promieniowania w małej objętości (maksymalna średnica guza to około 5 cm), który możliwy jest dzięki wprowadzeniu do guza bądź łożu pooperacyjnej izotopów promieniotwórczych. Dawka podana w ciągu 5 dni odpowiada, trwającej około 6 tygodni, radioterapii frakcjonowanej. Aktualnie stosowana jest w leczeniu paliatywnym w skojarzeniu z hipotermią [Balloni, 2019; Bigos, 2014; Stupp, 2007].

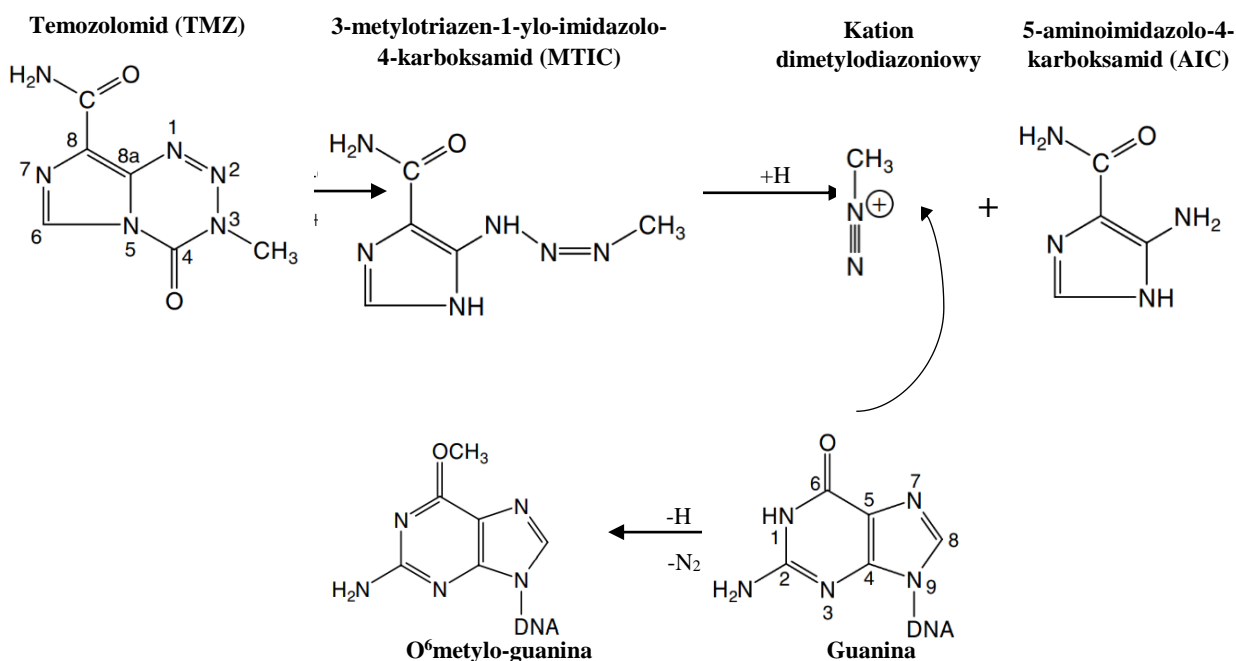
1.3.3. Chemioterapia

Chemioterapia, obok radioterapii, jest głównym narzędziem stosowanym w leczeniu pooperacyjnym pacjentów chorych na gwiaździaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego. Ma na celu usunięcie ewentualnych mikroprzerzutów oraz ochronę przed nawrotem choroby, a także poprawę jakości życia u osób leczonych paliatywnie. W przypadku glejaków, zastosowanie klasycznej chemioterapii ma ograniczone możliwości ze względu na konieczność przejścia stosowanych preparatów przez barierę krew-mózg. Dodatkowo guzy o wyższym stopniu złośliwości charakteryzują się niską chemiowrażliwością pierwotną oraz wysoką opornością na stosowane formy leczenia. U podłoża tego zjawiska leży wiele mechanizmów, związanych m. in. z hamowaniem procesu apoptozy, aktywacją mechanizmów naprawy DNA czy też nadmierną aktywacją procesów detoksykacji ksenobiotyków. Jednak w zdecydowanej większości, zjawisko oporności związane jest z wzmożoną ekspresją białek z rodziny ABC (ang. *ATP-binding cassette transporter*), które działając jako eksportery, uniemożliwiają osiągnięcie stężenia terapeutycznego w komórkach nowotworowych. Wnikanie cytostatyków do mózgu może być również utrudnione przez nieprawidłowy rozwój naczyń włosowatych w obrębie guza. Obecnie, ze względu na małą masę cząsteczkową i lipofilny charakter, zastosowanie w leczeniu glejaków III^o i IV^o stopnia złośliwości, znalazły pochodne nitrozomocznika: karmustyna (BCNU), lomustyna (CCNU), nimustyna (ACNU), prokarbazyna (PCB) i temozolamid (TMZ). Spośród nich najskuteczniejszy i najczęściej stosowany jest ten ostatni [Davis, 2016; Taal, 2015; Fijuth, 2013; Stupp, 2007].

1.3.3.1. Temozolamid

Temozolamid (8-karbomoilo-3-metyloimidazo [5,1-d]-1,2,3,5-tetrazyn-4(3H)-on; TMZ) jest związkiem o najlepiej udokumentowanej skuteczności w stosunku do wysokozłośliwych glejaków pochodzenia astrocytarnego. Jest doustnym prolekiem o blisko 100% biodostępności, który w fizjologicznym pH hydroлізуje do formy pośredniej 3-metylotriazen-1-ylo-imidazolo-4-karboksamidu (MTIC). Ten z kolei ulega rozpadowi do kationu dimetylodiazoniowego, będącego właściwym lekiem przeciwnowotworowym oraz produktu ubocznego – AIC (5-aminoimidazolo-4-karboksamid). Terapeutyczne działanie temozolomidu opiera się na metylacji atomu tlenu znajdującego się w pozycji C-6 guaniny. Obecność O⁶metylo-guaniny prowadzi do tranzycji pary guanina-cytozyna na

metyloguanina-tymina, co skutkuje zablokowaniem cyku komórkowego w fazie G2/M (Ryc. 7) [Darkes, 2002].



Rycina 7. Schemat hydrolizy temozolomidu do formy aktywnej (kationu dimetylodiazoniowego) i tworzenie O⁶metylo-guaniny [opracowanie własne].

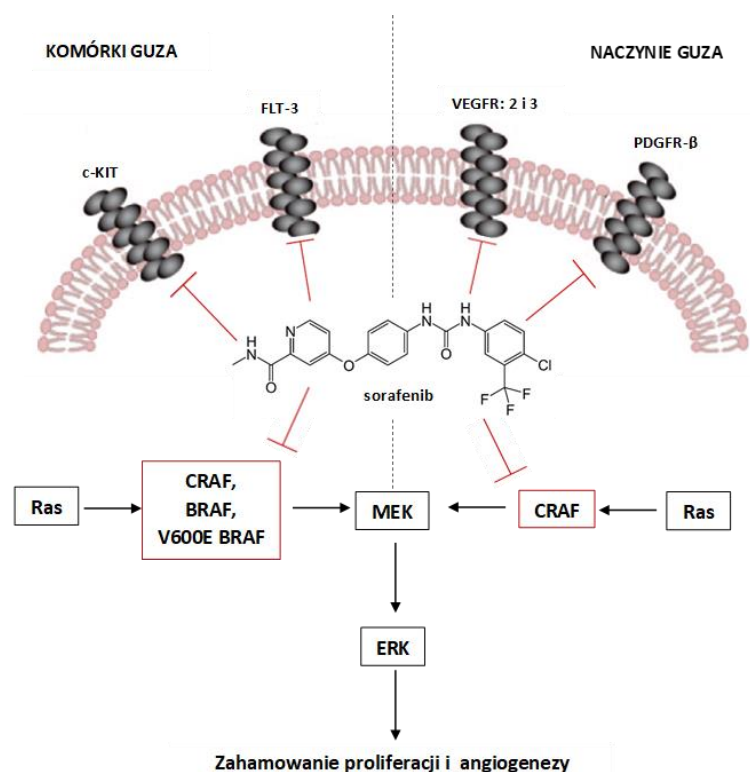
Aktualnie temozolomid stosowany jest w dawce 75 mg/m² na dobę w leczeniu skojarzonym z celowaną radioterapią (60 Gy podawane w 30 dawkach). Po zakończeniu terapii wprowadzane jest leczenie uzupełniające z wykorzystaniem TMZ, obejmujące 6 cykli dawką 150 – 200 mg/m². Udowodniono, że taki schemat postępowania korzystnie wpływa na czas przeżycia pacjentów, u których zdiagnozowano GBM. Odsetek dwuletniego przeżycia chorych, u których zastosowano wyłącznie radioterapię bądź terapię skojarzoną z TMZ wynosi odpowiednio 10% i 26%. Co ciekawe, leczenie temozolomidem jest bardziej skuteczne u pacjentów, u których występuje metylacja promotora genu *MGMT* (ang. *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*), kodującego metylotransferazę metyloguaniny, odpowiedzialną za mechanizmy naprawy DNA [Bigos, 2014; Fijuth, 2013].

1.3.4. Nowe strategie terapeutyczne

Leczenie glejaków jest bardzo trudne zarówno ze względu na samą lokalizację guzów i naciekający charakter, jak i z powodu wysokiej oporności na stosowane formy leczenia. Dlatego poszukiwane są wciąż nowe związki, które umożliwiłyby skuteczniejsze eliminowanie komórek glejaków. Duże nadzieje wiąże się z inhibitorami wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału, takimi jak: RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR, których nadmierna aktywność obserwowana jest w glejakach. Należą do nich sorafenib (inhibitor kinazy RAF) oraz syntetyczna pochodna naturalnego flawonoidu kwercetyny – LY294002 (inhibitor kinazy PI3K).

1.3.4.1. Sorafenib

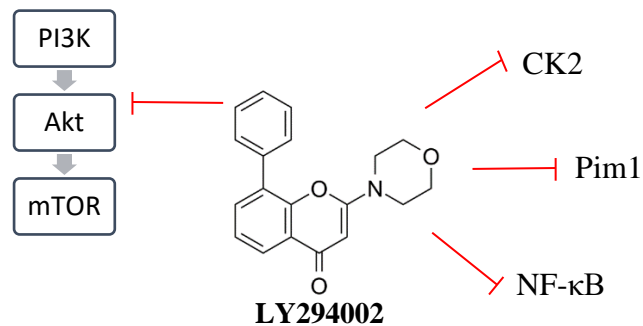
Sorafenib (BAY43-9006, Nexavar) jest stosowany w leczeniu nieoperacyjnego raka wątrobowokomórkowego i zaawansowanego raka nerkowokomórkowego. Związek ten posiada właściwości antyproliferacyjne oraz przeciwingiogenne, a jego działanie opiera się na hamowaniu wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału RAS-RAF-MEK-ERK. Lek jest inhibitorem serynowowo-treoninowych kinaz RAF (CRAF, BRAF, V600E BRAF) oraz receptorowych kinaz tyrozynowych: c-KIT (ang. *stem cell factor receptor*) i FLT-3 (ang. *fms-related tyrosine kinase receptor 3*), występujących w obrębie komórek nowotworowych. Co ciekawe, hamuje również aktywność kinazy CRAF oraz receptorów: VEGFR-2, VEGFR-3 (ang. VEGFR- *vascular endothelial growth factor receptor*) i PDGFR- β (ang. *platelet-derived growth factor receptor- β*) zlokalizowanych w ścianach naczyń krwionośnych guza (Ryc. 8) [Lacouture, 2008; Wilhelm, 2008]. W konsekwencji blokowany jest rozwój naczyń krwionośnych a komórki nowotworowe wprowadzane są na drogę zaprogramowanej śmierci. Prowadzi to do zahamowania wzrostu guza oraz wydłużenia czasu przeżycia. Wspomniane właściwości skłoniły naukowców i lekarzy do wykorzystania sorafenibu w terapii glejaków. Jak wynika z przeprowadzonych badań I fazy klinicznej, monoterapia sorafenibem nawracających glejaków o wysokim stopniu złośliwości wydłuża czas wolny od progresji do około 3 miesięcy. Co więcej, wpływa również na długość całkowitego przeżycia chorych na GBM oraz AA od momentu rozpoczęcia leczenia sorafenibem i wynosi odpowiednio 6 i 10 miesięcy [Hassler, 2014; Siegelin, 2010].



Rycina 8. Schemat działania sorafenibu [opracowanie własne na podstawie: Lacouture, 2008; Wilhelm, 2008].

1.3.4.2. LY294002

LY294002 (2-4-morfolinylo-8-fenlochromon) jest morfolinową pochodną kwercetyny, będącą inhibitorem szlaku PI3K-AKT/PKB-mTOR (Ryc. 9). Mechanizm działania przeciwnowotworowego związku opiera się na hamowaniu aktywności kinazy PI3K, co prowadzi do defosforylacji kinazy AKT oraz zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₀. Wykazano, że związek ten hamuje również aktywność innych kinaz białkowych, takich jak CK2 (ang. *casein kinase II*) i PIM1 (ang. *Pim-1 proto-oncogene*), których podwyższony poziom obserwowany jest w wielu typach nowotworów. Białka te działają jako supresory apoptozy oraz promotory przeżywalności, dlatego zastosowanie inhibitorów tych enzymów może znacząco zwiększyć skuteczność leczenia przeciwnowotworowego. Co więcej, LY294002 jest bezpośrednio zaangażowany w hamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-κB, biorącego udział w regulacji apoptozy, cyklu komórkowego i proliferacji [Avni, 2012; Jiang, 2010; Gharbi, 2007].



Rycina 9. Schemat aktywności przeciwnowotworowej LY294002 [na podstawie Avni, 2012; Jiang, 2010].

Badania *in vitro* wykazały, że LY294002 posiada właściwości antyproliferacyjne oraz proapoptotyczne w stosunku do komórek glejaka (linie U-87, U251, U373-MG). Co ciekawe, zaobserwowano, że związek ten stosowany w terapii skojarzonej z temozolomidem, znacząco nasila cytotoksyczność chemioterapeutyku [Haas, 2018; Chen, 2012].

2. Programowana śmierć komórki

Śmierć komórki, obok proliferacji, jest podstawowym procesem umożliwiającym utrzymanie homeostazy. Obejmuje ona dwa szeroko zdefiniowane mechanizmy: zaprogramowaną śmierć komórki (PCD – ang. *programmed cell death*) oraz nieprogramowaną śmierć (martwicę). Podczas gdy nekroza jest zjawiskiem biernym, PCD jest genetycznie zaprogramowanym procesem, inicjowanym w odpowiedzi na określony sygnał, ściśle kontrolowany przez złożone, wewnątrzkomórkowe mechanizmy regulacyjne. Wyróżnia się wiele typów zaprogramowanej śmierci, jednak najdokładniej poznany został jej I typ, czyli apoptoza oraz typ II, czyli autofagia [Jan, 2019; Mishra, 2018].

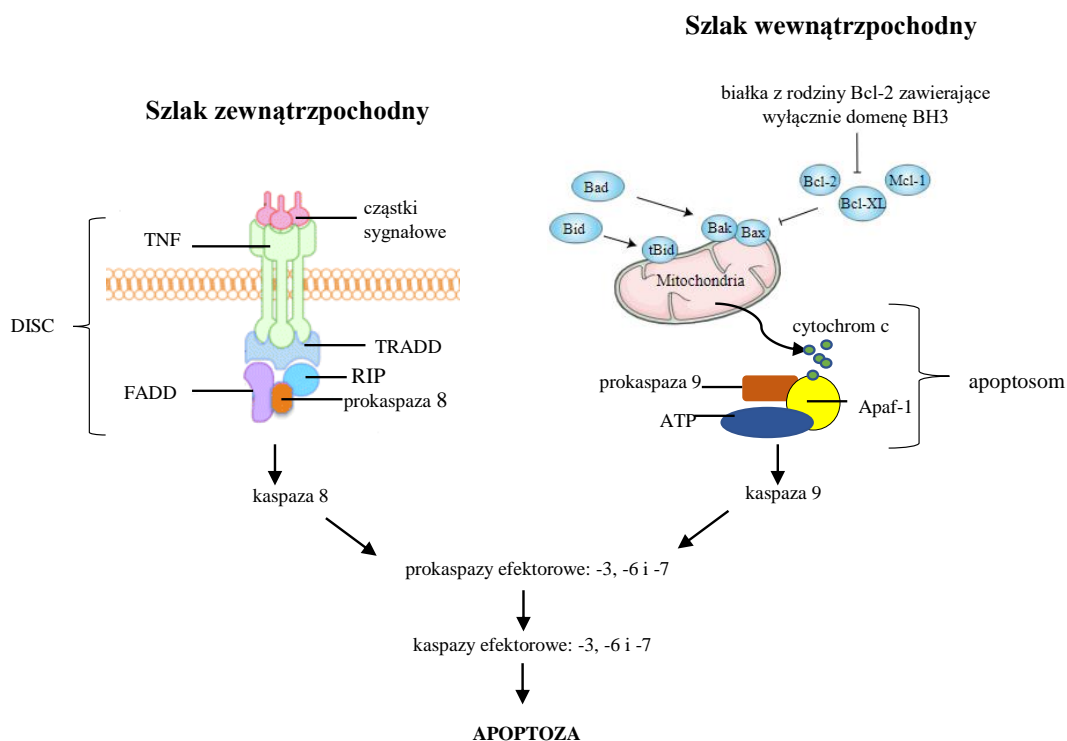
Indukcja zaprogramowanej śmierci w komórkach nowotworowych ma fundamentalne znaczenie w terapii przeciwnowotworowej.

2.1. Apoptoza

Apoptoza (z gr. *apo* – oddzielony, *ptosis* – opadanie liści) jest ściśle regulowanym mechanizmem, pozwalającym na eliminację zbędnych bądź uszkodzonych komórek, w tym również tych, które uległy transformacji nowotworowej. Indukcja apoptozy w takim przypadku ma ogromne znaczenie w hamowaniu zarówno wzrostu guza, jak i tworzeniu przez niego przerzutów. W zależności od rodzaju bodźców inicjujących proces wyróżnia się szlak zewnętrzny (receptorowy) oraz wewnętrzny (mitochondrialny) (Ryc. 10). Niezależnie od ścieżki, jaką przebiega apoptoza, obejmuje ona trzy etapy: indukcyjny, wykonawczy i degradacji [Jan, 2019; Mishra, 2018].

Etap indukcyjny, czyli inicjacja procesu apoptozy związana jest z aktywacją charakterystycznych dla niej enzymów – kaspaz. Są to proteazy cysteinowe dokonujące cięcia proteolitycznego białek w pobliżu reszt kwasu asparaginowego. Enzymy te w zależności od etapu apoptozy, na którym są aktywowane zostały podzielone na kaspazy inicjatorowe/indukujące (kaspazy 8 i 9) oraz wykonawcze/efektorowe (kaspazy 3, 6 i 7). W żywych komórkach proteazy występują najczęściej w formie nieaktywnych zymogenów, w strukturze których wyróżnia się małą podjednostkę C-końcową połączoną za pomocą łącznika z dużą podjednostką p20, a także prodomenę N-końcową. Aktywacja kaspaz efektorowych zachodzi pod wpływem sygnału inicjującego, który odbierany jest przez kaspazy inicjatorowe. Enzymy te w komórce występują w formie monomerów, a ich aktywacja możliwa jest dzięki dimeryzacji, odcięciu prodomeny N-końcowej i proteolizie łącznika. Ich substratami są prokaspazy efektorowe, których aktywacja zachodzi pod

wpływem cięcia proteolitycznego w części N-terminalnej, czego konsekwencją jest utworzenie heterodimeru, a następnie funkcjonalnego heterotetrameru [Pfeffer, 2018; Paduch, 2015].



Rycina 10. Przebieg procesu apoptozy szlakiem zewnętrz pochodnym i wewnętrzz pochodnym [opracowanie własne]. Szczegółowy opis w tekście rozprawy (Rozdział 2.1. Apoptoza).

Czynnikami indukującymi apoptozę przebiegającą drogą zewnętrz pochodną są niedobory czynników wzrostowych i substancji odżywczych, a także lokalnie podwyższony poziom hormonów i cytokin. Szlak ten aktywowany jest również przez czynniki fizyczne, takie jak promieniowanie jonizujące i temperatura, a także chemiczne, np. cytostatyki stosowane w trakcie chemioterapii. Wspomniane czynniki indukujące powodują pobudzenie błonowych receptorów śmierci (TNF – ang. *tumor necrosis factor*), wśród których wyróżniamy: TRAIL-R1 i TRAIL-R2 (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand-R1* i *R2*), TNF-R1 i TNF-R2 (ang. *tumor necrosis factor receptor 1* i *2*) oraz Fas (inaczej Apo1 (ang. *apoptosis antigen 1*) lub CD95 (ang. *cluster of differentiation 95*)). Wszystkie rodzaje TNF posiadają dwie funkcjonalnie odmienne domeny: zewnątrzkomórkową i wewnątrzkomórkową, nazywaną również domeną śmierci (DD- ang. *death domain*). Pierwsza z nich odpowiada za przyłączenie liganda do receptora, druga zaś wiąże białka cytoplazmatyczne: FADD (ang. *Fas-associated death domain protein*) oraz TRADD (ang. *TNFR1-associated death domain*). W obrębie FADD znajduje się efektorowa domena

śmierci (DED, ang. *death effector domain*), która umożliwia związaną prokaspazy 8. Dodatkowe przyłączenie białka RIP (ang. *receptor interacting protein*) powoduje powstanie kompleksu zapoczątkowującego śmierć komórki – DISC (ang. *death-inducing signaling complex*), prowadzącego do aktywacji kaspazy 8 [Jan, 2019; Mishra, 2018; Paduch, 2015].

Czynniki indukujące apoptozę przebiegającą z udziałem receptorów mogą również indukować mitochondrialny szlak apoptozy. Dodatkowo, ta ścieżka apoptozy uruchamiana jest przez podwyższone stężenie jonów Ca^{2+} oraz reaktywnych form tlenu. Inicjatorami procesu są również patogeny (wirusy, bakterie) oraz uszkodzenia DNA, w tym również te wywoływane przez cytostatyki. Wymienione czynniki powodują otwarcie megakanałów (PTP – ang. *permeability transition pore*), zlokalizowanych na styku wewnętrznej oraz zewnętrznej błony mitochondrium. W konsekwencji dochodzi do obniżenia potencjału transbłonowego i uwolnienia z mitochondrium cytochromu c oraz czynnika AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) do cytoplazmy. Tam cytochrom c łączy się z czynnikiem Apaf-1 (ang. *apoptosis protease-activating factor 1*). Proces ten wymaga nakładu energii i prowadzi do odsłonięcia domeny CARD (ang. *caspase recruitment domain*) Apaf-1, do której wiąże się prokaspaza 9. Tak utworzony kompleks, nazywany apoptosomem, umożliwia aktywację kaspazy 9 [Jan, 2019; Mishra, 2018; Paduch, 2015].

W regulacji mitochondrialnej ścieżki apoptozy kluczową rolę pełnią białka z rodziny Bcl-2. Ich cechą charakterystyczną jest obecność homologicznych domen BH (ang. *homology domain*): BH1, BH2, BH3 i BH4. Ze względu na budowę oraz pełnione funkcje białka Bcl-2 podzielono na trzy klasy:

- białka antyapoptotyczne, posiadające wszystkie domeny (Bcl-2, Bcl-XL, A1, Mcl-1),
- białka proapoptotyczne, zawierające domeny BH1, BH2 i BH3 (Bax, Bag, Bcl-XS, Bock),
- czynniki hamujące aktywność wspomnianych białek (Bid, Bim, PUMA, Noxa), zawierające wyłącznie domenę BH3.

Białka proapoptotyczne biorą udział w tworzeniu megakanałów, podczas gdy białka antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-XL) tworzą z PTP heterodimery, hamując tym samym uwalnianie cytochromu c. Co więcej, białka Bcl-2 i Bcl-XL w połączeniu z czynnikiem Apaf-1 hamują powstawanie apoptosomu. Właściwości antyapoptotyczne wspomnianych białek mogą być regulowane przez białka Bid, Bad i Bik, które to unieczynnijają kompleks Bcl-2/Bcl-XL [Kale, 2018; Paduch, 2015].

Następująca po etapie indukcji, faza wykonawcza jest wspólna dla obu szlaków apoptozy i polega na uruchomieniu kaskady kaspaz efektorowych (3, 6 i 7), degradujących zarówno białka strukturalne, jak i enzymatyczne [Pfeffer, 2018; Reed, 2000].

Faza degradacji obejmuje pojawienie się na powierzchni komórki ciałek apoptotycznych, będących fragmentami chromatyny i organelli komórkowych otoczonych błoną. Zjawisko to poprzedzone jest obkurczaniem oraz zmianą kształtu i wielkości komórki, której powierzchnia ulega charakterystycznemu pofałdowaniu. Dochodzi do kondensacji chromatyny, a pyknotyczne wówczas jądro ulega fragmentacji. W konsekwencji w komórce obserwowane są wspomniane ciała apoptotyczne, a zachowana integralność błony zewnętrznej uniemożliwia wydostanie się zawartości komórki do środowiska, dzięki czemu nie wywołuje reakcji zapalnej. Ostatnim etapem apoptozy jest fagocytoza fragmentów komórki apoptotycznej przez makrofagi bądź sąsiadujące komórki [Paduch, 2015; Elmore, 2007].

2.2. Autofagia

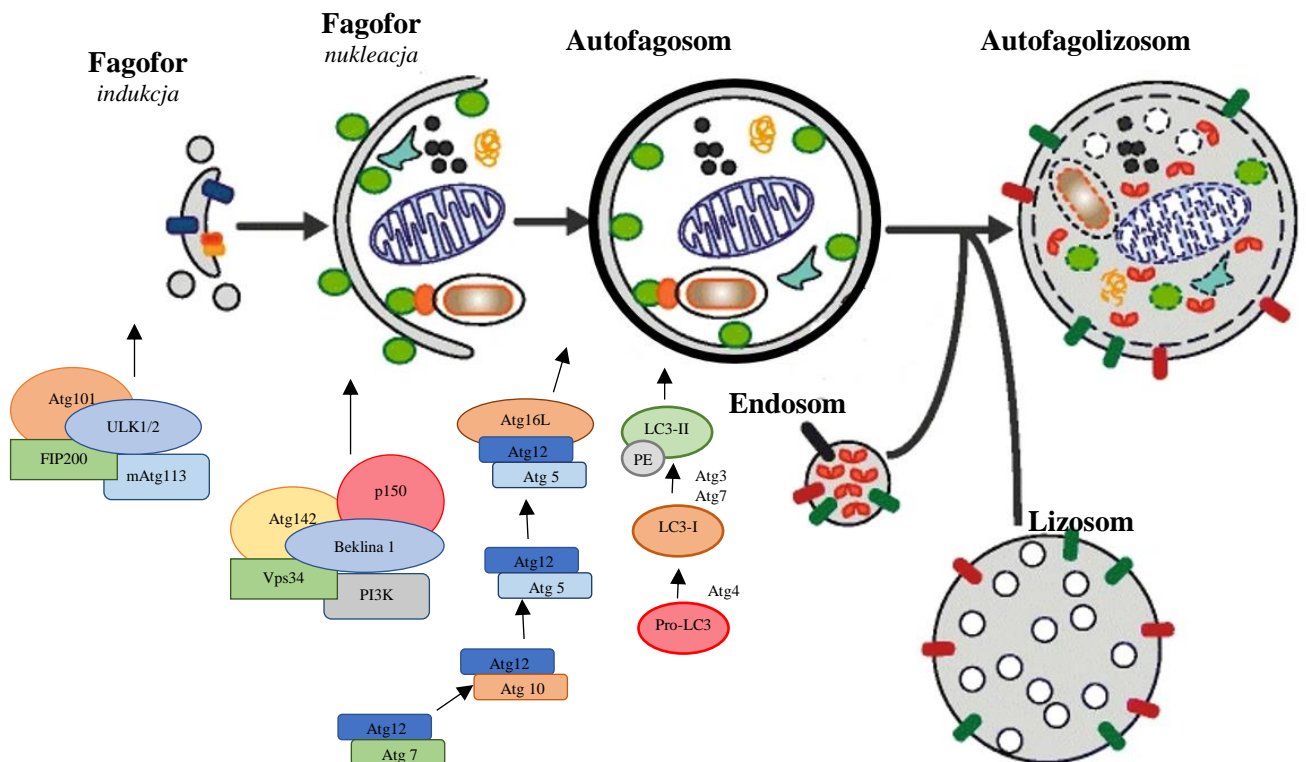
Autofagia (z gr. *auto* – samo, *phagy* – zjadanie) jest podstawowym szlakiem katabolicznym za pomocą którego, z wykorzystaniem lizosomów, degradowane są uszkodzone organella komórkowe i białka. Ten ściśle kontrolowany proces bierze udział w utrzymaniu homeostazy oraz przeżyciu komórek w warunkach stresowych. W przypadku nowotworów, autofagia odgrywa dwojaką rolę. Z jednej strony, zahamowanie tego procesu może prowadzić do transformacji nowotworowej na skutek akumulacji w komórce uszkodzonych struktur. Z drugiej zaś nadmierna aktywność zwiększa przeżywalność komórek guza, co stanowi sposób ochrony przed radio- i chemioterapią. Eliminacja uszkodzonych białek zmniejsza wówczas skuteczność stosowanej terapii [Polewska, 2012].

W zależności od mechanizmu, za pomocą którego składniki wewnątrzkomórkowe dostarczane są do lizosomu, autofagię podzielono na mikroautofagię, makroautofagię oraz autofagię zachodzącą z udziałem białek opiekuńczych (ang. *chaperones*). Mikroautofagia jest najprymitywniejszym typem autofagii i polega na endocytozie materiału cytoplazmatycznego. Mechanizm degradacji uszkodzonych białek w przypadku autofagii zależnej od chaperonów obejmuje translokację polipeptydów cytosolowych do lizosomu za pomocą wspomnianych białek opiekuńczych [Yang, 2009].

Najczęściej występującym typem autofagii jest makroautofagia. W jej przebiegu wyróżnia się trzy etapy: inicjację, czyli powstawanie autofagosomu (obejmującą indukcję,

nukleację i elongację), dojrzewanie oraz degradację (Ryc. 11). Inicjacja procesu podlega ścisłej kontroli przez białka z rodziny Atg (ang. *autophagy-related gene*). W fazie indukcji dochodzi do utworzenia kompleksu inicjującego złożonego z kinazy ULK1/2 (ang. *uncoordinated-51-like kinase*) i białek FIP200 (ang. *focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*), Atg101 oraz mAtg113, w obrębie którego ULK1/2 fosforyluje białka FIP200 i mAtg113. Zapoczątkowuje tym samym powstawanie fagoforu – podwójnej błony w kształcie litery C, która w późniejszych etapach autofagii, otacza kompartment cytoplazmy przeznaczony do degradacji. Aktywność wspomnianego kompleksu regulowana jest przez kinazę mTORC1. W warunkach bogatych w składniki odżywcze kinaza asocjuje z kompleksem inicjującym autofagię, powodując tym samym zablokowanie jego aktywności. Z kolei deficyt składników odżywczych prowadzi do oddysocjowania mTORC1, w konsekwencji prowadząc do indukcji autofagii [Parzych, 2014; Polewska, 2012; Yang, 2009].

Kolejnym etapem powstawania autofagosomu jest nukleacja fagoforu, polegająca na stopniowym otaczaniu materiału cytoplazmatycznego przeznaczonego do degradacji. Proces możliwy jest dzięki obecności kompleksu, składającego się z białek PI3K, Atg142, Vps34 (ang. *vacuolar protein sorting 34*), p150 oraz bekliny 1, a składniki budujące błonę izolującą pochodzą z retikulum endoplazmatycznego, błony komórkowej lub aparatu Golgiego. Następny etap obejmuje elongację błony fagoforu, a jego prawidłowy przebieg pozostaje pod kontrolą dwóch ubikwitynopodobnych systemów koniugacyjnych: Atg12 – Atg5 oraz LC3 – II (ang. *microtubule-associated protein light chain 3*). Pierwszy z nich składa się z białek Atg: 5, 7, 10, 12 oraz 16L. W początkowej fazie dochodzi do utworzenia przejściowego kompleksu białek Atg12-Atg7, który w obecności Atg10 oddysocjuje. Białko Atg12 zostaje wówczas przeniesione na Atg10, z którym również tworzy nietrwałe połączenie. Ostatecznie Atg12 za pomocą wiązania amidowego tworzy nieodwracalne połączenie z Atg5. Do powstałego kompleksu asocjuje białko Atg16L, które następnie ulega oligomeryzacji. Tak utworzony kompleks prawdopodobnie bierze udział w przyłączeniu fosfatydyloetanolaminy (PE) do białka LC3 – I i powstaniu systemu LC3 – II. W komórkach białko LC3 może występować w trzech postaciach: pro – LC3, LC3 – I i LC3 – II. Forma prekursorowa (pro – LC3) przekształca się do LC3 – I, dzięki odcięciu 22-aminokwasowego fragmentu białka, znajdującego się na C-końcu. Cięcie to możliwe jest dzięki obecności proteazy Atg4. Następnie białko LC3 – I poprzez przyłączenie fosfatydyloetanolaminy – PE, katalizowane przez Atg7 i Atg3, przekształca się w LC3 – II [Parzych, 2014; Yang, 2009].



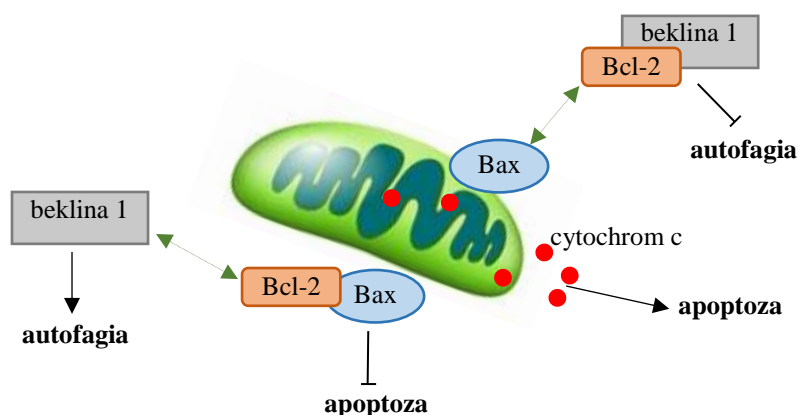
Rycina 11. Przebieg procesu makroautofagii [opracowanie własne]. Dokładny opis w tekście rozprawy (Rozdział 2.2. Autofagia).

Gdy oba końce błony izolującej złączą się ze sobą powstaje autofagosom, który następnie musi zostać połączony z lizosomem, tworząc autofagolizosom. W przypadku ssaków proces fuzji poprzedzony jest dojrzewaniem autofagosomu. Polega ono na łączeniu z endosomami, dzięki czemu do wnętrza pęcherzyka dostarczane są zarówno składniki przeznaczone do degradacji jak też czynniki umożliwiające fuzję obu pęcharzyków. Prawidłowy przebieg dojrzewania oraz fuzji regulowany jest przez białka z rodziny SNARE (ang. *soluble NSF-attachment protein receptor*) i białka błonowe związane z lizosomami LAMP-2 (ang. *lysosome-associated membrane protein-2*), a także białka fuzji – NSF (ang. *N-ethylmaleimide sensitive fusion*) [Polewska, 2012].

Ostatnim etapem procesu autofagii jest degradacja elementów cytozolu, znajdujących się w autofagolizosomie, która zachodzi dzięki obecności enzymów lizosomalnych. W wyniku trawienia powstają ciała resztkowe, które są następnie degradowane przez białka Atg15 i Atg22 [Lisiak, 2014].

2.3. Apoptoza a autofagia

Apoptoza i autofagia to procesy, które podlegają wzajemnej regulacji, a modulowanie ich aktywności w komórkach nowotworowych jest bardzo ważnym elementem terapii przeciwnowotworowej. Wydaje się, że kluczowym czynnikiem w kierowaniu komórek nowotworowych na drogę apoptozy lub autofagii pod wpływem śmiertelnego bodźca może być Bcl-2. Białko to poprzez interakcje z białkami proapoptycznymi występującymi w błonie mitochondrium, hamuje przebieg apoptozy. Co ciekawe Bcl-2 posiada również zdolność do tworzenia kompleksu z beklina 1, uniemożliwiając tym samym indukcję autofagii i kierując śmiertelny sygnał na drogę apoptozy. W takim przypadku dochodzi do deficytu i tym samym zmniejszenia puli Bcl-2, mogącego zablokować proces apoptozy, co w konsekwencji prowadzi do indukcji tego typu zaprogramowanej śmierci. W przypadku nowotworów mechanizm takiego działania Bcl-2 jest pożądanym. Umożliwia bowiem inicjację apoptozy, hamując jednocześnie indukcję nie zawsze korzystnego procesu autofagii, który obok śmierci może odpowiadać za przeżycie komórek. Działanie Bcl-2 jako molekularnego przełącznika pomiędzy oboma typami zaprogramowanej śmierci przedstawiono na poniższym rysunku (Ryc. 12) [Mukhopadhyay, 2014; Marquez, 2012].



Rycina 12. Regulacja procesu apoptozy i autofagii przez białko Bcl2 [na podstawie Maejima, 2016].

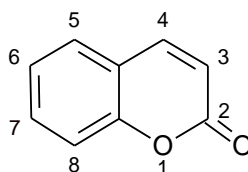
3. Kumaryny i ich właściwości przeciwnowotworowe

Kumaryna (2H-chromen-2-on) oraz jej analogi (kumaryny) to dwupierścieniowe pochodne benzo- α -pironu. Są naturalnie występującymi w świecie roślin związkami, należącymi do klasy metabolitów wtórnych. Odnajdywane są we wszystkich częściach roślin, przy czym największą zawartość stwierdzono w owocach, następnie w korzeniach, łodygach, a najmniejszą w liściach. Najbogatszym źródłem kumaryn są rodziny: rutowate (*Rutaceae*) i baldaszkowate (*Umbelliferae*). Wysoki poziom tych związków znajduje się w niektórych olejkach eterycznych, np. olej z kory cynamonu, z lawendy oraz z liści kasji. Ze względu na rodzaj podstawników występujących w ich strukturze możemy wyróżnić kumaryny proste, piranokumaryny oraz furanokumaryny. Piranokumaryny posiadają podstawiony w pozycji C6-C7 bądź C7-C8 pierścień piranu, zaś furanokumaryny - pierścień furanu [Kosidło, 2015; Bielawska, 2014; Jain, 2012].

Kumaryna i jej analogi charakteryzują się niską masą cząsteczkową, prostą strukturą chemiczną oraz wysoką rozpuszczalnością w większości rozpuszczalników organicznych. Dodatkowo wykazują szerokie spektrum działania, a ich właściwości zależą od lokalizacji oraz rodzaju przyłączonych podstawników. Dzięki tym cechom są bardzo często brane pod uwagę jako potencjalni kandydaci w konstruowaniu nowych strategii terapeutycznych [Annunziata, 2020]. Aktualnie, w sprzężeniu z promieniowaniem ultrafioletowym, stosowane są w leczeniu chorób skóry o podłożu autoimmunologicznym (łuszczyca, bielactwa, egzema, łysienia i liszaja płaskiego) oraz pierwotnych chłoniaków T-komórkowych (ziarniaka grzybiastego). Dotychczasowe badania pokazują również ich korzystny wpływ na ośrodkowy układ nerwowy (działanie przeciwbólowe, przeciwdrgawkowe oraz uspokajające) oraz układ krążenia (działanie przeciwwzkrzepowe oraz hipotensyjne). Wykazują również właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, a także przeciwwirusowe. Ponadto mogą być stosowane jako leki antydepresyjne i przeciwutleniacze [Kosidło, 2015; Bielawska, 2014; Malinowska, 2013]. Co więcej, posiadają właściwości przeciwnowotworowe. Wykazano ich działanie chemoprewencyjne oraz cytotoksyczne w stosunku do stransformowanych komórek. Hamują proliferację, ograniczają angiogenezę oraz metastazę, dzięki czemu mogą być wykorzystane w chemioterapii [Annunziata, 2020; Bielawska, 2014].

3.1. Kumaryny proste

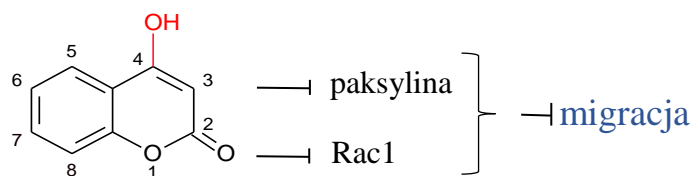
Do najczęściej występujących kumaryn prostych zaliczane są hydroksylowane, alkoksylowane i alkilowane pochodne, podstawione w pozycji C7, C6, C4 bądź C3 szkieletu kumarynowego, które mogą mieć dołączony dodatkowo podstawnik glukozydowy (Ryc. 13) [Küpeli-Akkol, 2020]. Dotychczasowe badania wykazały, że umiejscowienie oraz rodzaj przyłączonego podstawnika ma istotny wpływ na aktywność przeciwnowotworową związku, a największe znaczenie ma obecność ugrupowania izopentenylowego i hydroksylowego.



Rycina 13. Budowa strukturalna cząsteczki kumaryny.

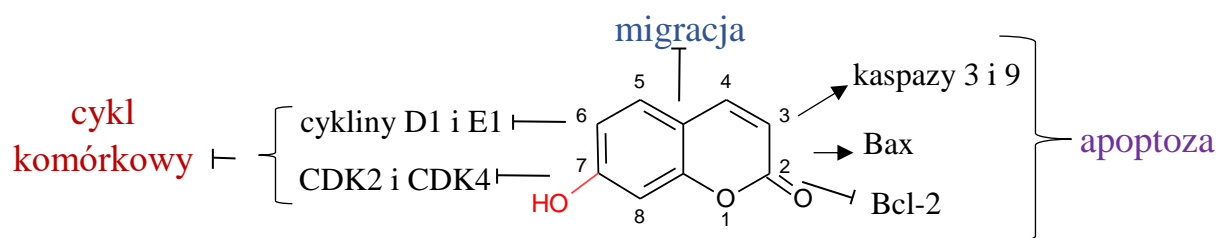
3.1.1. Hydroksylowe pochodne kumaryny

Do najbardziej znanych hydroksylowych pochodnych kumaryny należą 4-hydroksykumaryna oraz umbeliferon, podstawione odpowiednio w pozycji C4 i C7 szkieletu kumarynowego. Dotychczasowe badania wykazały, że obecność ugrupowania hydroksylowego w pozycji C4 pierścienia kumarynowego (4-hydroksykumaryna) nie zwiększa istotnie właściwości cytotoksycznych związku [Velasco-Velázquez, 2003]. Nie wpływa również na proliferację i przeżycie komórek nowotworowych, posiada natomiast właściwości ograniczające migrację i metastazę (Ryc. 14). Zaobserwowano bowiem, że związek dezorganizuje cytoszkielet aktynowy w komórkach czerniaka B16-F10, zmniejszając adhezyjność komórek nowotworowych do macierzy zewnątrzkomórkowej [Velasco-Velázquez, 2003]. Obserwowany jest wówczas spadek poziomu, zaangażowanych w adhezję i migrację, białek: Rac1 (ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i paksyliny [Ruiz-Moreno, 2021; Velasco-Velázquez, 2008].



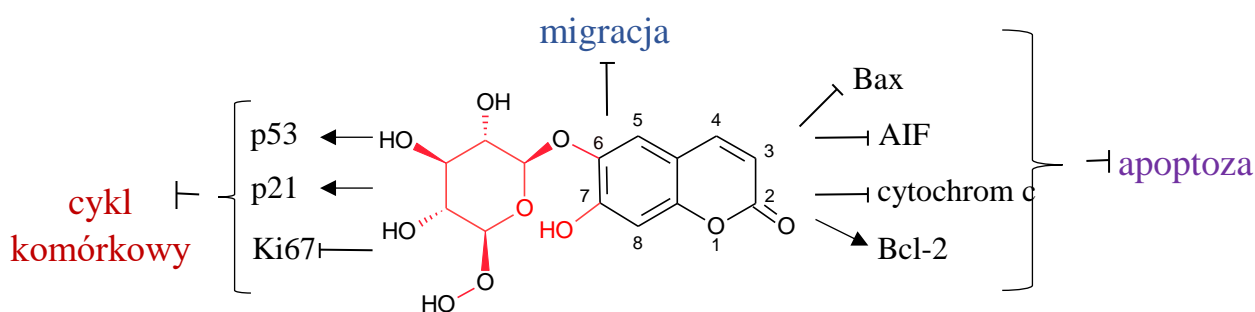
Rycina 14. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności 4-hydroksykumaryny [opracowanie własne].

Izomerem 4-hydroksykumaryny jest umbeliferon (7-hydroksykumaryna). Istnieje wiele doniesień sugerujących, że umiejscowienie podstawnika hydroksylowego w pozycji C7 zwiększa właściwości przeciwnowotworowe (Ryc. 15). Wykazano, że umbeliferon posiada dużo wyższą aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek raka płuc (linia A427) niż kumaryna [Jiménez-Orozco, 2001]. Ponadto leczenie 7-hydroksykumaryną zmniejsza objętość mięsaków (linia S180) oraz wydłuża czas przeżycia myszy inokulowanych komórkami S180 [Stefanova, 2007]. Co więcej, związek jest skutecznym chemioterapeutykiem stosowanym w zapobieganiu i leczeniu szczurzego raka jelita grubego indukowanego dimetylohydrazyną. Eliminacja komórek odbywa się na drodze apoptozy, poprzez zwiększenie aktywności markerów tego procesu takich jak: kaspaza 3, kaspaza 9 oraz białko Bax, a także zmniejszenie ekspresji genu kodującego antyapoptotyczne białko Bcl-2 [Muthu, 2016]. Dodatkowo umbeliferon wykazuje, zależną od zastosowanej linii komórkowej, zdolność do regulacji cyklu życiowego komórek nowotworowych. Powoduje zahamowanie cyklu komórkowego raka wątroby (linia HepG2) w fazie S, raka jamy ustnej (linia KB) w fazie G0/G1, nowotworu płuc (linia A-427) w fazie G1/S oraz raka nerki (linie 786-O, OS-RC-2 i ACHN) w fazie G1 [Wang, 2019; Vijayalakshmi, 2017; Yu, 2015; Jiménez-Orozco, 2001]. Na poziomie molekularnym obserwowany jest wówczas spadek ekspresji genów, kodujących białka odpowiedzialne za regulację cyklu komórkowego, cyklin D1 i E1 oraz kinaz zależnych od cyklin: CDK2 i CDK4 (ang. *cyclin-dependent kinases*) [Wang, 2019; Jiménez-Orozco, 2001]. Kielbus i in. wykazali, że obok wspomnianych wcześniej właściwości, umbeliferon ma zdolność do hamowania migracji komórek nowotworowych raka krtani (linia RK33) [Kielbus, 2013]. Co ciekawe, dodatkowe zastosowanie nośników w postaci nanocząstek MSN (ang. *mesoporous silica nanoparticles*) znacząco zwiększa absorpcję związku w guzach piersi (linie MCF-7 i MCF-10a), powodując nasilenie jego właściwości proapoptotycznych oraz ekspresji genu kodującego kaspazę 3 [Kundu, 2020].



Rycina 15. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności umbeliferonu [opracowanie własne].

Analogiem umbeliferonu jest eskulina (6-glukozyd 6,7-hidroksykumaryny). Związek ten, tak samo jak 7-hidroksykumaryna, posiada grupę hydroksylową w pozycji C7. Jednak w jej strukturze dodatkowo występuje podstawnik glukozydowy, przyłączony atomem tlenu do 6 atomu węgla w cząsteczce pochodnej kumaryny [Bielawska, 2014]. Wpływ tego ugrupowania na właściwości przeciwnowotworowe związku nie jest do końca poznany (Ryc. 16). Udowodniono bowiem, że eskulina posiada dużo niższą aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek raka pęcherza moczowego (linia E-J) w porównaniu do umbeliferonu [Yang, 2007]. Co więcej, zaobserwowano właściwości protekcyjne związku wobec komórek nerwiaka zarodkowego (linia SH-SY5Y) traktowanego dopaminą. Eskulina zapobiegała apoptozie poprzez ochronę potencjału mitochondrialnego, hamowanie uwalniania cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy oraz blokowanie czynnika indukującego apoptozę AIF. Zmniejszała również poziom proapoptotycznego białka Bax, zwiększając jednocześnie ilość Bcl-2 [Zhao, 2007]. Zupełnie inne wyniki uzyskano podczas inkubacji z eskuliną komórek raka piersi (linia MDA-MB-231). Zaobserwowano wówczas, zależny od czasu i dawki, spadek przeżywalności komórek nowotworowych. Podanie eskuliny zwiększało ekspresję genów, których produkty regulują cykl komórkowy, czyli białek p53 i p21, a także prowadziło do spadku stężenia markera proliferacji – Ki67 [Mo, 2020]. Dodatkowo, pochodna kumaryny hamowała adhezję oraz migrację komórek glejaka (linia U87) poprzez modulowanie funkcji integryn [Mokdad-Bzeouich, 2016].



Rycina 16. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności eskuliny [opracowanie własne].

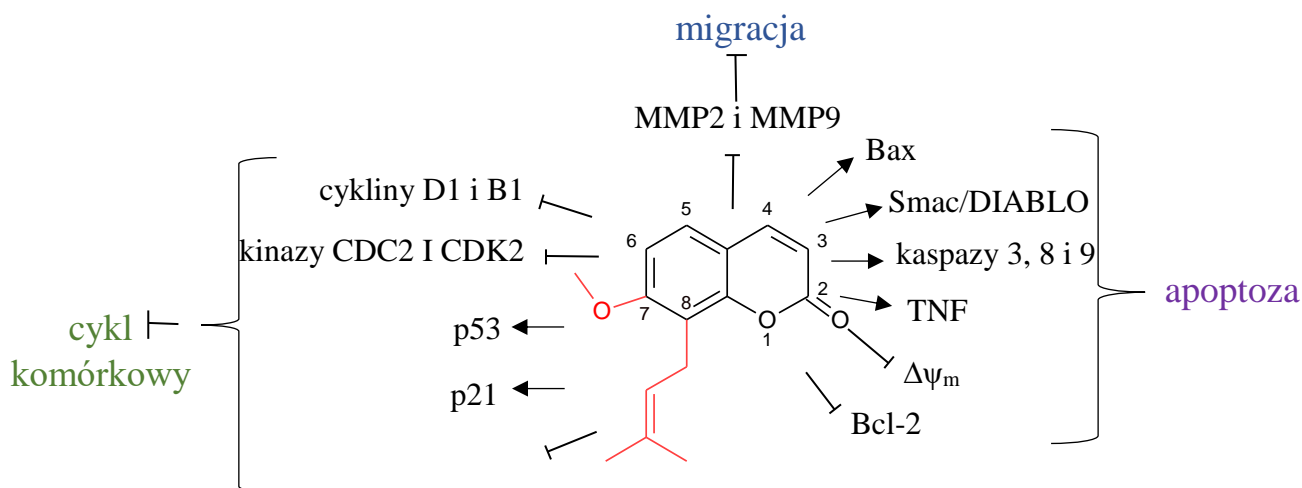
3.1.2. Ostol

Kolejnym związkiem o dużym potencjale terapeutycznym jest ostol (Ryc. 17). Przeciwnowotworową aktywność tej kumaryny wykazano w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem m. in. komórek raka płuc (A549), raka żołądka (HGC27 i SGC-7901), białaczki (P-388 D1), raka piersi (MCF-7, MDA-MB 231, MDA-BT-549, MDA-MB-468 i MDA-MB 435), rdzeniaka zarodkowego (TE671), raka krtani (RK33) oraz szyjki macicy (HeLa) [Dai, 2018; Xu, 2018; Wang, 2015; Jarzab, 2014; Xu, 2011; Yang, 2010; Chou, 2007]. Ostol niespecyficznym hamował cykl komórkowy w sposób zależny od rodzaju linii komórkowej. Procentowy wzrost ilości komórek zablokowanych w fazie G₀/G₁ zaobserwowano w przypadku szpiczaka mnogiego (RPMI-8226), zaś w fazie G₁/S w przypadku raka piersi (MDA-MB 435). Towarzyszył temu spadek poziomu białek, odpowiedzialnych za przejście między tymi fazami: cykliny D1 oraz kinazy CDK2 oraz wzrost stężenia białek p21 oraz p53 [Huang, 2019; Wang, 2015]. Ostol blokował również cykl komórkowy rdzeniaka (TE671) w fazie S/G₂ [Jarzab, 2014]. Najczęściej jednak pochodna kumaryny hamowała podziały komórkowe w fazie G₂/M, co zaobserwowano w komórkach raka płuc (A549), jajnika (A2780 i OV2008), żołądka (HGC27 i SGC-7901) oraz piersi (MDA-MB-231 i BT-549). Towarzyszyło temu obniżenie ekspresji genu cykliny B1 oraz kinazy CDC2 a także białka PI3K. Co więcej, zahamowaniu uległa również fosforylacja kinaz AKT/PKB i mTOR [Dai, 2018; Xu, 2018; Jiang, 2016; Hung, 2011; Xu, 2011].

Kolejną, bardzo ważną pod względem działania przeciwnowotworowego, aktywnością ostolu jest jego zdolność do indukcji apoptozy. Kumaryna moduluje bowiem ekspresję genów zaangażowanych w przebieg tego procesu, co zaobserwowano m.in. w raku stercza (PC3), płuc (H1299), wątroby (SMMC-7721) nerwiaka zarodkowego (SKNMC) oraz jajnika (A2780 i OV2008). Na poziomie molekularnym, ostol zmniejszał poziom antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz zwiększał stężenie proapoptotycznych białek Bax i Smac/DIABLO (ang. *secondary mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) a także kaspaz 3, 8 i 9 [Jiang, 2016; Shokoohinia, 2014]. Sugeruje to, że apoptoza indukowana przez ostol, może zachodzić zarówno drogą zewnątrz- jak i wewnątrzpochodną. Co więcej, w komórkach wewnątrzwątrobowego raka dróg żółciowych (HCCC-9810 i RBE) zaobserwowano charakterystyczny dla szlaku wewnątrzkomórkowego, obniżony potencjał błony mitochondrialnej ($\Delta\psi_m$) [Zhu, 2017]. Z kolei, w przypadku raka wątroby (SMMC-7721), apoptoza wiązała się ze zwiększoną

ekspresją genów zaangażowanych w szlak zewnątrzkomórkowy, w tym błonowych receptorów śmierci TNF (ang. *tumor necrosis factor*) oraz ich ligandów [Zhang, 2012].

Innym, ważnym aspektem przeciwnowotworowej aktywności ostolu jest hamowanie migracji komórek nowotworowych raka piersi (linie MCF-7 i MDA-MB-231), jajnika (linie A2780 i OV2008) oraz płuc (linia A549), z czym związana jest zmniejszona ekspresja genów kodujących metaloproteinazy (ang. MMP – matrix metalloproteinases): MMP2 (linie MCF-7 i MDA-MB-231BO) i MMP9 (linie A2780 i OV2008 i A549) [Jiang, 2016; Xu, 2012; Yang, 2010]. W komórkach raka piersi, aktywność tych enzymów powodowała hydrolizę ektodomenu E-kadheryny, co prowadziło do zmniejszenia adhezji komórek i zwiększenia ich inwazyjności. Ostol dodatkowo podwyższał poziom samej E-kadheryny, ograniczając progresję nowotworu [Hung, 2011].



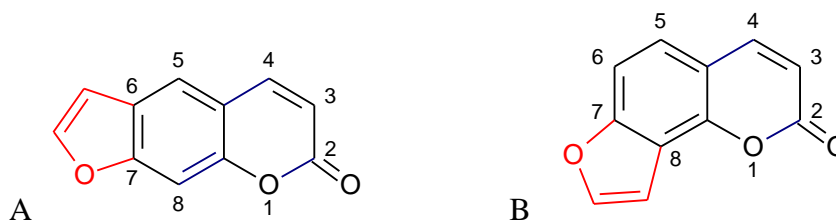
Rycina 17. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności ostolu [opracowanie własne].

3.2. Furanokumaryny

Furanokumaryny w swojej strukturze zawierają pierścień furanowy, przyłączony do szkieletu kumarynowego. W zależności od położenia podstawnika wyróżnia się typ psoralenu (liniowy), w którym pierścień furanowy przyłączony jest do 6 i 7 atomu węgla w szkielecie oraz typ angelicyny (angularny, kątowy), w którym podstawnik zajmuje pozycję C7 i C8 (Ryc. 18) [Kosidło, 2015]. W królestwie roślin najczęściej występują

kumaryny typu liniowego. Ich biosynteza zachodzi w odpowiedzi na atak patogenów takich jak bakterie, wirusy, grzyby czy też owady.

Zarówno typ liniowy, jak i kątowy mogą dawać początek wielu pochodnym. Powstają one poprzez zastąpienie atomu wodoru w pierścieniu kumarynowym podstawnikiem, którym może być ugrupowanie hydroksylowe bądź alkoksylowe. Rodzaj, miejsce oraz liczba przyłączonych podstawników decyduje o właściwościach fizykochemicznych i biologicznych związku.



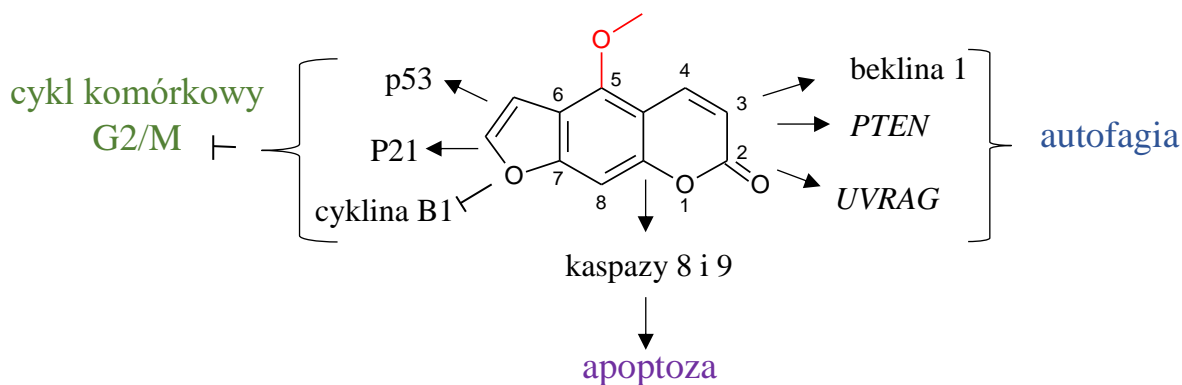
Rycina 18. Furanokumaryny: typu psoralen (A) i angelicyna (B) oraz różnice w ich strukturze.

3.2.1. Metoksyłowe pochodne psoralenu

Analiza chemiczna pochodnych psoralenu wykazała, że ugrupowanie metoksyłowe może być przyłączone do 5 lub 8 atomu węgla furanokumaryny, tworząc odpowiednio: bergapten (5-MOP – 5-metoksypsoralen) lub ksantotoksynę (8-MOP – 8-metoksypsorelen). Wg Widelskiego i wsp. występowanie ugrupowania metoksyłowego, zwiększa właściwości przeciwnowotworowe psoralenu, a aktywność 5-MOP i 8-MOP jest zbliżona. Oba związki wykazują właściwości proapoptotyczne, antyproliferacyjne oraz hamują cykl komórkowy w fazie G1 w ludzkich komórkach białaczki linii HL60 [Widelski, 2017].

Jak wykazały badania *in vitro* bergapten skutecznie eliminuje komórki nowotworowe na drodze zaprogramowanej śmierci (Ryc. 19). Związek ten hamuje rozwój raka wątroby (Hep-G2) oraz raka żołądka (SGC-7901) [Fang, 2010]. W badaniach przeprowadzonych na estrogenozależnych komórkach raka piersi (MCF-7 i SKBR-3) wykazano, że bergapten indukuje zależną od SMAD4 (ang. *mothers against decapentaplegic homolog 4*) poliubikwitynację receptorów estrogenowych i tym samym ich degradację. Receptory te są czynnikami transkrypcyjnymi, które odpowiadają za ekspresję genów odpowiedzialnych za przeżycie, proliferację oraz wzrost guza. Zatem ich rozkład prowadzi do zmniejszenia inwazyjności nowotworu [Hung, 2017; Panno, 2014; Dębska, 2010].

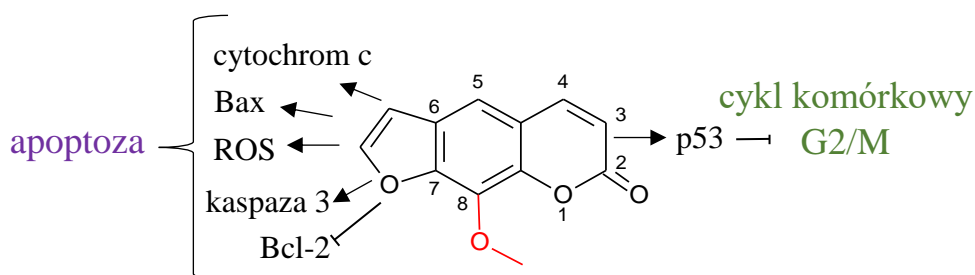
Ciekawym przykładem aktywności przeciwnowotworowej bergaptenu jest jego wpływ na indukcję apoptozy w ludzkich komórkach raka wątroby (Hep-G2). Eliminacja komórek odbywa się poprzez zatrzymanie cyklu w fazie G2/M. Modulacja tego punktu kontrolnego w przypadku 5-MOP związana jest z hamowaniem aktywności cykliny B1 – podjednostki regulatorowej kinazy CDK1 [Lee, 2003]. Co więcej, Panno i in. udowodnili, że bergapten inicjuje w komórkach raka piersi linii MCF-7 i ZR-75 zaprogramowaną śmierć, kierując je zarówno na drogę apoptozy jak i autofagii. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa PTEN. 5-MOP zwiększa bowiem ekspresję genu *PTEN*, poprzez aktywację jego promotora. Skutkuje to zahamowaniem aktywności kinazy PI3K, a w konsekwencji zatrzymaniem proliferacji, metabolizmu oraz śmierci komórki na drodze zaprogramowanej śmierci. Towarzyszy temu wzrost aktywności białek p53 i p21 oraz kaspaz 8 i 9. Co ciekawe, w obrazie mikroskopowym, oprócz komórek apoptotycznych, obecne są również komórki autofagalne. Na poziomie molekularnym towarzyszy temu wzrost syntezy pro-autofagalnego białka bekliny 1 oraz wzmożona ekspresja genu *UVRAG* (ang. *UV Resistance Associated Gene*), którego produkt łączy się z bekliną 1, promując powstawanie autofagosomów i autofagię [Hung, 2017; Amicis, 2015; Lisiak, 2014; Panno, 2014; Cantley, 1999].



Rycina 19. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności bergaptenu [opracowanie własne].

Podobnie jak bergapten, ksantotoksyna również wykazuje aktywność przeciwnowotworową (Ryc. 20). Badania przeprowadzone na ludzkich komórkach raka wątroby (HepG2) wskazują, że związek ten posiada właściwości proapoptotyczne. Mechanizm indukcji zaprogramowanej śmierci pod wpływem ksantotoksyny opiera się na zmniejszeniu ekspresji genu kodującego antyapoptotyczne białko Bcl-2 oraz zwiększeniu

syntezy białka Bax. Towarzyszy temu zwiększenie ilości cytoplazmatycznego cytochromu c uwalnianego z mitochondrium. Spadek błonowego potencjału mitochondrialnego, translokacja proapoptotycznych białek mitochondrialnych oraz aktywacja kaspazy 3 sugeruje, że apoptoza komórek HepG2 przebiega ścieżką mitochondrialną. Inny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności 8-MOP opiera się na zdolności tworzenia reaktywnych form tlenu, co w konsekwencji prowadzi do indukcji stresu oksydacyjnego i apoptozy. Eliminacja komórek nowotworowych na drodze zaprogramowanej śmierci przez ksantotoksynę wiąże się również z zahamowaniem przekazywania sygnałów przeżycia poprzez wewnątrzkomórkowy szlak RAS-RAF-MEK-ERK. Co więcej, 8-MOP może wiązać się bezpośrednio z DNA, hamując w ten sposób cykl komórkowy. Towarzyszy temu wzrost ilości aktywnego białka p53, które indukuje transkrypcję p21. Białko p21 może z kolei wiązać się bezpośrednio z kompleksami CDK-cyklina i w ten sposób hamować cykl komórkowy w fazie G2/M [Yang, 2015].



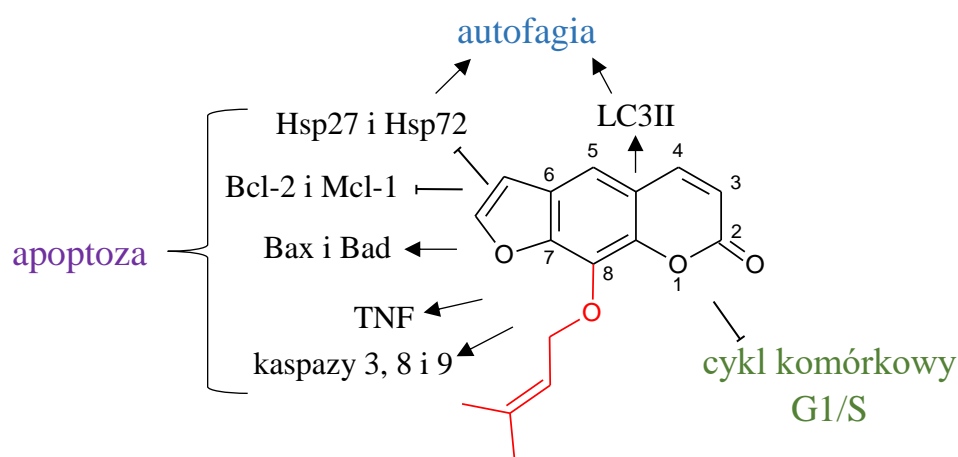
Rycina 20. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności ksantotoksyny [opracowanie własne].

3.2.2. Izopentenyloksylove pochodne psoralenu

W pochodnych psoralenu, ugrupowanie izopentenyloksylove może przyjmować pozycję przy piątym (C5) bądź przy 8 atomie węgla (C8), tworząc odpowiednio izoimperatorynę i imperatorynę.

Przeciwnowotworowe właściwości imperatoryny zaobserwowano w wielu typach nowotworów, m.in. białaczkach, raku szyjki macicy, glejakach, raku wątroby [Hu, 2016; Kozioł, 2016; Bądziul, 2015; Luo, 2011]. Mechanizm tej aktywności jest złożony i zależy od rodzaju badanego nowotworu (Ryc. 21). Opiera się na zahamowaniu cyklu komórkowego w fazie G1/S oraz indukcji zaprogramowanej śmierci na drodze apoptozy i autofagii. Imperatoryna może inicjować apoptozę poprzez szlak zewnętrzny (z udziałem błonowych

receptorów śmierci) lub wewnętrzny (z udziałem mitochondrium). Dotychczasowe badania dowodzą, że wzbudzeniu szlaku receptorowego przez imperatorynę towarzyszy wzrost ekspresji genów kodujących receptory TNF i białek posiadających domenę śmierci FADD oraz aktywacja kaspaz 3 i 8. O udziale szlaku mitochondrialnego świadczy wzrost aktywności kaspaz 3 i 9, a także uwalnianie cytochromu c do cytozolu [Kozioł, 2016; Luo, 2011]. Równie ciekawym przykładem aktywności przeciwnowotworowej imperatoryny jest zdolność do modulacji ekspresji genów, kodujących białka z rodziny Bcl-2. W grupie tych białek wyróżniamy zarówno białka posiadające właściwości proapoptotyczne (Bax, Bag, Bcl-XS, Bcl-2, Bcl-XL, A1, Mcl-1). Stosunek obu grup białek decyduje o zapoczątkowaniu lub hamowaniu procesu zaprogramowanej śmierci. Furanokumaryna prowadzi do wzrostu syntezy białek proapoptotycznych: Bax - w nowotworach płuc (linia H23) i jelita grubego (linia HCT-15) oraz Bad - w raku wątroby (linia Hep2). Obserwowany jest również spadek poziomu białek antyapoptotycznych: Bcl-2 w komórkach raka jelita grubego (linia HCT-15) i białaczki (HL-60) oraz białka Mcl-1 w nowotworze wątroby (linia HCC) i płuc (linia H23). Przewaga białek proapoptotycznych w komórkach nowotworowych jest skorelowana z obniżeniem mitochondrialnego potencjału transbłonowego, czemu towarzyszy uwolnienie cytochromu c do cytozolu oraz wzrost poziomu białek p21 i p53 [Hu, 2016; Kozioł, 2016; Rahman, 2015; Choochuay, 2013].



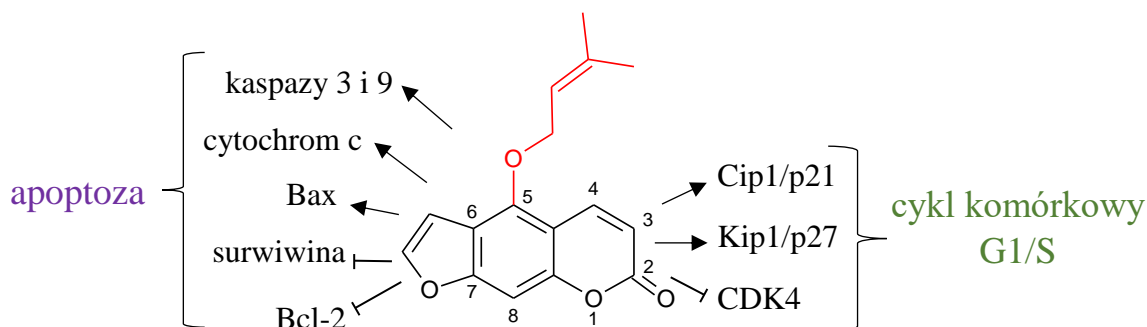
Rycina 21. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności imperatoryny [opracowanie własne].

Właściwości proapoptotyczne imperatoryny związane są również z jej zdolnością do hamowania ekspresji genów kodujących białka szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*,

Hsp) – Hsp27 i Hsp72. Wysoki poziom tych białek opiekuńczych jest charakterystyczny dla nowotworów, co w konsekwencji powoduje wzrost oporności na indukcję zaprogramowanej śmierci w stransformowanych komórkach. Mechanizm tego zjawiska wiąże się ze zdolnością Hsps do blokowania łączenia cytochromu c z czynnikiem Apaf-1, co prowadzi do zahamowania aktywacji kaspaz 3 i 9 [Bądziul, 2014]. Furanokumaryna blokuje ekspresję *Hsps*, przyczyniając się do wzrostu wrażliwości komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci. Jak wykazały badania, przeprowadzone na linii HeLa, imperatoryna indukuje również autofagię, co wiąże się z obniżeniem poziomu białka Hsp27 oraz wzrostem poziomu aktywnej formy markera autofagii – LC3 – II. [Jakubowicz-Gil, 2012; Polewska, 2012].

Izoimperatoryna jest kolejną furanokumaryną liniową o zdefiniowanych właściwościach przeciwnowotworowych (Ryc. 22). Mechanizm jej aktywności został dobrze poznany w komórkach raka prostaty (DU145) oraz raka żołądka (SGC-7901). W linii DU145, furanokumaryna powoduje wzrost poziomu inhibitorów kinaz cyklinozależnych (CDK2 i CDK4), takich jak Cip1/p21 i Kip1/p27. Dodatkowo hamuje syntezę samej kinazy CDK4, co skutkuje zablokowaniem cyklu komórkowego w fazie G1 [Kang, 2005].

Inny mechanizm zaobserwowano w komórkach raka żołądka SGC-7901. Inkubacja komórek nowotworowych z izoimperatoryną prowadziła do indukcji apoptozy, przebiegającej ścieżką mitochondrialną. Obserwowano bowiem wzrost poziomu proapoptotycznego białka Bax, które bierze udział w tworzeniu tzw. megakanałów PTP, przez które cytochrom c uwalniany jest z mitochondrium do cytoplazmy. Jednocześnie furanokumaryna blokowała syntezę antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz surwiwiny – białka z rodziny IAP (ang. *inhibitors of apoptosis*). Surwiwina hamuje aktywność kaspaz inicjatorowych i efektorowych, zatem spadek jej syntezy promuje aktywację kaspazy 3 i 9 [Tong, 2017; Karczmarek-Borowska, 2008].



Rycina 22. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności izoimperatoryny [opracowanie własne].

II. CEL PRACY

Glejaki są nowotworami centralnego układu nerwowego, które wiążą się z niezwykle złym rokowaniem. Aktualnie stosowane metody leczenia pozwalają jedynie na wydłużenie życia pacjenta oraz poprawę jego jakości. Ze względu na naciekowy charakter guzów, praktycznie niemożliwa jest ich całkowita resekcja chirurgiczna, zaś w trakcie radio- i chemioterapii bardzo często dochodzi do nabywania oporności na stosowane leczenie. Na poziomie molekularnym wiąże się to z intensyfikacją przekazywania sygnału przeżycia przez dwie kluczowe ścieżki sygnałowe RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR, które w konsekwencji prowadzą do wzmożonej proliferacji, angiogenezy i oporności na indukcję zaprogramowanej śmierci. Dlatego opracowanie nowych strategii terapeutycznych, uwzględniających blokowanie aktywności wspomnianych szlaków poprzez specyficzne inhibitory może mieć duże znaczenie w leczeniu glejaków.

Z danych literaturowych wiadomo, że stosowanie pojedynczych związków w chemioterapii jest mniej skuteczne od tzw. terapii skojarzonej, wykorzystującej kilka związków o różnych mechanizmach działania. Dużą rolę odgrywają tu związki pochodzenia naturalnego.

Dlatego też celem niniejszej pracy jest ocena przeciwnowotworowych właściwości wybranych kumaryn prostych oraz furanokumaryn w pojedynczej aplikacji jak również w terapii skojarzonej ze stosowanym w leczeniu temozolomidem i inhibitorami szlaków RAS-RAF-MEK-ERK (sorafenib) i PI3K-AKT/PKB-mTOR (LY294002).

Cele cząstkowe:

1. Określenie wpływu kumaryn prostych (ostolu, 4-hydroksykumaryny, umbeliferonu i eskuliny) oraz furanokumaryn (imperatoryny, izoimperatoryny, ksantotoksyny i bergaptenu) na indukcję zaprogramowanej śmierci oraz potencjał migracyjny w ludzkich komórkach glejaka wielopostaciowego (linia T98G) i gwiazdziaka anaplastycznego (linia MOGGCCM).

2. Wykorzystanie badanych związków w aplikacji skojarzonej z temozolomidem oraz inhibitorami wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału (sorafenib i LY294002) oraz określenie ich przeciwnowotworowego potencjału (indukcja zaprogramowanej śmierci oraz hamowanie migracji).

3. Zbadanie molekularnych mechanizmów prowadzących do indukcji apoptozy oraz autofagii w ludzkich komórkach glejaków pod wpływem kumaryn i temozolomidu:

a) ocena poziomu ekspresji markerów apoptozy (Bcl-2, kaspaza 3) oraz autofagii (beklina 1).

b) zbadanie udziału szlaków przekazywania sygnałów RAS-RAF-MEK-ERK oraz PI3K-AKT/PKB-mTOR w indukcji zaprogramowanej śmierci.

c) określenie roli kompleksu Bcl-2 oraz bekliny 1 w kierowaniu komórek nowotworowych na drogę apoptozy lub autofagii.

III. MATERIAŁY I METODY

1. Spis odczynników

L.p.	Odczynnik	Firma
Odczynniki do sporządzania buforów		
1	(CH ₃ COO) ₂ Mg	POCH
2	glicyna	
3	KCl	
4	KH ₂ PO ₄	
5	metanol	
6	Na ₂ HPO ₄	
7	NaCl	
8	2-merkaptoetanol	Sigma Chemicals Company
9	Akrylamid	
10	Bisakrylamid	
11	Triton X-100	
12	Tris	
13	SDS	
14	AMPS	
15	TEMED	
16	Błękit bromofenolowy	
17	DMSO	
18	DTT	Sigma Aldrich
Prowadzenie hodowli komórkowej		
1	Antibiotic-100X (penicylina + streptomycyna)	Sigma Chemicals Company, USA
2	DMEM /F12	
3	Trypsyna	Sigma Aldrich
4	FBS	
Badane związki		
1	4-hydroxykumaryna	Sigma Aldrich
2	Eskulina	
3	LY294002	
4	Sorafenib	BAYER, Niemcy
5	Temozolomid	Schering-Plough, USA
Mikroskopia konfokalna		
1	Hoechst 33342	Sigma Chemicals Company, USA
2	Jodek propidionowy	
3	Oranż akrydyny	
Oznaczanie stężenia białka		
1	odczynnik Bradford	Sigma Chemicals Company
Technika immunoblotingu i immunoprecypitacji		
1	RIPA	SantaCruz Biotechnology
2	Mysie monoklonalne przeciwciała:	
	~ anty-PI3K, ~ anty-Raf,	

	~ anty-Bcl-2 ~ anty-kaspaza 3 ~ anty-beklina 1 ~ anty β -aktyna	
3	Przeciwciała antymysie	
4	Białko A sprzężone z agarozą	
5	BCIP	Sigma Chemicals Company
6	NBT	
Badanie aktywności enzymatycznej		
1	SensoLyte®AMC Caspase Substrate Sampler Kit	AnaSpec
2	AKT/ERK Activation InstantOne ELISA™ Kit	Invitrogen by ThermoFisher
Blokowanie ekspresji genów		
1	siRNA: ~ anty PI3K ~ anty-Raf ~ anty-Bcl-2 ~ anty-kaspaza 3 ~ anty-beklina 1	SantaCruz Biotechnology
2	Transfection Reagent	
Test rysy		
1	Barwnik Giemsy	Pol-Aura
2	Barwnik May-Grünwalda	

2. Spis buforów

Bufor A	NaCl (8g), KCl (0,2g), Na ₂ HPO ₄ (1,44g), KH ₂ PO ₄ (0,2g), woda destylowana (1000ml), pH 7,4
Bufor B	125mM Tris-HCl (pH 6,8, 0,76g), 4% SDS (2g), 10% glicerol (5ml), 200mM DTT (1,54g), woda destylowana (50 ml)
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

3. Linie komórkowe

Badania przeprowadzono na ustalonych liniach ludzkich komórek glejaka:

- gwiaździaka anaplastycznego – MOGGCCM (III^o wg WHO) (ECACC, ang. *European Collection of Cell Cultures*, numer katalogowy: 86022702)
- glejaka wielopostaciowego – T98G (IV^o wg WHO) (ATCC, ang. *American Type Culture Collection*, numer katalogowy: CRL-1690TM).

Podłoże dla hodowli adherentnych stanowiła mieszanina DMEM (ang. *Dulbecco's minimal essential medium*) i F-12 Ham w stosunku 1:1 w przypadku MOGGCCM i 3:1 w linii T98G, wzbogacona 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (ang. *fetal bovine serum*) oraz penicyliną i streptomycyną w stężeniu 100µg/ml. Hodowle prowadzono w kontrolowanych warunkach (37°C, 5% CO₂ oraz wilgotności 95%) w inkubatorze New BrunswickTM Galaxy® 170 R, wykorzystując naczynia typu Falcon, płytki 6-, 8- i 96- dołkowe oraz szkiełka komorowe typu LabTek (NuncTM, ThermoFisher).

Badania przeprowadzono również na linii komórkowej oligodendrocytów OLN-93 (uzyskanej z Department of Neonatology, Charite, Campus Virchow Klinikum, Humboldt University Berlin). Pożywkę hodowlaną stanowiła mieszanina DMEM:F-12 Ham w stosunku 1:1 z dodatkiem 10% FBS oraz 100 µg/ml penicyliny i streptomycyny. Hodowle prowadzono w jednakowych warunkach jak w przypadku linii MOGGCCM i T98G.

4. Badane związki

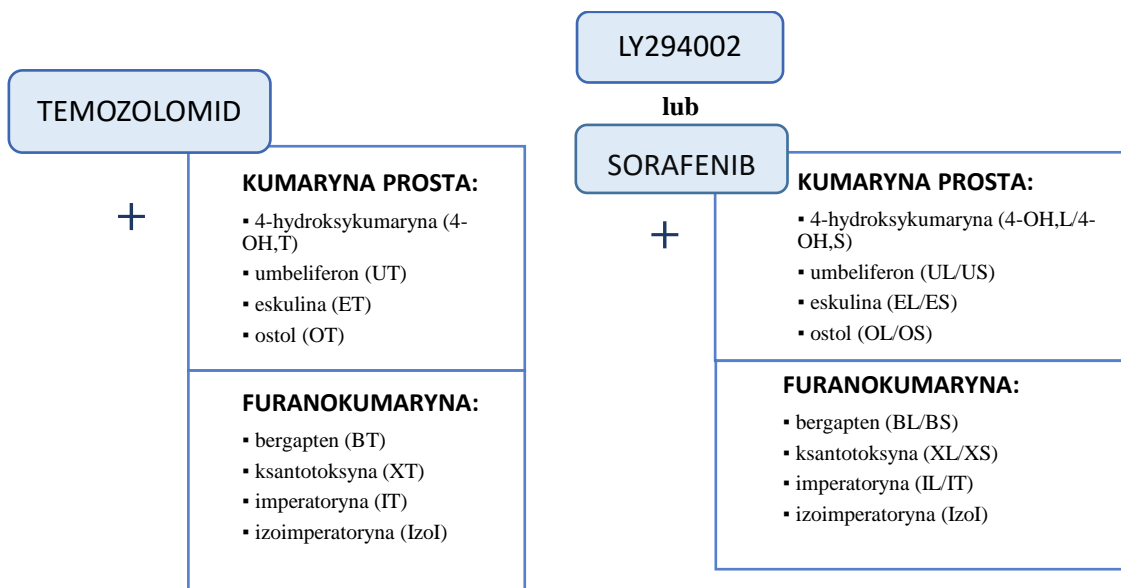
W badaniach wykorzystano kumaryny proste (4-hydroksykumarynę, umbeliferon, eskulinę i ostol) oraz furanokumaryny (bergapten, ksantotoksynę, imperatorynę oraz izoimperatorynę), a także temozolomid i inhibitory wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału: sorafenib (inhibitor RAF) i LY294002 (inhibitor PI3K). Wszystkie zastosowane związki rozpuszczano w DMSO. Stężenia końcowe oraz czas inkubacji kumaryn prostych i furanokumaryn zostały ustalone eksperymentalnie, podczas gdy dane te dla TMZ, sorafenibu i LY294002 dobrano na podstawie wcześniejszych doświadczeń (Zajac, 2021; Jakubowicz-Gil, 2013, 2013, 2011). Końcowe stężenia związków użytych w badaniach przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 2. Stężenia związków użytych w badaniach.

	Badany związek	Końcowe stężenie [μM]	
		MOGGCCM	T98G
	temozolomid	100	50
	sorafenib	1	1
	LY284002	10	10
Kumaryny proste	4-hydroksykumaryna	200	200
	umbeliferon	200	200
	eskulina	100	200
	ostol	150	150
	bergapten	25	50
Furano kumaryny	ksantotoksyna	25	50
	imperatoryna	50	50
	izoimperatoryna	25	25

Kontrolę stanowiły komórki MOGGCCM i T98G inkubowane z 0,01% DMSO, zaś próba badana obejmowała 24-godziną inkubację z wybranymi związkami w różnych wariantach eksperymentalnych. Oprócz pojedynczej aplikacji związków: temozolomid (T), sorafenib (S), LY294002 (LY), 4-hydroksykumaryna (4-OH), umbeliferon (U), eskulina (E), ostol (O), bergapten (B), ksantotoksyna (X), imperatoryna (I), izoimperatoryna (izoI), zastosowano kombinację leków. Wówczas komórki glejaka poddano jednoczesnej inkubacji

z badanymi kumarynami w połączeniu z temozolomidem lub inhibitorami wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału (sorafenibem bądź LY294002). Schemat zastosowanej skojarzonej aplikacji przedstawiono poniżej.



Rycina 23. Schemat ilustrujący zastosowaną aplikację skojarzoną.

5. Izolacja kumaryn

Materiał roślinny, służący do otrzymania kumaryn został zebrany w Ogrodzie Roślin Leczniczych Zakładu Farmakognozji z Zakładem Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie i posłużył do wyizolowania furanokumaryn (imperatoryny, izoimperatoryny, bergaptenu i ksantotoksyny) oraz kumaryn prostych: ostolu i umbeliferonu. Pozostałe kumaryny proste: 4-hydroksykumaryna i eskulina zostały zakupione (Sigma Aldrich).

5.1. Izolacja kumaryn prostych

Izolacja ostolu z materiału roślinnego została przeprowadzona według metody opisanej przez Jarzab i in. [Jarzab, 2014]. Owoce selernicy (*Cnidum monnieri L.*) suszono w temperaturze pokojowej, po czym proszkowano i ekstrahowano eterem naftowym (50 g w 500 ml) przez 30 minut. Procedurę powtarzono trzykrotnie, po czym nadmiar rozpuszczalnika usuwano przy pomocy wyparki rotacyjnej. Do dalszego oczyszczania związku wykorzystano metodę wysokosprawnej chromatografii przeciwwądowej HSCCC (ang. *high speed counter current chromatography*) przy pomocy chromatografu Spectrum

HPCCC (Dynamic Extractions, ang. *high-performance counter current chromatography*). Izolację prowadzono w układzie faz odwróconych, gdzie górna faza organiczna układu dwufazowego, wykonanego z n-heptanu, octanu etylu, metanolu i wody (3:2:3:2), stanowiła fazę stacjonarną. Po całkowitym wypełnieniu kolumny analitycznej fazą stacjonarną, wpompowywano fazę ruchomą (szybkość przepływu 1 ml/min.), równocześnie aparat obracano z prędkością 1600 obrotów/min. Po osiągnięciu równowagi hydrodynamicznej, przez zawór iniekcyjny o pojemności 1 ml, wprowadzano na kolumnę ekstrakt rozpuszczony w dwufazowym układzie rozpuszczalników (60 mg w 1 ml). Retencja w fazie stałej wynosiła 70%. Wyciek z kolumny monitorowano w sposób ciągły za pomocą detektora UV przy 320 nm.

W wyniku rozdzielania 600 mg ekstraktu otrzymano 2 mg docelowego związku. Identyfikację wyodrębnionego związku przeprowadzono przez porównanie czasu retencji i widm UV-DAD z widmami uzyskanymi według wzorców w tych samych warunkach. Czystość ostolu, ustalona metodą HPLC-DAD (ang. *high-performance liquid chromatography with diode-array detection*) wynosiła 99%.

Izolacja umbeliferonu z owoców barszczu (*Heracleum leskovii Grossh*) przeprowadzono według metody opublikowanej przez Kiełbus [Kiełbus, 2013]. Owoce suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej, sproszkowano i ekstrahowano metanolem (100 g w 100 ml). Procedurę powtarzono trzykrotnie, a nadmiar rozpuszczalnika usuwano przy pomocy wyparki rotacyjnej. Izolację przeprowadzono analogicznie do izolacji ostolu, a jako układ dwufazowy zastosowano mieszaninę n-heptanu, octanu etylu, metanolu i wody w stosunku 1:2:1:2. Za pomocą tej metody z 180 mg surowego ekstraktu uzyskano 1,8 mg umbeliferonu o czystości 99% (według analizy HPLC, ang. *high-performance liquid chromatography*).

5.2. Izolacja furanokumaryn

Izolację furanokumaryn z materiału roślinnego wykonano analogicznie do opisanej wcześniej izolacji kumaryn prostych. Ksantotoksyna i bergapten zostały wyodrębnione odpowiednio z owoców pasternaku zwyczajnego (*Pastinaca sativa L.*) i barszczu (*Heracleum leskovii Grossh*) ekstrahowanych dichlorometanem [Skalicka-Woźniak, 2015; 2014], podczas gdy imperatoryna pochodziła z metanolowego ekstraktu arcydzięgla litworu (*Angelica officinalis*) [Budzyńska, 2013]. Izoimperatorynę pozyskano z korzeni arcydzięgla dahurskiego (*Angelica dehurica*), które po wysuszeniu ekstrahowano etanolem, a następnie

octanem etylu. Uzyskane ekstrakty rozdzielano następnie przy użyciu wysokowydajnego chromatografu przeciwprądowego Spectrum (Dynamic Extractions) i kolumny semipreparatywnej (o objętości 137 ml). Układ dwufazowy sporządzano z n-heptanu, octanu etylu, metanolu i wody w stosunku objętościowym 1:1:1:1 dla ksantotoksyny i imperatoryny, 5:5:4:6 dla izoimperatoryny oraz 6:5:6:5 dla bergaptenu. Identyfikacji wyizolowanych związków dokonywano przez analizy HPLC-DAD, a czystość była wyższa niż 98%.

6. Metodyka badawcza

6.1. Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych

Identyfikacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych dokonano stosując metodę barwienia fluorochromami: jodkiem propidionowym (stężenie wyjściowe 0,5 mg/ml) oraz Hoechstem 33342 (stężenie wyjściowe 0,4 mg/ml) [Allen, 2001]. Hodowle, prowadzone na 8-dółkowych szkiełkach LabTek (NuncTM, ThermoFisher), po wcześniejszej inkubacji z odpowiednimi związkami, barwiono roztworem jodku propidyny i Hoechstu 33342 w wodzie destylowanej w stosunku 3:2:5. Po dodaniu 2,5 µl mieszaniny barwiącej do 1 ml pożywki, komórki inkubowano w ciemności w temperaturze 37°C przez 5 minut, po czym usuwano pożywkę. Następnie nakraplano bufor A, zawierający jony Ca²⁺ i Mg²⁺ oraz przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowane preparaty oglądano pod mikroskopem konfokalnym Axiovert 200M z głowicą skanującą LSM 5 PASCAL (Zeiss) przy długości fali 420 nm. W wyniku przenikania Hoechstu 33342 przez nieuszkodzone błony komórkowe obserwowano jasnoniebieską fluorescencję jądra komórkowego z silnie upakowaną chromatyną, typową dla komórek apoptotycznych. Intensywność świecenia, zależna od stopnia skondensowania chromatyny, pozwoliła na odróżnienie silnie fluoryzujących komórek apoptotycznych od nie wykazujących świecenia komórek żywych. Jodek propidyny, mający zdolność do przenikania przez uszkodzone błony, umożliwił identyfikację komórek martwych (nekrotycznych) wykazujących czerwono-różową fluorescencję.

W każdym z wariantów eksperymentalnych zliczano około 1000 komórek w przypadkowo wybranych polach widzenia, a doświadczenie powtarzano trzykrotnie. Wyniki przedstawiono w postaci procentowej, przyjmując jako 100% ilość wszystkich zliczonych komórek.

6.2. Identyfikacja komórek autofagalnych

W celu wizualizacji komórek autofagalnych wykorzystano barwienie oranżem akrydyny [Thomé, 2016]. Hodowle komórkowe, prowadzone na 8-dółkowych szkiełkach typu LabTek (Nunc™, ThermoFisher) inkubowano w ciemności z 5% oranżem akrydyny przez 15 minut w temperaturze 37°C. Następnie płukano trzykrotnie buforem A, po czym nakładano szkiełko nakrywkowe. Preparaty oglądano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Axiovert 200M z głowicą skanującą LSM 5 PASCAL (Zeiss) ($\lambda = 526$ nm). W komórkach autofagalnych obserwowano wówczas czerwoną fluorescencję, znajdujących się na terenie cytoplazmy, ciałek autofagalnych.

W każdym z wariantów eksperymentalnych zliczano około 1000 komórek w przypadkowo wybranych polach widzenia. Każde doświadczenie powtarzano trzykrotnie, a wyniki przedstawiono w postaci procentowej, przyjmując jako 100% ilość wszystkich zliczonych

6.3. Otrzymywanie ekstraktów bezkomórkowych

Hodowle komórkowe, które prowadzono w naczyniach typu Falcon zbierano za pomocą scrapera laboratoryjnego, przenoszono do probówek Eppendorfa i wirowano (12 000 x G, 10 minut). Następnie odrzucano supernatant, a osad komórkowy zawieszano w buforze B i gotowano w łaźni wodnej przez 10 minut, po czym wirowano (12 000 x G, 20 minut). Otrzymany supernatant przenoszono do nowych probówek i wykorzystywano do dalszych analiz.

6.4. Oznaczanie stężenia białka

Do oznaczania stężenia białka w otrzymanych ekstraktach bezkomórkowych wykorzystano metodę Bradford [Bradford, 1976]. Próbkę, zawierającą 0,8 ml wody destylowanej, 1 μ l badanego materiału i 0,2 ml odczynnika Bradford inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym mierzono absorbancję ($\lambda = 595$ nm) wobec próby kontrolnej (1 μ l buforu B zamiast badanego materiału). Ilość białka zawartego w badanej próbce odczytywano z krzywej wzorcowej, wykreślonej z użyciem szeregu rozcieńczeń roztworu wzorcowego albuminy surowicy bydlęcej (BSA, ang. *bovine serum albumin*). Na tej podstawie obliczano ilość białka wykorzystanego do dalszych doświadczeń (80 μ g do badania ekspresji białek oraz 200 μ g do techniki immunoprecypitacji).

6.5. Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym

Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym SDS – PAGE (ang. *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) został przeprowadzony zgodnie z metodą Laemmliego [Laemmli, 1970]. W tym celu sporządzano żel separujący, który wylewano powędry odłuszczone acetonem szklane płytki. Po polimeryzacji wylewano na niego żel zagęszczający, w którym, w celu utworzenia studzienek (tzw. slotów), umieszczano grzebień. Skład żeli przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 3. Skład żelu separującego i zagęszczającego stosowanego do elektroforezy.

Żel separujący		Żel zagęszczający	
~	1,5 M TRIS-HCl pH 8,8 – 3,75 ml	~	0,5 M TRIS-HCl pH 6,8 – 2,5 ml
~	roztwór 30% akrylamidu i 1% bisakrylamidu – 5 ml	~	roztwór 30% akrylamidu i 1% bisakrylamidu – 2 ml
~	10% SDS – 150 μ l	~	10% SDS – 100 μ l
~	10% AMPS – 150 μ l	~	10% AMPS – 100 μ l
~	woda destylowana – 6 ml	~	woda destylowana – 5,3 ml
~	TEMED – 15 μ l	~	TEMED – 10 μ l

Próbki, zawierające 80 μ g białka zawieszonego w buforze B z dodatkiem 0,01% błękitu bromofenolowego i 0,02% β -merkaptoetanolu, gotowano przez 5 minut, po czym umieszczano w slotach utworzonych w żelu poliakrylamidowym. Do przeprowadzenia elektroforezy używano 5-krotnie rozcieńczonego buforu C. Rozdziału białek dokonywano przy stałym napięciu $U=160V$ w kierunku od katody do anody.

6.6. Technika immunoblotingu

Rozdzielone elektroforetycznie białka, znajdujące się w żelu poliakrylamidowym przenoszono na membranę PVDF Immobilon P. W tym celu wykorzystywano również bibułę Whatman 3 MM, którą warstwami układano pomiędzy elektrodami aparatu do transferu półsuchego FastBlot™ (Biometra), według następującej kolejności:

- ~bibuła zwilżona w buforze D
- ~2 bibuły zwilżone w 5-cio krotnie rozcieńczonym buforze D
- ~membrana zwilżona w metanolu
- ~żel poliakrylamidowy płukany w buforze D

~2 bibuły zwilżone 5-cio krotnie rozcieńczonym buforem D

~bibuła zwilżona w buforze D

Transfer prowadzono przez 25 minut przy natężeniu prądu $I=0,2$ A.

Po zakończeniu transferu, membranę umieszczano w 5% odtłuszczonym mleku rozpuszczonym w buforze A na czas 1 h, po czym inkubowano przez całą noc w temperaturze 4°C w roztworze mysich monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko:

~Bcl-2, rozcieńczenie 1:500

~beklinie 1, rozcieńczenie 1:500

~kaspazie 3, rozcieńczenie 1:1000

~PI3K, rozcieńczenie 1:500

~Raf, rozcieńczenie 1:500

~ β -aktynie, rozcieńczenie 1:1000

Po całonocnej inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi, membrany płukano trzy razy (po 10 minut) w buforze A, zawierającym 0,05% Triton X-100, a następnie zostawiano na 2 h w roztworze drugorzędowych przeciwciał antymysich (rozcieńczenie 1:30 000), sprzężonych z fosfatazą alkaliczną. Po upływie tego czasu membrany płukano dwukrotnie w buforze A (po 10 minut) oraz w buforze F (10 minut).

Do wizualizacji badanych białek stosowano substraty dla fosfatazy alkalicznej, które rozcieńczano w 25 ml buforu F:

~1 ml NBT (ang. *nitrotetrazolium blue*; 9 mg w 0,3 ml wody destylowanej i 0,7 ml DMF- ang. *N,N-Dimethylformamide*)

~1 ml BCIP (ang. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*; 4,5 mg w 1 ml DMF)

W tak przygotowanym roztworze, inkubowano membranę przez około 10 minut, po czym płukano w buforze F i pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Otrzymane membrany poddawano analizie ilościowej z wykorzystaniem programu ImageJ (Scion Corporation, USA).

6.7. Badanie aktywności enzymatycznej metodą ELISA

6.7.1. Określanie aktywności kaspazy 3

Do oceny poziomu aktywności kaspazy 3 wykorzystano SensoLyte®AMC Caspase Substrate Sampler Kit (Anaspec). Po usunięciu pożywki, komórki hodowane na płytkach 6-dołkowych poddawano 30 minutowej inkubacji z buforem do lizy (Lysis Buffer, 300 μ l/dołek) w temperaturze 4°C. Następnie komórki zbierano za pomocą scrapera laboratoryjnego, a otrzymaną zawiesinę komórkową przenoszono do probówek Eppendorfa i wirowano (2 500 x G, 10 minut). Uzyskany supernatant (50 μ l) przenoszono do znajdujących się w zestawie 96-dołkowych płytek, po czym przez 30 s wytrząsano z dodatkiem 50 μ l substratu dla kaspazy 3. Aktywność badanego enzymu oznaczano po 30 minutach przy pomocy czytnika mikropłytek 800™ TS Absorbance Reader (BioTek) poprzez pomiar intensywności fluorescencji AMC (ang. *7-aminoacoumarin*) przy długości fali λ *Ex/Em* = 354/422 nm. Próbkę negatywną stanowił firmowy bufor do lizy.

6.7.2. Określenie aktywności AKT/ERK

Aktywność kinaz AKT i ERK oznaczano wykorzystując AKT/ERK Activation InstantOne ELISA™ Kit (Invitrogen by ThermoFisher). Po usunięciu pożywki, hodowle komórkowe, prowadzone na 24-dołkowych płytkach, poddawano lizie poprzez 30 minutową inkubację z firmowym buforem do lizy (Lysis Buffer, 100 μ l/dołek) w temperaturze 4°C. Przygotowane lizaty przenoszono do probówek Eppendorfa i wirowano (10 000 x G, 10 minut). Następnie pobierano supernatant (50 μ l) i przenoszono do wchodzących w skład zestawu, opłaszczonych odpowiednimi przeciwciałami płytek 96-dołkowych, po czym dodawano 50 μ l przygotowanej uprzednio mieszaniny przeciwciał (Capture Antibody Reagent i Detection Antibody, 1:1). Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej trzykrotnie płukano firmowym buforem (Wash Buffer). W celu wywołania reakcji enzymatycznej do przygotowanych próbek dodawano 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę (TMB) i inkubowano przez 30 minut. Po tym czasie zatrzymywano reakcję (100 μ l Stop Solution), a intensywność barwy powstałych kompleksów odczytywano przy pomocy czytnika mikropłytek 800™ TS Absorbance Reader (BioTek) przy λ =450 nm.

6.8. Blokowanie ekspresji kinazy PI3K i Raf

Ekspresję genów kodujących białka PI3K i RAF blokowano wykorzystując specyficzne siRNA. Hodowlę o gęstości 2×10^5 prowadzoną na 8-dółkowych szkiełkach typu Lab-Tek™ (Nunc™, ThermoFisher) w warunkach opisanych w rozdziale III (5. Linie komórkowe), płukano trzykrotnie pożywką DMEM:F-12 Ham (3:1), pozbawioną surowicy i antybiotyków. Następnie do każdego dołka dodawano mieszaninę blokującą, zawierającą 2 μ l specyficznego siRNA, 2 μ l odczynnika do transfekcji (Transfection Reagent) oraz 250 μ l pożywki, pozbawionej surowicy i antybiotyków. Komórki inkubowano przez 5 godzin w 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności, po czym mieszaninę blokującą uzupełniano pożywką (250 μ l), zawierającą 20% surowicy bydlęcej oraz 200 μ g/ml antybiotyków. Po upływie 18 h pożywkę wymieniano na nową (DMEM:F-12 Ham 1:1, 10% FBS, 100 μ g/ml antybiotyki), a stransfekowane komórki poddawano 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami i wykorzystywano do dalszych analiz.

6.9. Koimmunoprecypitacja

Tworzenie kompleksów Bcl-2:beklina 1 oceniano metodą wytrącania kompleksów białkowych z frakcji cytoplazmatycznej komórek z użyciem swoistych przeciwciał – immunoprecypitacji. Po usunięciu pożywki i mechanicznym oderwaniu komórek od dna naczyń typu Falcon (Nunc™, ThermoFisher), dodawano 1 ml buforu RIPA i pozostawiano w lodzie na 10 minut. Po tym czasie zawiesinę komórek przenoszono do probówek Eppendorfa i wirowano (10 000 x G, 4°C, 10 minut). Uzyskany supernatant przenoszono do nowych probówek, do których dodawano 10 μ l przeciwciał pierwszorzędowych (anty-beklina 1 i anty-Bcl-2) i pozostawiano na 2 godziny w temperaturze 4°C. Następnie utworzone kompleksy przeciwciało:białko wychwytywano za pomocą białka A sprzężonego z agarozą (20 μ l) w trakcie godzinnej inkubacji. Po odwirowaniu (1000 x G, 4°C, 5 minut) supernatant odrzucano, a powstałe immunoprecypitaty trzykrotnie płukano buforem RIPA, po czym zawieszano w buforze B z dodatkiem 0,01% błękitu bromofenolowego i 0,02% β -merkaptoetanolu i poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu oraz immunoblotingowi.

6.10. Test rysy

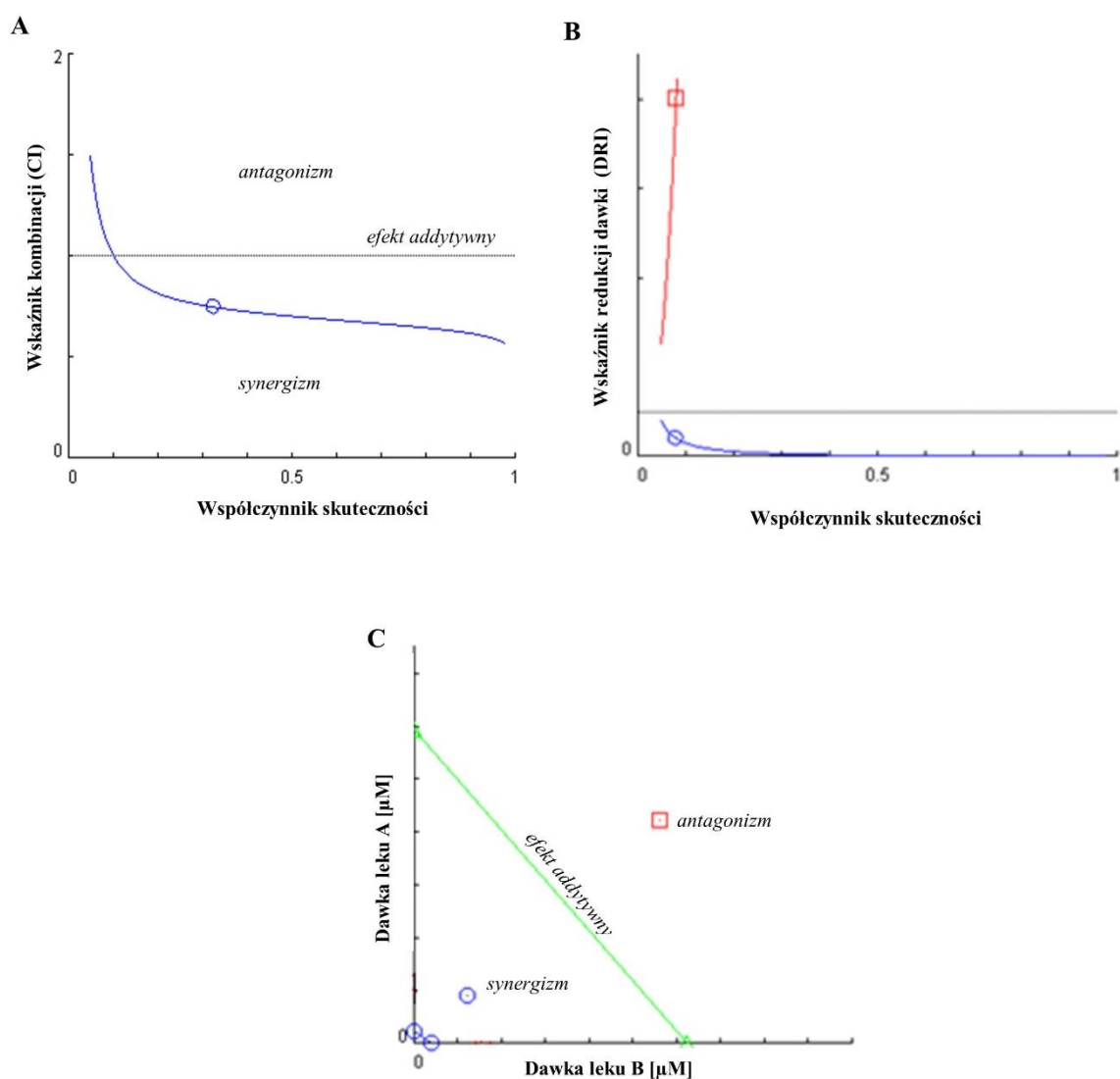
Zmiany potencjału migracyjnego komórek nowotworowych oceniano za pomocą testu rysy. Hodowle o gęstości $2,5 \times 10^5$ prowadzono na szalkach do hodowli o średnicy 4 cm (NuncTM, ThermoFisher) w standardowych warunkach (37°C, 95% wilgotności, 5% CO₂). W uzyskanej monowarstwie, za pomocą końcówki pipety automatycznej (P300) wykonywano rysę, po czym usuwano pożywkę, zawierającą oderwane od podłoża komórki, a płytki płukano dwukrotnie buforem A. Następnie dodawano świeżą pożywkę hodowlaną (DMEM:F12 1:1, 10% FBS, 100 µg/ml antybiotyki), a po 24 godzinach szacowano liczbę komórek, które migrowały do obszaru rysy, zarówno w hodowlach kontrolnych (0,01% DMSO), jak i poddanych inkubacji z badanymi związkami. W celu wizualizacji komórek, zastosowano barwienie metodą May-Grünwald-Giemsy. Po usunięciu pożywki i przepłukaniu komórek buforem A wzbogaconym jonami Ca²⁺ i Mg²⁺, dodawano 1 ml barwnika May-Grünwalda, który po 3 minutach uzupełniano 1 ml wody destylowanej. Po upływie kolejnych 3 minut mieszaninę usuwano, komórki przepłukiwano wodą destylowaną i dodawano 1 ml barwnika Giemsa (rozcieńczenie 1:20) na 30 minut. Następnie odczynnik usuwano, a komórki płukano wodą destylowaną i pozostawiano do wyschnięcia. Tak przygotowane preparaty analizowano za pomocą mikroskopu BX51 (Olympus), a odległości między czołami zarysowań szacowano za pomocą programu CellSans.

Kontrolę negatywną stanowił preparat z rysą nie poddany działaniu badanych związków, wybarwiony bezpośrednio po jej wykonaniu.

6.11. Test Chou-Talalay

Stężenia związków użytych w kombinacji ustalono za pomocą programu CompuSyn, wykorzystującego metodę opracowaną przez Chou i Talalaya [Chou, 2010]. Na podstawie ilości komórek apoptotycznych (%), obliczono wskaźnik kombinacji (CI, ang. *combination index*) i wskaźnik redukcji dawki (DRI, ang. *dose reduction index*) oraz sporządzono wykresy przedstawiające zależności tych wielkości od współczynnika skuteczności leczenia (1 oznacza 100% apoptozę). CI <1, CI = 1 i CI > 1 wskazują odpowiednio na efekt synergistyczny, addytywny i antagonistyczny zastosowanej kombinacji związków (Rycina 22A). DRI reprezentuje krotność redukcji dawki związków podczas terapii skojarzonej, w porównaniu ze stężeniem leku aplikowanego pojedynczo, wywołującego ten sam efekt (Rycina 22B). DRI >1 świadczy o zmniejszeniu dawki leku stosowanego w kombinacji, w porównaniu do monoterapii. Dodatkowo, w celu określenia optymalnej dawki leczenia

sporządzono izobologram, poprzez odłożenie na obu osiach wykresu dawek leków, mających jednakowe działanie przeciwnowotworowe (50%, 75% i 90% komórek apoptotycznych). Prosta łącząca oba punkty obrazuje efekt addytywny, a współrzędne znajdujących się na niej punktów określają dawki leków, które w terapii skojarzonej dają oczekiwane skutki przy $CI=1$ (interakcja addytywna). Punkty znajdujące się poniżej prostej wyznaczają optymalne dawki leków przy założeniu synergizmu ich działania, z kolei dawki użyte przy interakcji antagonistycznej powinny znajdować się nad linią efektu addytywnego (Rycina 22C).



Rycina 24. Schemat wykresów zależności wskaźnika kombinacji (A) i wskaźnika redukcji dawki (B) od współczynnika skuteczności oraz izobologramu (C), sporządzonych za pomocą programu CompuSyn.

6.12. Analiza statystyczna

Oceny statystycznej dokonano przy pomocy programu Statistica (StatSoft, Polska), stosując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA (one-way ANOVA) i test post-hoc Dunnett'a. Wyniki istotne statystycznie oznaczono za pomocą „*”, „+” i „#” dla $p < 0,05$. Na wykresach oprócz istotności statystycznej przedstawiono odchylenie standardowe wyznaczone na podstawie 3 powtórzeń.

IV. WYNIKI

1. Wpływ kumaryn na indukcję zaprogramowanej śmierci w ludzkich komórkach glejaka

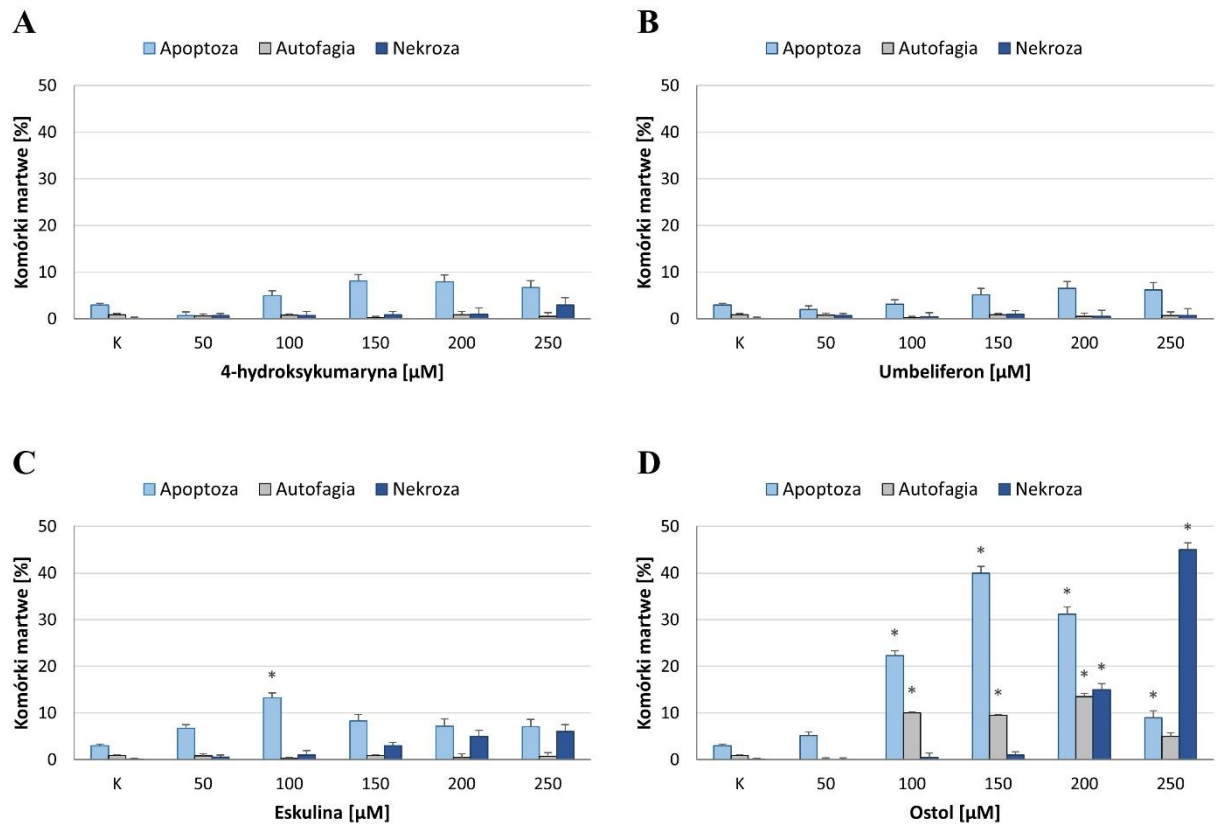
W celu wykrycia komórek apoptotycznych, autofagalnych i nekrotycznych komórki gwiazdziaka anaplastycznego (MOGGCCM) i glejaka wielopostaciowego (T98G) wybarwiono specyficznymi fluorochromami, odpowiednio Hoechst 33342, oranż akrydyny i jodek propidyny, według metody opisanej szczegółowo w rozdziale Materiały i metody (III 6.1 i III 6.2).

1.1. Kumaryny proste

Komórki MOGGCCM i T98G poddano 24-godzinnej inkubacji z kumarynami prostymi (4-hydroksykumaryną, umbeliferonem, eskuliną i ostolem) w stężeniach końcowych: 50, 100, 150, 200 oraz 250 μM . Uzyskane wyniki (Ryc. 25 i 26) dowodzą, że efektywność zastosowanych związków we wprowadzaniu komórek na drogę zaprogramowanej śmierci zależała zarówno od ich koncentracji jak i linii komórkowej.

W komórkach gwiazdziaka anaplastycznego najskuteczniejsza okazała się aplikacja ostolu w stężeniu 150 μM (Ryc. 25D). Pochodna kumaryny eliminowała wówczas 40% komórek na drodze apoptozy i 10% na drodze autofagii. Wyższymi stężeniami związku ($\geq 200 \mu\text{M}$) towarzyszyła dodatkowo nekroza, którą po aplikacji 250 μM ostolu obserwowano w 45% populacji. Skuteczność pozostałych kumaryn prostych w indukcji zaprogramowanej śmierci była znacznie niższa w porównaniu do ostolu (Ryc. 25A-C). Wśród nich jedynie eskulina w stężeniu 100 μM indukowała apoptozę w 14% komórek. Zarówno niższe jak i wyższe stężenia związku, podobnie jak pozostałe hydroksykumaryny (4-hydroksykumaryny i umbeliferonu) były mało skuteczne w indukcji zaprogramowanej śmierci, a uzyskane wyniki nie były istotne pod względem statystycznym.

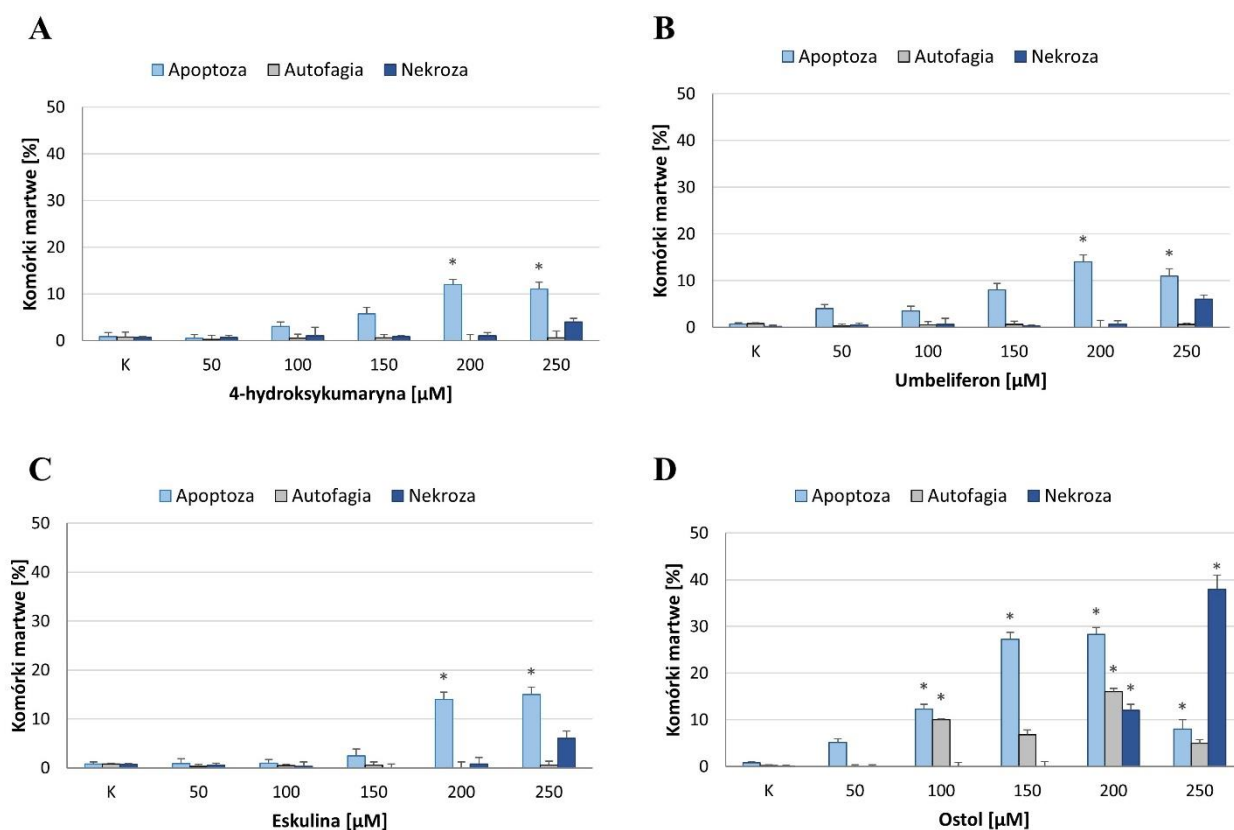
MOGGCCM



Rycina 25. Wpływ 4-hydroksykumaryny (A), umbeliferonu (B), eskuliny (C) i ostolu (D) w stężeniach 50-200 µM na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznej (MOGGCCM); K – kontrola; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

Podobnie jak w przypadku gwiazdziaka anaplastycznego, również w komórkach glejaka wielopostaciowego najskuteczniejszy okazał się ostol (Ryc. 26D). Związek w stężeniu 150 μM indukował apoptozę i autofagię, odpowiednio w 27% i 7% komórek. Wyższe stężenie pochodnej kumaryny (200 μM) było równie skuteczne w eliminowaniu komórek glejaka na drodze zaprogramowanej śmierci, jednak towarzyszyła temu autofagia (16%) oraz nekroza (13%). Martwica była dominującym typem śmierci komórkowej po aplikacji 250 μM ostolu. Aktywność proapoptotyczna pozostałych związków była istotnie statystyczna i znacząca dopiero w stężeniach ≥ 200 μM (Ryc. 26A-C). 4-hydroksykumaryna, umbeliferon i eskulina indukowały wówczas apoptozę w zakresie 10-15% komórek GBM. Badane związki w stężeniu 250 μM inicjowały dodatkowo nekrozę.

T98G

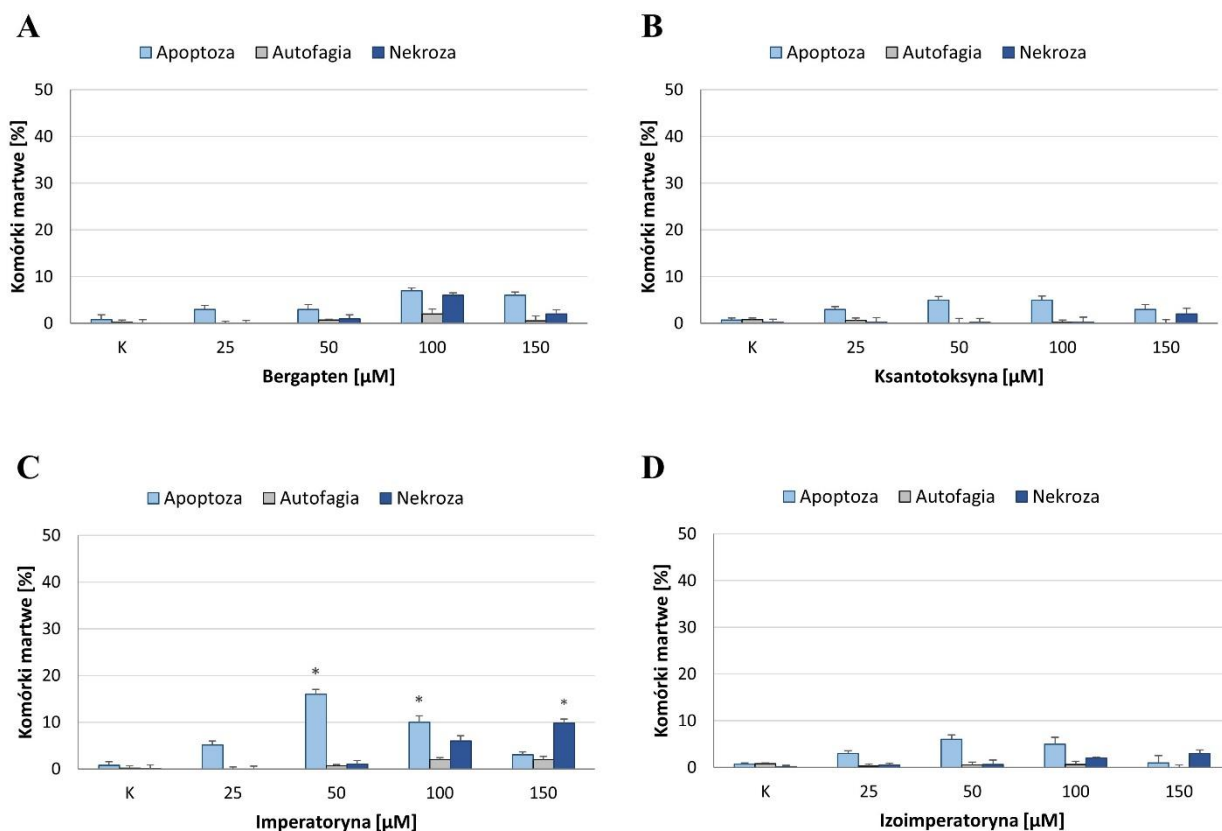


Rycina 26. Wpływ 4-hydroksykumaryny (A), umbeliferonu (B), eskuliny (C) i ostolu (D) w stężeniach 50-200 μM na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach glejaka wielopostaciowego (T98G); K – kontrola; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

1.2. Furanokumaryny

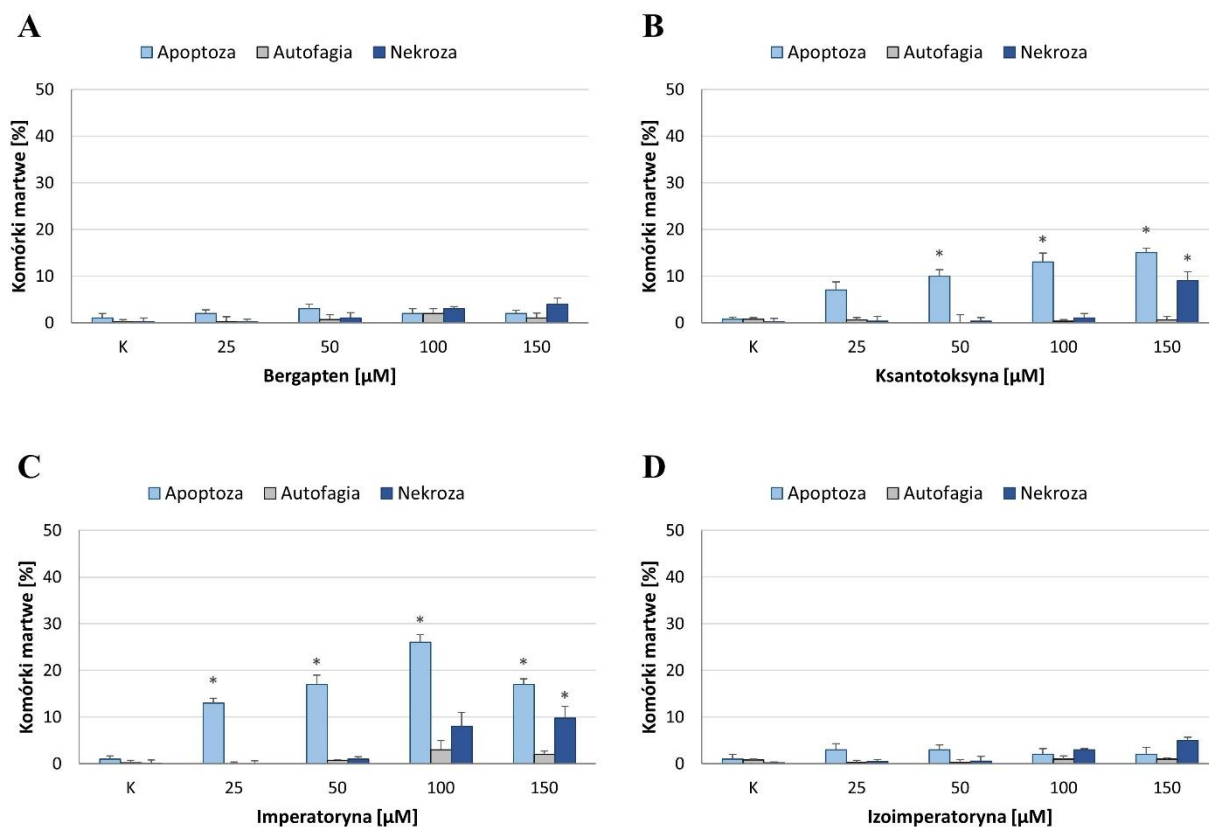
Obserwacja mikroskopowa komórek MOGGCCM i T98G poddanych 24-godzinnej inkubacji z furanokumarynami: bergaptenem, ksantotoksyną, imperatoryną i izoimperatoryną w stężeniach końcowych 25-150 μM , wykazała, że skuteczność zastosowanych związków zależała od koncentracji oraz linii komórkowej. W linii gwiazdździaka anaplastycznego najskuteczniejszym induktorem apoptozy była imperatoryna (Ryc. 27C). Związek ten najefektywniej działał w stężeniu 50 μM , powodując apoptozę około 17% komórek, podczas gdy wyższym stężeniom (≥ 100 μM) towarzyszyła dodatkowo nekroza. Aktywność przeciwnowotworowa pozostałych związków była znikoma, a odsetek komórek AA, które uległy apoptozie nie przekraczał 6% (Ryc. 27A, B, D).

MOGGCCM



Rycina 27. Wpływ bergaptenu (A), ksantotoksyny (B), imperatoryny (C) i izoimperatoryny (D) w stężeniach 25-150 μM na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdździaka anaplastycznego (MOGGCCM); K – kontrola; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

T98G



Rycina 28. Wpływ bergaptenu (A), ksantotoksyny (B), imperatoryny (C) i izoimperatoryny (D) w stężeniach 25-150 μM na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach glejaka wielopostaciowego (T98G); K – kontrola; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

W przypadku komórek glejaka wielopostaciowego, podobnie jak gwiazdziaka anaplastycznego, najskuteczniejszym induktorem apoptozy była imperatoryna (Ryc. 28C). Furanokumaryna w stężeniu 50 μM i 100 μM inicjowała proces odpowiednio w 17% i 25% populacji, jednak wyższym koncentracjom związku (≥ 100 μM) towarzyszyła dodatkowo nekroza (około 10%). Wysoką skuteczność w indukcji apoptozy wykazała również ksantotoksyna w stężeniach ≥ 100 μM (Ryc. 28B), lecz po aplikacji 150 μM związku obserwowano dodatkowo nekrozę. Izomery ksantotoksyny i imperatoryny, odpowiednio bergapten i izoimperatoryna, nie miały istotnego wpływu na indukcję zaprogramowanej śmierci w linii T98G.

2. Przeciwnowotworowe właściwości skojarzonego działania kumaryn oraz temozolomidu

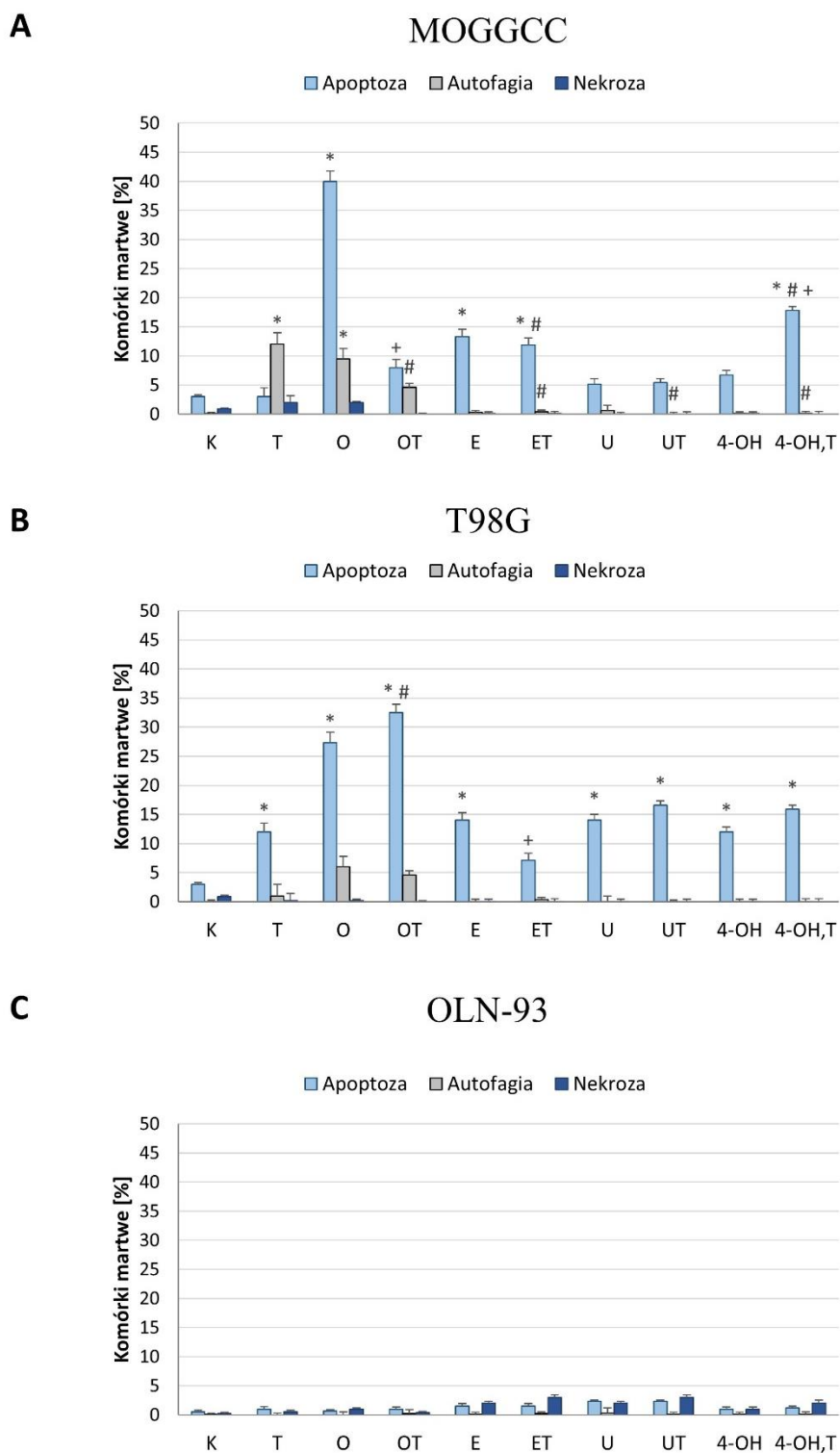
Jak wynika z danych literaturowych jednoczesne wykorzystanie kilku związków o różnych mechanizmach działania skuteczniej eliminuje komórki nowotworowe na drodze zaprogramowanej śmierci niż aplikacja pojedynczych preparatów. Dlatego też, obok pojedynczej inkubacji z kumarynami, zastosowano ich kombinację z temozolomidem, cytostatykiem stosowanym w leczeniu glejaków. Szczegółowy schemat skojarzonej aplikacji został umieszczony w rozdziale Materiały i metody (III 4). Stężenia związków wykorzystane w jednoczesnej aplikacji zostały dobrane eksperymentalnie oraz potwierdzone testem Chau-Talalay (Rozdział VII: Suplement – Ocena skuteczności aplikacji skojarzonej).

2.1. Wpływ skojarzonej aplikacji kumaryn oraz temozolomidu na indukcję zaprogramowanej śmierci

2.1.1. Kumaryny proste + temozolomid

Wyniki uzyskane po 24 godzinach inkubacji komórek MOGGCCM z samym temozolomidem wykazały, że cytostatyk był skutecznym induktorem autofagii, inicjując ten proces w około 12% komórek. Dodatkowa aplikacja z kumarynami prostymi, takimi jak: 4-hydroksykumaryna, umbeliferon, eskulina i ostol przekierowała proces zaprogramowanej śmierci z autofagii na apoptozę, a skuteczność jednoczesnej inkubacji zależała od zastosowanych związków.

Temozolomid w połączeniu z ostolem znacząco zmniejszał proapoptotyczne właściwości kumaryny, obniżając ilość komórek apoptotycznych z 40% do 8%. Towarzyszył temu spadek autofagii do około 5%. Antagonizm działania wspomnianych związków został potwierdzony testem Chau-Talalay (Rozdział VII). W przypadku eskuliny i umbeliferonu aplikacja równoczesna z cytostatykiem nie wpływała na aktywność przeciwnowotworową kumaryn prostych, podczas gdy połączenie działania TMZ z 4-hydroksykumaryną wzmacniało właściwości proapoptotyczne, indukując ten proces w 18% komórek w porównaniu do pojedynczej aplikacji 4-OH ($\approx 7\%$).



Rycina 29. Wpływ równoczesnej aplikacji kumaryn prostych z temozolomidem na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B) oraz w prawidłowych oligodendrocytach OLN-93 (C); K – kontrola, T – temozolomid (MOGGCCM – 100 μ M, T98G – 50 μ M), O – ostol (150 μ M), E – eskulina (200 μ M), U – umbeliferon (200 μ M), 4-OH – 4-hydroksykumaryna (200 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

Komórki glejaka wielopostaciowego okazały się bardziej podatne na indukcję zaprogramowanej śmierci pod wpływem aplikacji równoczesnej w porównaniu do linii gwiazdziaka anaplastycznego (Ryc. 29B), a dominującym typem śmierci była apoptoza. Pojedyncza inkubacja komórek T98G z temozolomidem inicjowała ten proces w ok. 12% komórek. Dodatkowa aplikacja ostolu zwiększyła odsetek komórek apoptotycznych z 12% po podaniu samego TMZ oraz 27% po inkubacji z ostolem, do 33%, co świadczy o synergizmie działania wspomnianej kombinacji związków (Rozdział VII). Pozostałe kumaryny proste nie miały istotnego wpływu na aktywność przeciwnowotworową cytostatyku. Jedynie połączenie z eskuliną redukowało niemal dwukrotnie odsetek komórek apoptotycznych w porównaniu do pojedynczej kumaryny.

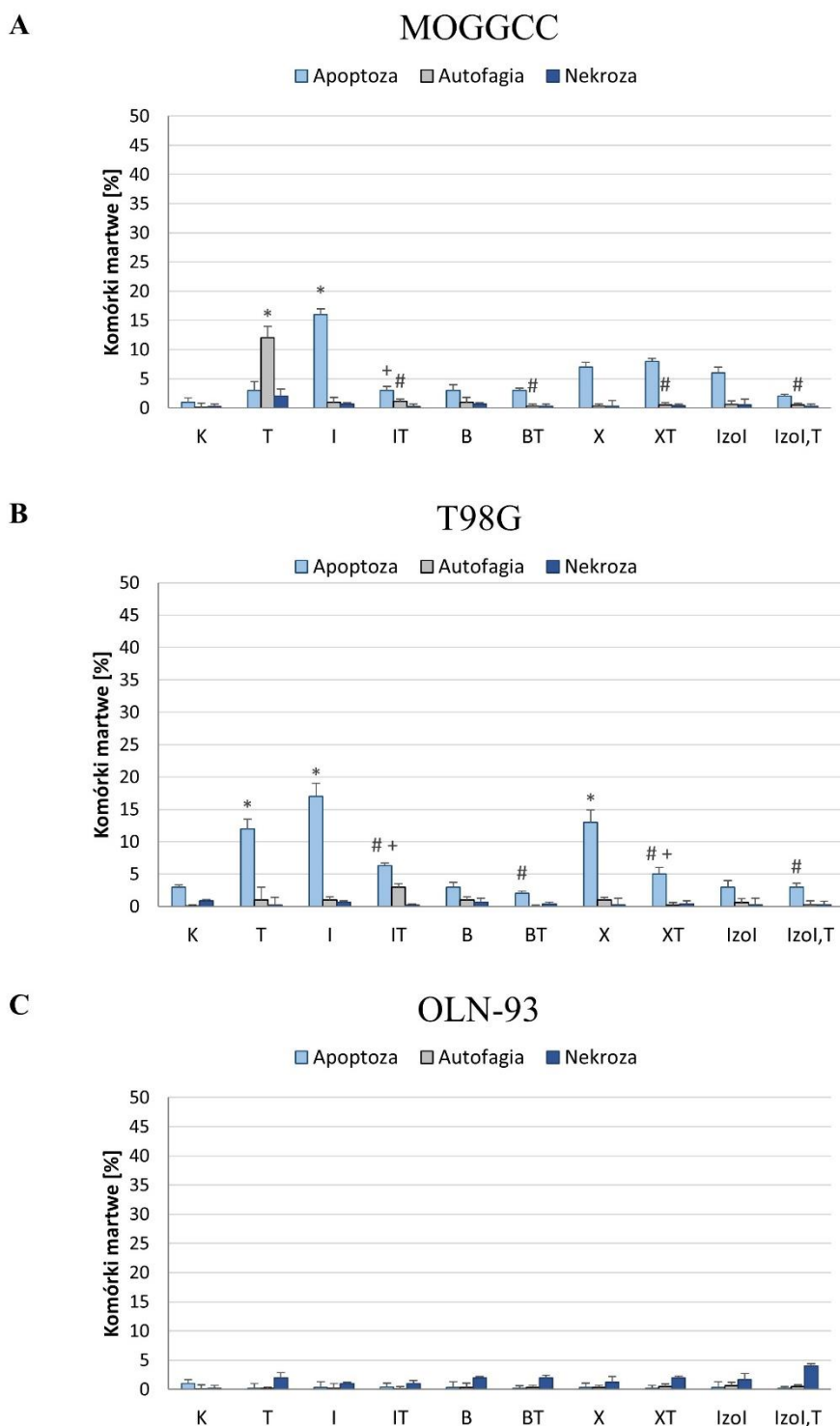
Skojarzone działanie temozolomidu oraz badanych kumaryn prostych nie miało istotnego wpływu na indukcję nekrozy. Nie wykazywało również działania cytotoksycznego w stosunku do prawidłowej linii oligodendrocytów OLN-93 (Ryc. 29C).

2.1.2. Furanokumaryny + temozolomid

Analiza mikroskopowa komórek gwiazdziaka anaplastycznego, poddanych równoczesnej inkubacji z temozolomidem i badanymi furanokumarynami (imperatoryną, bergaptenem, ksantotoksyną i izoimperatoryną) wykazała, że pochodne kumaryny niemal całkowicie niwelowały zdolność cytostatyku do indukcji autofagii, a dominującym typem śmierci była apoptoza (Ryc. 30A).

W linii gwiazdziaka anaplastycznego, najlepszymi induktorami apoptozy okazały się imperatoryna (17%) oraz TMZ (12%) w pojedynczej aplikacji. Co ciekawe, połączenie działania obydwu tych związków okazało się antagonistyczne, co potwierdzono testem Chau-Talalay (Rozdział VII). Odsetek komórek apoptotycznych nie przekraczał wówczas 3%. W przypadku kombinacji temozolomidu z pozostałymi furanokumarynami (bergaptenem, ksantotoksyną i izoimperatoryną) nie odnotowano istotnych zmian w aktywności proapoptotycznej badanych związków w porównaniu do pojedynczej aplikacji.

W linii T98G, skojarzone działanie temozolomidu oraz badanych furanokumaryn było mniej skuteczne w eliminowaniu komórek na drodze zaprogramowanej śmierci niż pojedyncza aplikacja. Wszystkie badane furanokumaryny znacząco zmniejszały wrażliwość komórek glejaka na indukcję apoptozy pod wpływem temozolomidu (Ryc. 30B). Jednocześnie cytostatyk zmniejszał właściwości proapoptotyczne imperatoryny i ksantotoksyny.



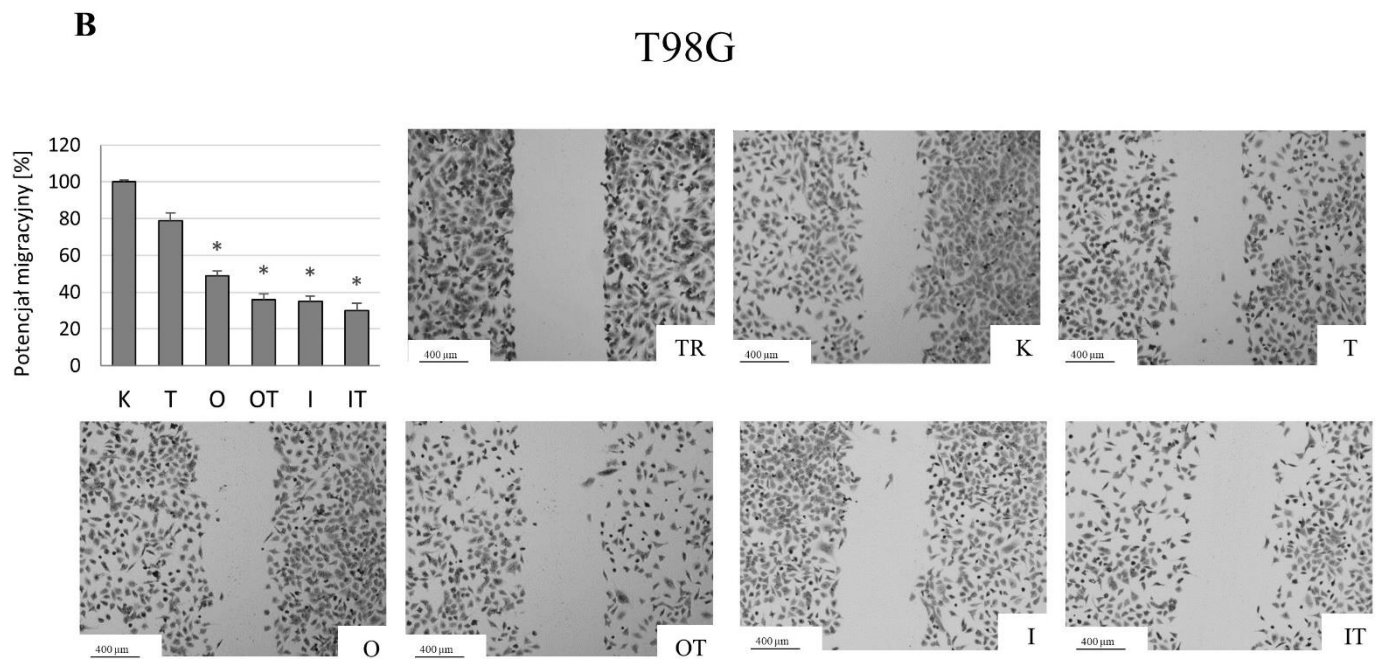
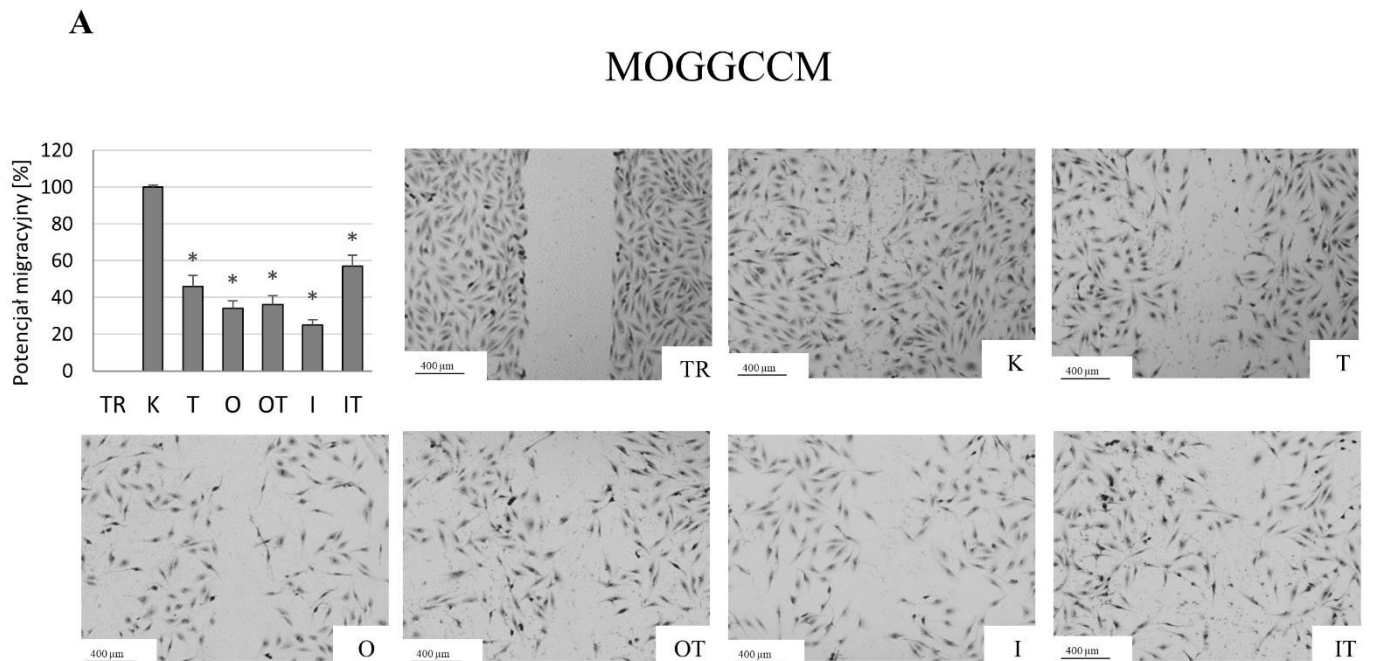
Rycina 30. Wpływ równoczesnej aplikacji furanokumaryn z temozolomidem na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B) oraz w prawidłowych oligodendrocytach (C); K – kontrola, T – temozolomid (MOGGCCM – 100 μ M, T98G – 50 μ M), I – imperatoryna (50 μ M), B – bergapten (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), X – ksantotoksyna (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), IzoI – izoimperatoryna (25 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

Podobnie jak w przypadku kumaryn prostych, furanokumaryny w połączeniu z TMZ nie inicjowały śmierci nekrotycznej w komórkach gwiaździka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego. W hodowli oligodendrocytów, poziom apoptozy, autofagii i nekrozy, indukowanej przez temozolomid oraz furanokumaryny, w pojedynczej i skojarzonej aplikacji, był zbliżony do kontrolnego (Ryc. 30C).

Na podstawie otrzymanych wyników, do dalszych badań wybrano ostol z grupy kumaryn prostych oraz imperatorynę jako przedstawiciela furanokumaryn, testując ich właściwości przeciwnowotworowe w aplikacji pojedynczej oraz skojarzonej z temozolomidem.

2.2. Wpływ ostolu, imperatoryny i temozolomidu na potencjał migracyjny

Obok aktywności proapoptotycznej, bardzo duże znaczenie przy opracowywaniu nowych farmakologicznych strategii terapeutycznych odgrywają właściwości hamujące migrację komórek nowotworowych testowanych związków. Z tego względu, za pomocą testu rysy, sprawdzono wpływ ostolu, imperatoryny i temozolomidu w pojedynczej oraz jednoczesnej aplikacji na potencjał migracyjny badanych komórek glejaków. Jak wynika z przeprowadzonych badań, zarówno kumaryny jak i temozolomid, we wszystkich wariantach, skutecznie zmniejszyły mobilność komórek MOGGCCM (Ryc. 31A). Najskuteczniejsze okazały się same kumaryny, hamujące migrację o 64% w przypadku ostolu i 75% w przypadku imperatoryny. Skojarzone działanie pochodnych kumaryny z TMZ było mniej skuteczne. W przypadku komórek T98G, podobnie jak w linii MOGGCCM, ostol, imperatoryna oraz temozolomid, podawane pojedynczo i razem, skutecznie hamowały migrację komórek (Ryc. 31B). Co ciekawe, w tej linii aplikacja skojarzona była skuteczniejsza od pojedynczej inkubacji, a najniższy potencjał migracyjny obserwowano po równoczesnym podaniu imperatoryny i temozolomidu.



Rycina 31. Wpływ ostolu i imperatoryny, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na mobilność ludzkich komórek gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); TR- test rysy, K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

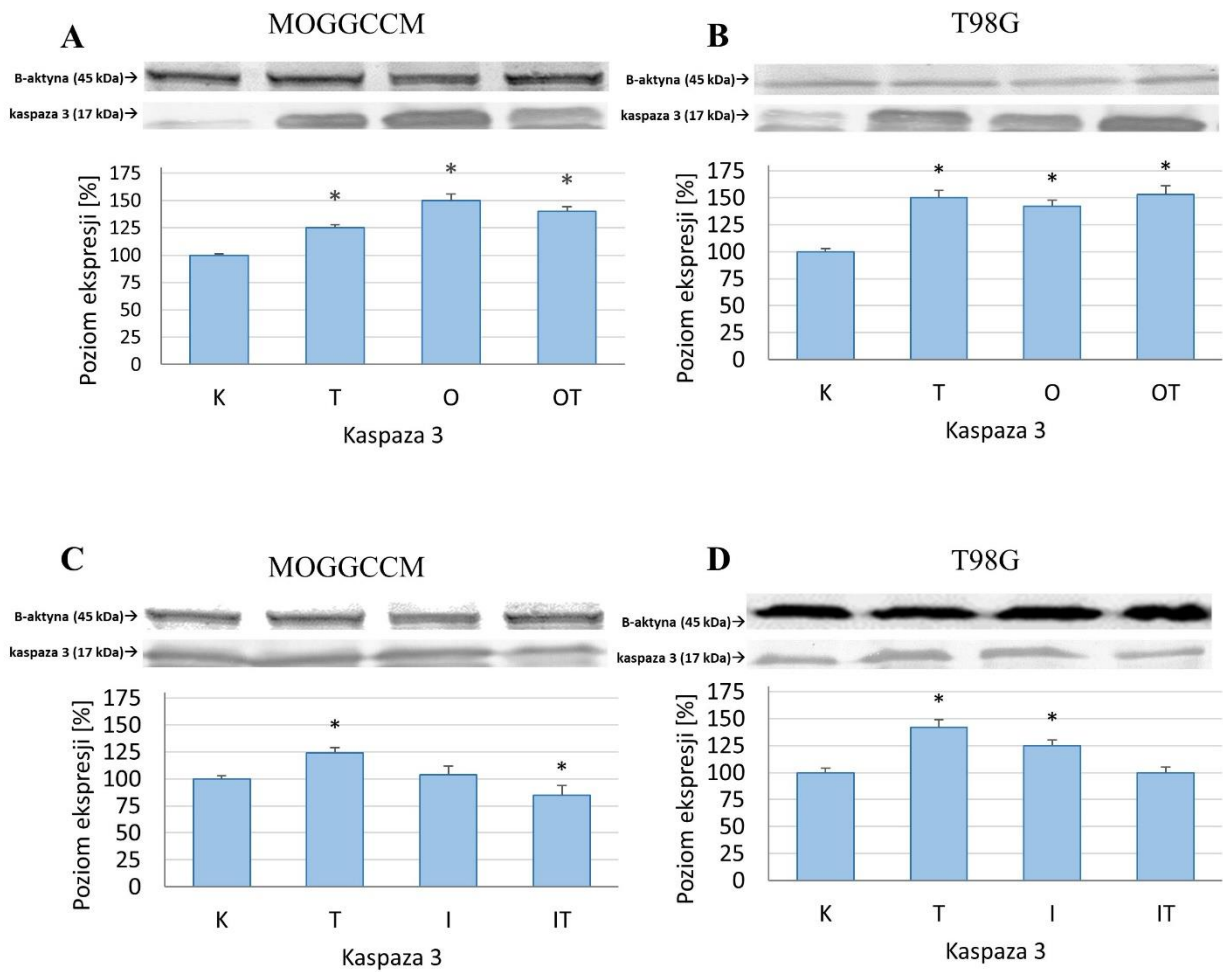
2.3. Wpływ ostolu, imperatoryny i temozolomidu na molekularne mechanizmy zaprogramowanej śmierci w glejakiach

Procesy śmierci komórkowej są ściśle regulowane na poziomie molekularnym przez specyficzne białka markerowe. W przypadku apoptozy kluczową rolę odgrywają kaspazy, w szczególności kaspaza 3, podczas gdy autofagia podlega regulacji przez beclinę 1. Białko Bcl-2 z kolei stanowi swoistego rodzaju molekularny przełącznik pomiędzy oboma typami zaprogramowanej śmierci komórkowej.

2.3.1. Poziom i aktywność kaspazy 3

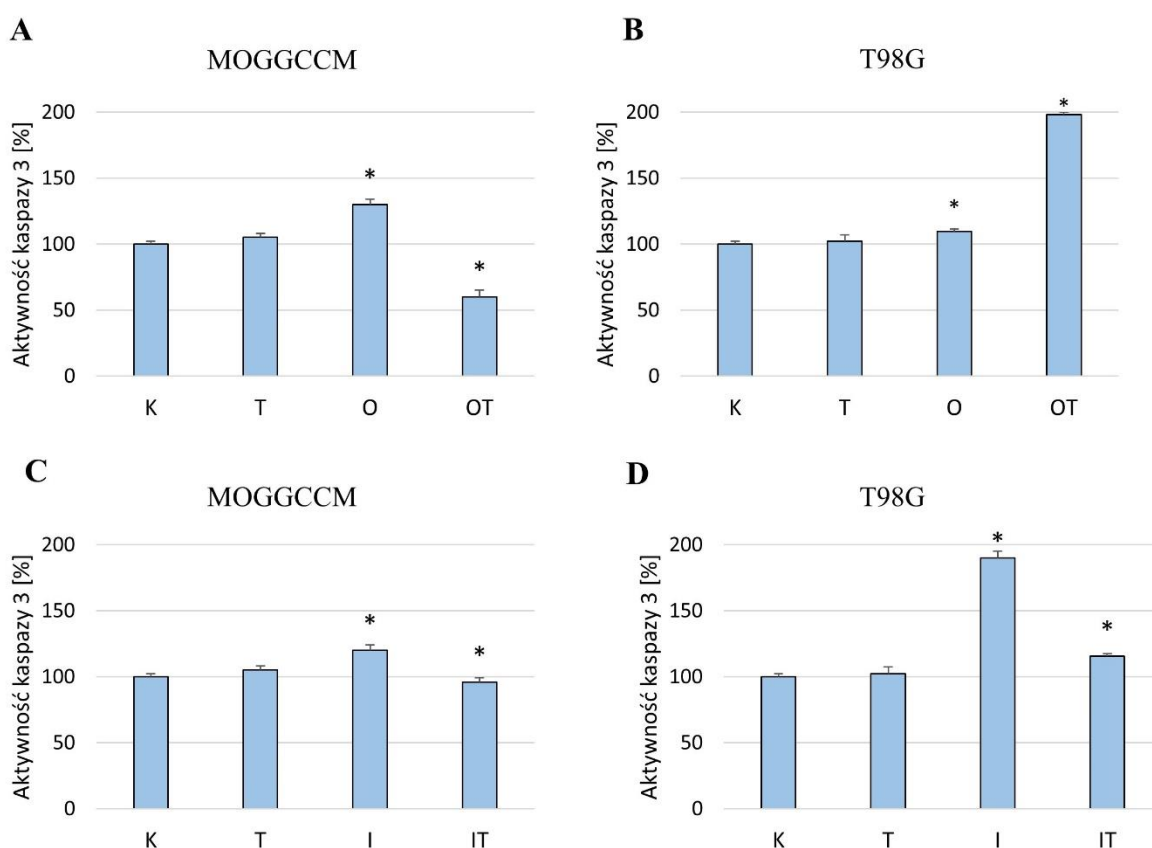
Wyniki uzyskane po 24-godzinnej inkubacji komórek glejaka z temozolomidem wykazały, że cytostatyk zwiększał poziom aktywnej formy kaspazy 3 w linii T98G o 50% w stosunku do kontroli, zaś w MOGGCCM o 25% (Ryc. 32). Po pojedynczej aplikacji ostolu odnotowano blisko 1,5-krotnie wyższy poziom enzymu w obu typach glejaków (Ryc. 32A,B). Znacznie mniej skuteczna od ostolu okazała się imperatoryna (Ryc. 32C,D). Furanokumaryna co prawda zwiększała ilość kaspazy 3 w komórkach GBM o ok. 25%, jednak nie miała wpływu na poziom tego białka w komórkach gwiazdki anaplastycznego.

Wpływ jednoczesnej inkubacji komórek glejaka z temozolomidem był porównywalny do zastosowania pojedynczych związków. W obu liniach komórkowych odnotowano niemal 1,5-krotny wzrost poziomu kaspazy 3 względem kontroli. Połączenie cytostatyku i imperatoryny okazało się zdecydowanie mniej efektywne w porównaniu do pojedynczej aplikacji związków, a ilość białka znacznie niższa od poziomu obserwowanego po inkubacji tylko z temozolomidem lub imperatoryną.



Rycina 32. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji kaspazy 3 w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

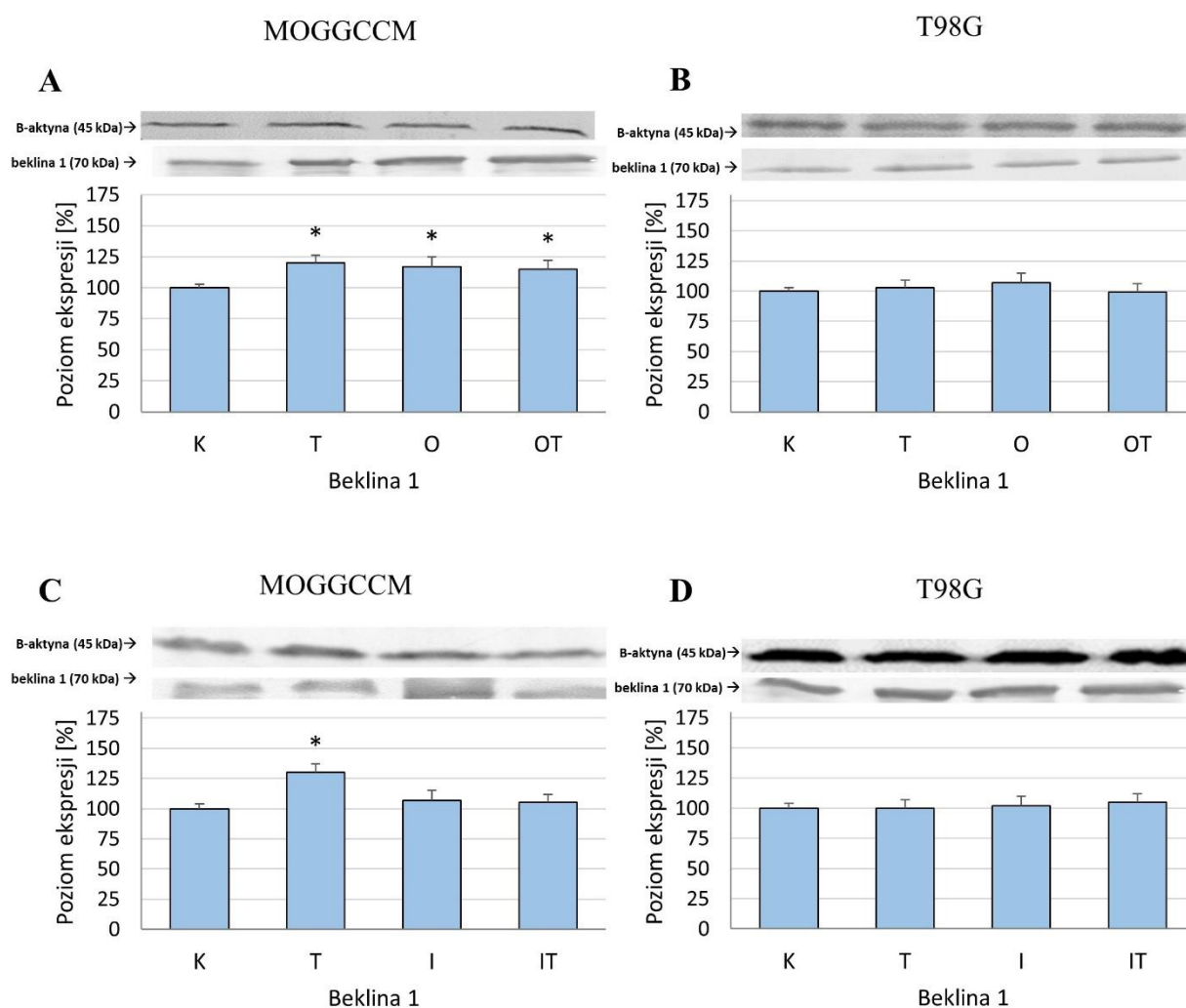
W indukcji zaprogramowanej śmierci nie tylko poziom, ale również aktywność kaspazy 3 ma ogromne znaczenie poznawcze. Dlatego też, w celu potwierdzenia wiarygodności wyników uzyskanych techniką immunoblotingu, zbadano aktywność kaspazy 3. Odnotowano wówczas, że obie pochodne kumaryny istotnie pobudzały aktywność białka w obu liniach komórkowych (Ryc. 33). W komórkach gwiaździsta anaplastycznego najskuteczniejsza była pojedyncza aplikacja ostolu, podczas gdy w komórkach GBM efektywniejsza okazała się imperatoryna. Co ciekawe, jednoczesna inkubacja z temozolomidem i z ostolem bądź imperatoryną, zmniejszała aktywność kaspazy 3 w komórkach AA, zwiększając ją z kolei w komórkach glejaka wielopostaciowego.



Rycina 33. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na aktywność kaspazy 3 w ludzkich komórkach gwiaździsta anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

2.3.2. Poziom bekliny 1

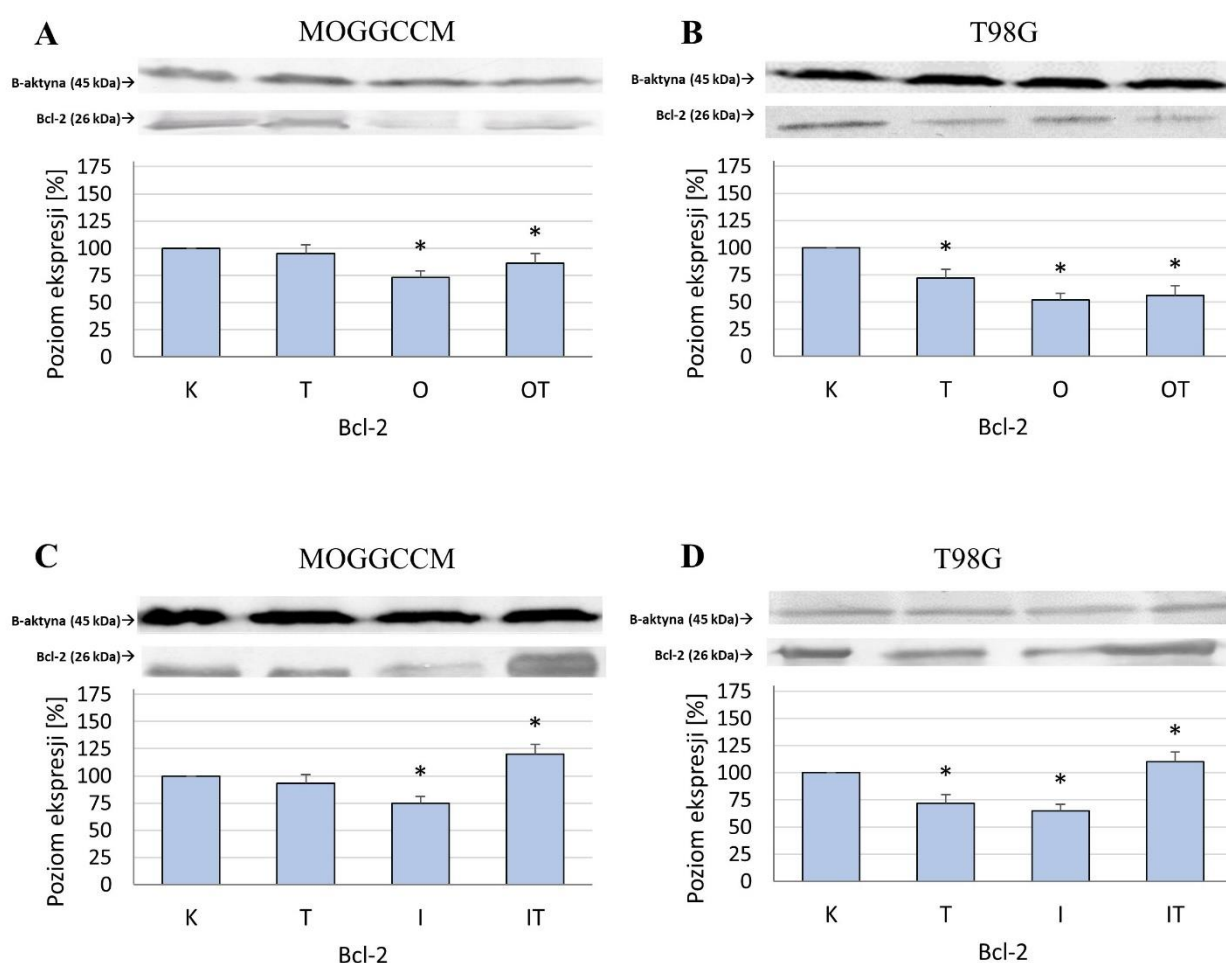
Metodą immunoblotingu wykazano, że 24-godzinna inkubacja komórek glejaka wielopostaciowego z temozolomidem, ostolem i imperatoryną, podawanych razem lub oddzielnie, nie miała wpływu na poziom markera autofagii bekliny 1 i był on zbliżony do poziomu kontrolnego (Ryc. 34B,D). W przypadku linii MOGGCCM znaczny wzrost poziomu bekliny 1 zaobserwowano po inkubacji komórek z temozolomidem i ostolem, w pojedynczej jak i jednocześnie aplikacji. Sama imperatoryna, jak i w połączeniu z TMZ, nie miała wpływu na poziom bekliny 1 w komórkach gwiazdki anaplastycznego (Ryc 34A,C).



Rycina 34. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji bekliny 1 w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

2.3.3. Poziom białka Bcl-2

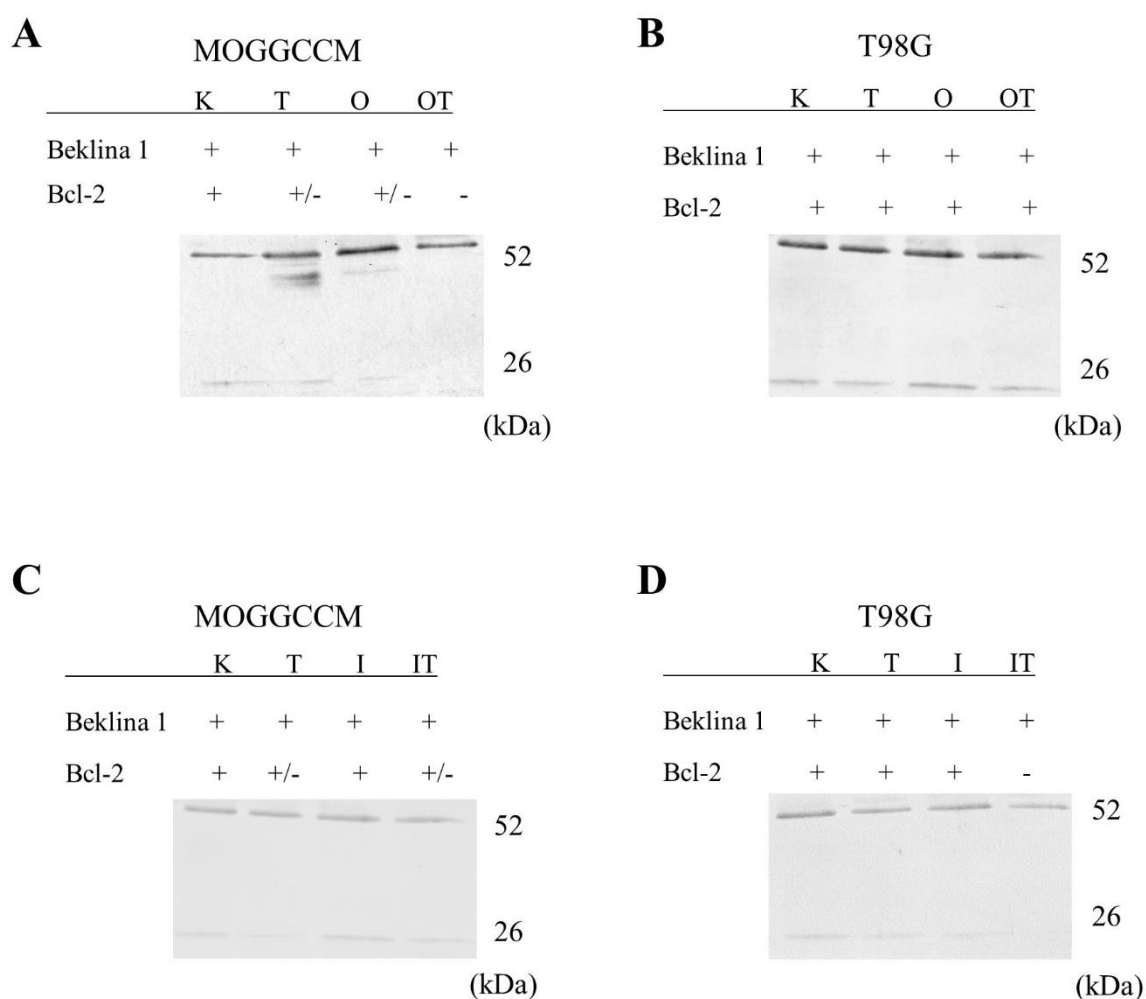
Z przeprowadzonych badań wynika, że temozolomid nie miał wpływu na poziom białka Bcl-2 w komórkach gwiazdki anaplastycznego, redukując znacząco jego ilość w linii glejaka wielopostaciowego (Ryc. 35). Istotny spadek poziomu badanej proteiny odnotowano również po inkubacji komórek z ostolem, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z TMZ oraz po zastosowaniu wyłącznie imperatoryny w obu liniach komórkowych. Co ciekawe, sprzężenie działania furanokumaryny z cytostatykiem dało zupełnie odmienny efekt, powodując zwiększenie poziomu tego białka, zarówno w komórkach AA jak i GBM.



Rycina 35. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji białka Bcl-2 w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

2.3.4. Obecność kompleksów białek Bcl-2:beklina1

Duże znaczenie w regulacji przebiegu apoptozy i autofagii, obok poziomu i aktywności białek markerowych, mają występujące pomiędzy nimi interakcje. Swoistym przełącznikiem pomiędzy wspomnianymi typami śmierci komórkowej jest kompleks białek Bcl-2:beklina 1. Jego obecność hamuje proces autofagii, promując tym samym apoptozę. W celu wykrycia kompleksu Bcl-2:beklina 1 w komórkach MOGGCCM i T98G po inkubacji z TMZ, ostolem i imperatoryną, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej, zastosowano technikę immunoprecypitacji.



Rycina 36. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na tworzenie kompleksów Bcl-2:Beklina 1 w ludzkich komórkach gwiaździsta anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna.

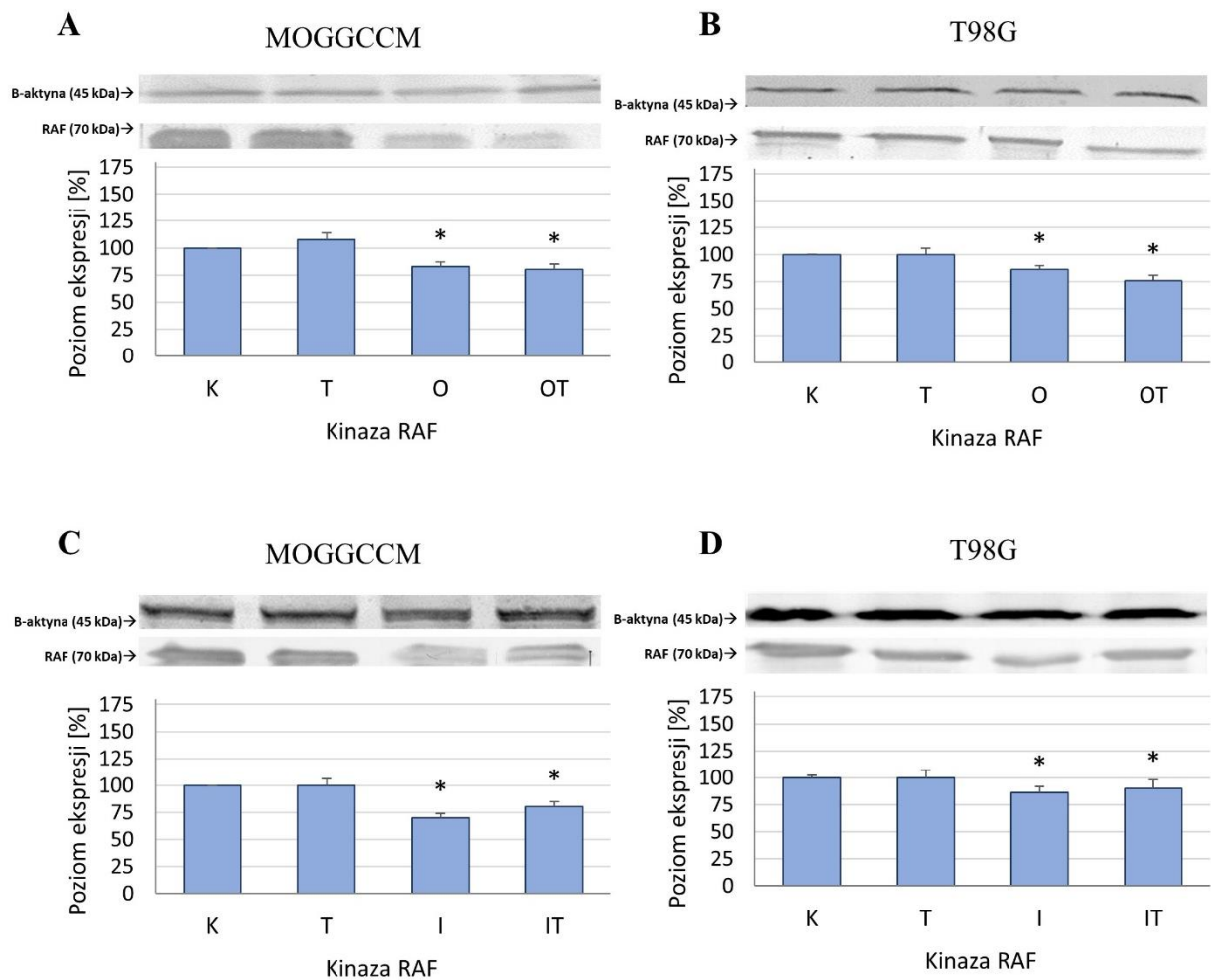
W komórkach glejaka wielopostaciowego obecność tego typu kompleksów zaobserwowano we wszystkich wariantach eksperymentalnych, z wyjątkiem kombinacji imperatoryny z temozolomidem (Ryc. 36B,D).

W przypadku gwiazdziaka anaplastycznego jednoznaczny wynik potwierdzający obecność kompleksów Bcl-2:beklina 1 uzyskano jedynie po zastosowaniu imperatoryny. Połączenie furanokumaryny z TMZ znacznie osłabiało ten efekt, podobnie jak pojedyncza aplikacja cytostatyku bądź ostolu. Co ciekawe, połączenie temozolomidu z ostolem całkowicie hamowało tworzenie kompleksów Bcl-2:beklina 1 (Ryc. 36A,C).

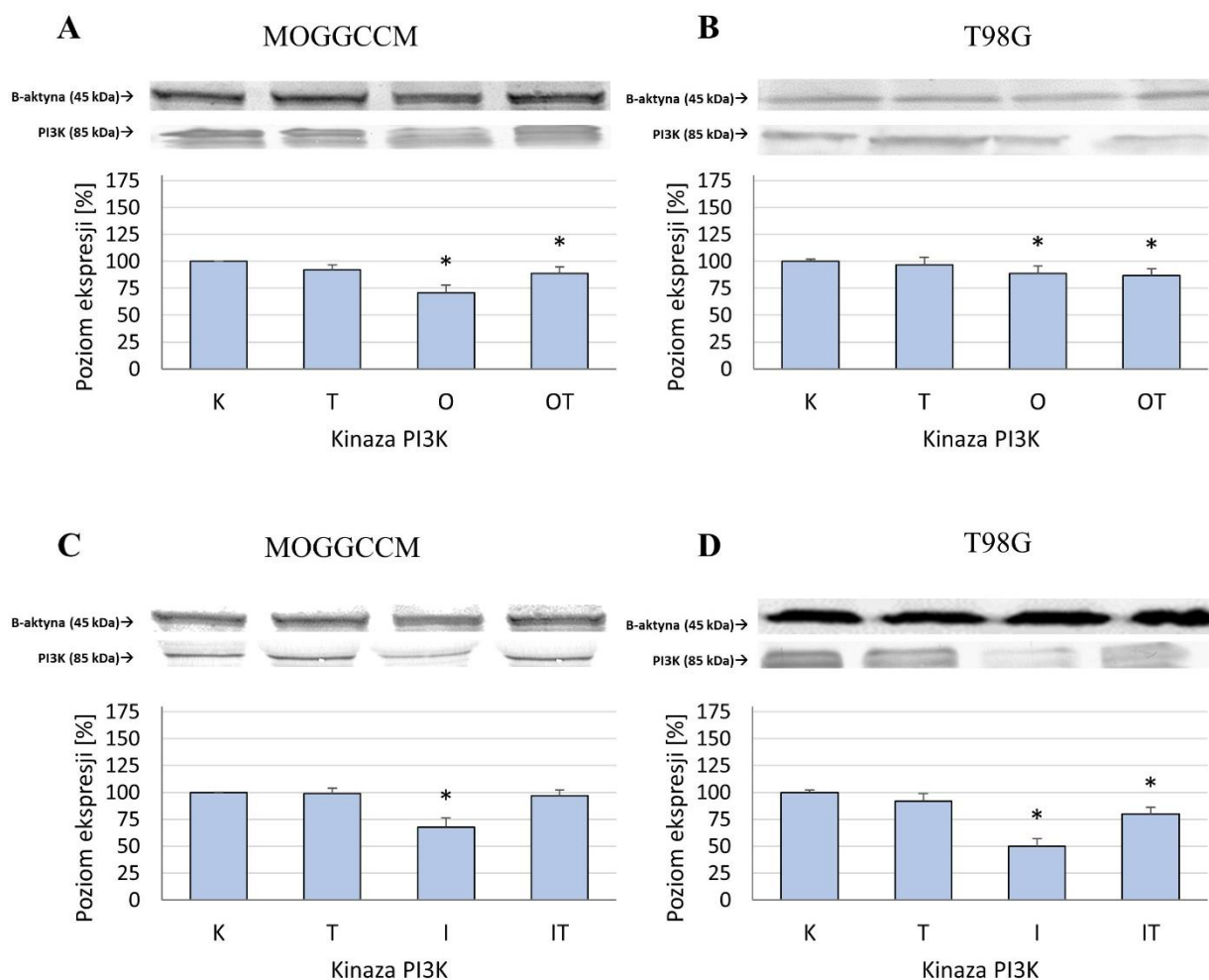
2.3.5. Poziom kinaz PI3K i RAF

Jak wykazano techniką immunoblotingu, 24-godzinna inkubacja komórek MOGGCCM i T98G z ostolem i imperatoryną spowodowała obniżenie poziomu kinazy RAF, zarówno w aplikacji pojedynczej jak i skojarzonej z TMZ (Ryc. 37). Co ciekawe, sam temozolomid nie miał wpływu na poziom tego enzymu w obu liniach komórkowych.

Podobne korelacje zaobserwowano w przypadku kinazy PI3K (Ryc. 38). Sam ostol i sama imperatoryna obniżała poziom białka, podobnie jak skojarzona aplikacja z TMZ. Wyjątek stanowiło jednoczesne podanie imperatoryny oraz TMZ w linii MOGGCCM, gdzie poziom PI3K był zbliżony do kontrolnego. Podobne wyniki uzyskano po inkubacji komórek AA i GBM z samym temozolomidem.



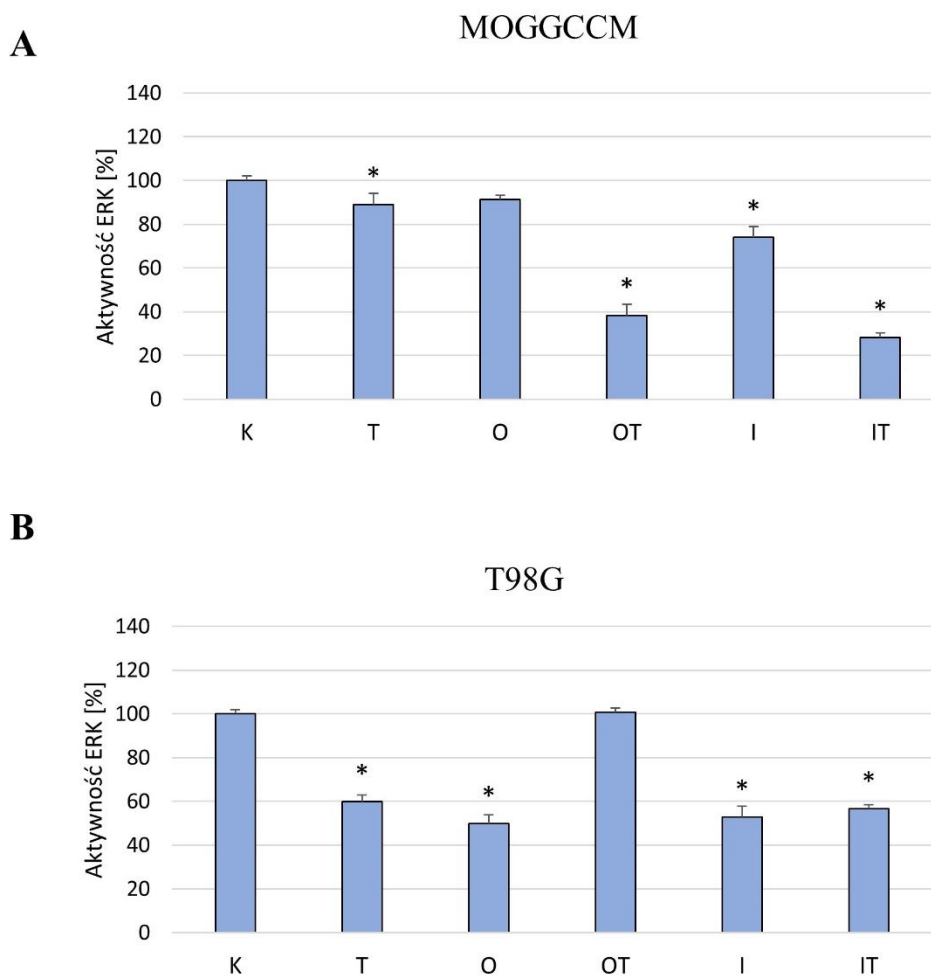
Rycina 37. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji kinazy RAF w ludzkich komórkach gwiazdziaka anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.



Rycina 38. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji kinazy PI3K w ludzkich komórkach gwiaździaka anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

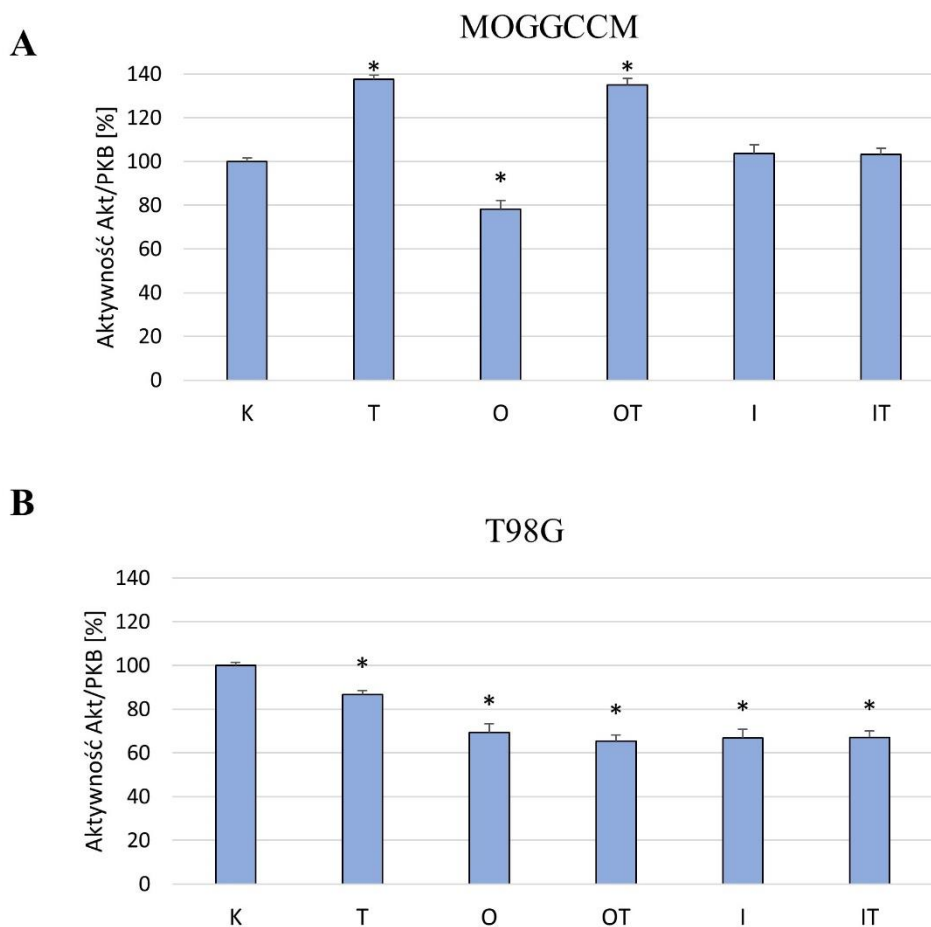
2.3.6. Aktywność Akt/PKB i ERK

Przekazanie sygnału przeżycia od błony komórkowej do wnętrza komórki odbywa się z udziałem kolejnych elementów ścieżek sygnałowych, a zmniejszona aktywność któregoś z nich hamuje dalsze przekazywanie sygnału. W celu sprawdzenia ciągłości przekazywania sygnału przez kinazy PI3K bądź RAF na dalsze ogniwa szlaków, sprawdzono aktywność efektorów tych enzymów, odpowiednio AKT/PKB i ERK.



Rycina 39. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na aktywność ERK w ludzkich komórkach gwiaździstego anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

Zaobserwowano, że pojedyncza aplikacja temozolomidu zmniejszała aktywność kinazy ERK w badanych liniach komórkowych (Ryc. 39). Podobne efekty uzyskano aplikując sam ostol, choć w przypadku komórek MOGGCCM wynik ten nie był istotny pod względem statystycznym. Co ciekawe, połączone działanie obu związków obniżało aktywność kinazy ERK tylko w komórkach AA, nie mając wpływu na T98G. Znacznie bardziej skuteczna okazała się inkubacja komórek obu typów glejaków z imperatoryną. Furanokumaryna, zarówno w aplikacji pojedynczej jak i skojarzonej z TMZ znacząco zmniejszała aktywność kinazy ERK.



Rycina 40. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na aktywność AKT/PKB w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

Aktywność kinazy AKT/PKB była uzależniona zarówno od zastosowanej terapii jak i typu komórek (Ryc. 40). W komórkach glejaka wielopostaciowego obniżenie aktywności enzymu obserwowano we wszystkich wariantach eksperymentalnych, a ostol i imperatoryna, w aplikacji pojedynczej jak i skojarzonej z temozolomidem wykazywały podobną skuteczność. W komórkach gwiazdki anaplastycznej porównywalny spadek obserwowany był wyłącznie po inkubacji z ostolem. Z kolei połączenie działania kumaryny z temozolomidem zwiększało aktywność AKT/PKB, podobnie jak to obserwowano w przypadku samego cytostatyku. Imperatoryna, zarówno w aplikacji pojedynczej jak i równocześnie z TMZ, nie zmniejszała aktywności enzymu.

2.4. Wpływ kumaryn oraz inhibitorów szlaków RAS-RAF-MEK-ERK (sorafenib) i PI3K-AKT/PKB-mTOR (LY294002) na indukcję zaprogramowanej śmierci

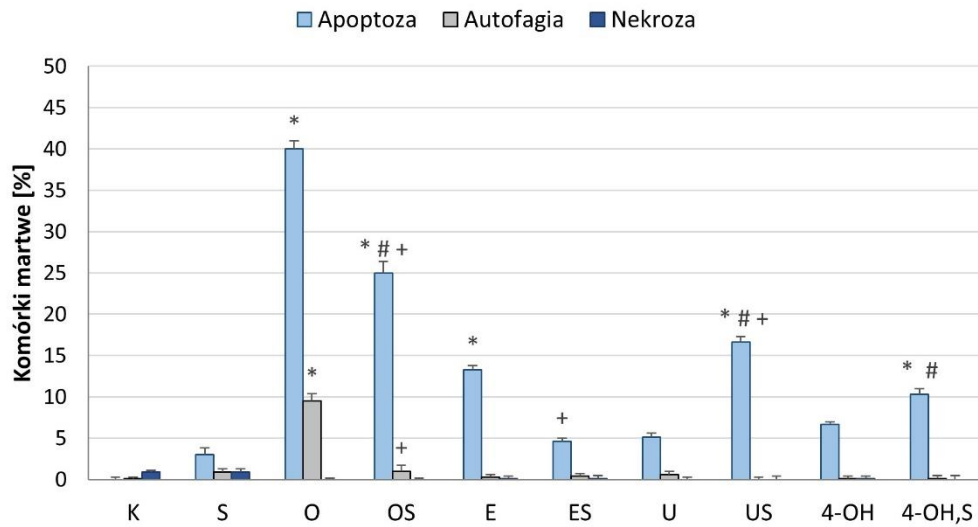
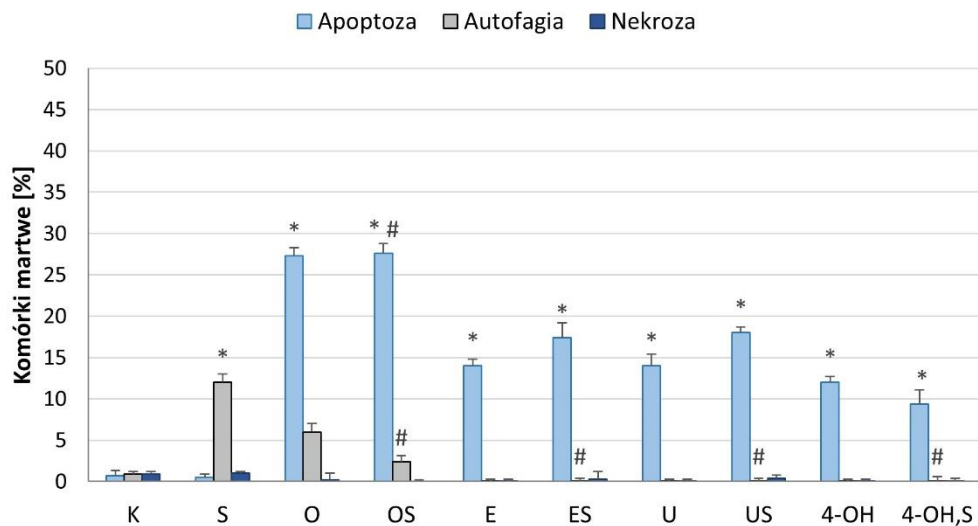
Wcześniejsze badania wykazały, że kumaryny obniżają poziom PI3K i RAF oraz aktywność AKT/PKB i ERK. Z danych literaturowych wiadomo, że zastosowanie inhibitorów białek biorących udział w przekazywaniu sygnałów z udziałem ścieżek sygnałowych RAS-RAF-MEK-ERK oraz PI3K-AKT/PKB-mTOR znacząco zwiększa wrażliwość komórek glejaka na indukcję apoptozy [Haas, 2018; Hassler, 2014]. Dlatego też podjęto próbę określenia roli kumaryn jako adiuwantów indukcji zaprogramowanej śmierci w połączeniu z inhibitorem kinazy RAF – sorafenibem oraz inhibitorem kinazy PI3K – LY294002. W tej części zastosowano wszystkie badane kumaryny.

2.4.1. Aplikacja skojarzona z sorafenibem

Kumaryny proste + sorafenib

Jak wynika z przeprowadzonych badań, sorafenib nie miał istotnego wpływu na indukcję apoptozy i autofagii w ludzkich komórkach gwiaździstego anaplastycznego (Ryc. 41B), natomiast znacząco zmniejszał potencjał przeciwnowotworowy ostolu, redukując o ok. 15% odsetek komórek apoptotycznych oraz całkowicie niwelując aktywność autofagalną związku. Działanie antagonistyczne kombinacji związków potwierdzono stosując test Chau-Talalay (Rozdział VII). Podobne efekty zaobserwowano po zastosowaniu eskuliny, gdzie inhibitor kinazy RAF również hamował właściwości proapoptotyczne kumaryny. Z kolei w przypadku hydroksykumaryn: 4-hydroksykumaryny i umbeliferonu, skojarzone działanie z sorafenibem wywołało efekt synergistyczny, inicjując apoptozę w odpowiednio w 10% i 17% komórek (Ryc. 41A).

W linii glejaka wielopostaciowego sorafenib okazał się skutecznym induktorem autofagii, inicjując ten proces w 12% komórek. Skojarzone działanie sorafenibu z kumarynami prostymi hamowało aktywność proautofagalną chemioterapeutyku, nie miało natomiast istotnego wpływu na właściwości proapoptotyczne ostolu, eskuliny, umbeliferonu i 4-hydroksykumaryny.

A**MOGGCC****B****T98G**

Rycina 41. Wpływ równoczesnej aplikacji kumaryn prostych z sorafenibem na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, S – sorafenib (1 μ M), O – ostol (150 μ M), E – eskulina (200 μ M), U – umbeliferon (200 μ M), 4-OH – 4-hydroksykumaryna (200 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

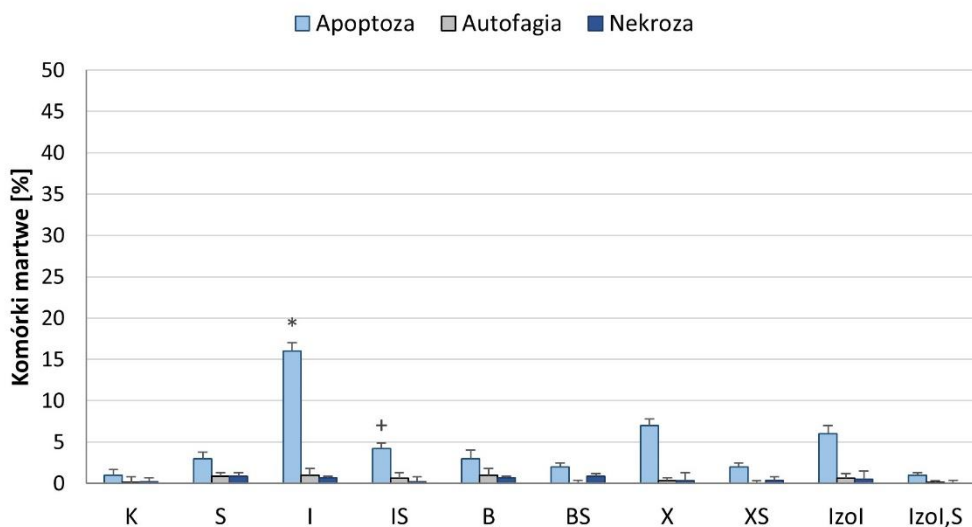
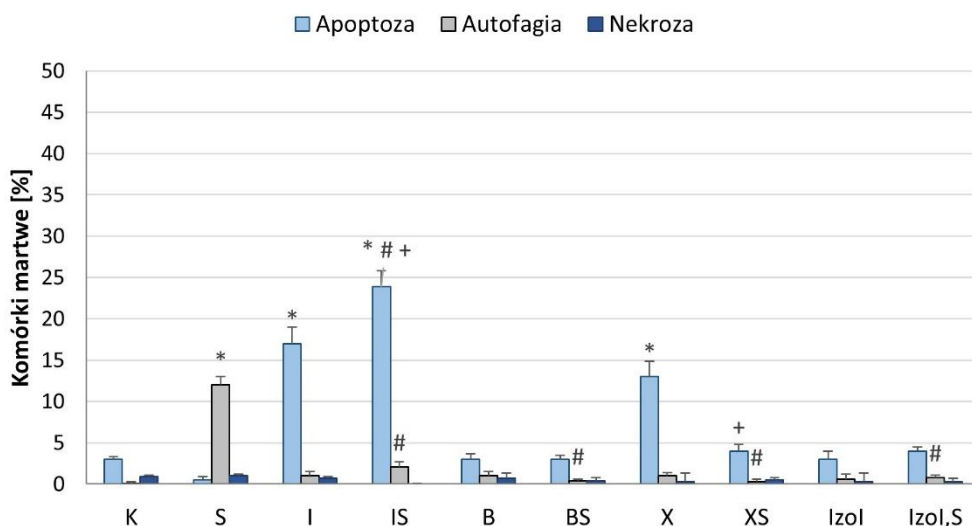
Furanokumaryny + sorafenib

Analiza mikroskopowa komórek MOGGCCM poddanych jednoczesnej inkubacji z badanymi furanokumarynami i sorafenibem nie wykazała istotnego wpływu na proapoptotyczne właściwości bergaptenu, ksantotoksyny i izoimperatoryny (Ryc. 42A). Odnotowano natomiast znaczący spadek ilości komórek apoptotycznych po równoczesnej aplikacji inhibitora kinazy RAF oraz imperatoryny, a antagonizm działania potwierdzono testem Chau-Talalay (Rozdział VII).

Odmienne wyniki otrzymano w komórkach glejaka wielopostaciowego (Ryc. 42B). Skojarzone działanie sorafenibu oraz furanokumaryn hamowało właściwości proautofagalne inhibitora kinazy RAF. Co więcej, równoczesna aplikacja imperatoryny z sorafenibem wywołała efekt synergistyczny w indukcji apoptozy (Rozdział VII), inicjując ten proces w ok. 24% populacji.

W przeciwieństwie do imperatoryny, aktywność proapoptotyczna jej izomeru – izoimperatoryny a także bergaptenu w kombinacji z inhibitorem RAF nie zmianała się w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnych kumaryny. Efekt antagonistyczny z kolei obserwowano po połączeniu działania sorafenibu z ksantotoksyną, gdzie właściwości apoptotyczne furanokumaryny zmniejszyły się o ok. 10%.

Zarówno kumaryny proste jak i furanokumaryny w połączeniu z sorafenibem nie indukowały nekrozy w badanych typach glejaków.

A**MOGGCC****T98G****B**

Rycina 42. Wpływ równoczesnej aplikacji furanokumaryn z sorafenibem na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, S – sorafenib (1 μ M), I – imperatoryna (50 μ M), B – bergapten (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), X – ksantotoksyna (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), IzoI – izoimperatoryna (25 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

2.4.2. Aplikacja skojarzona z LY294002

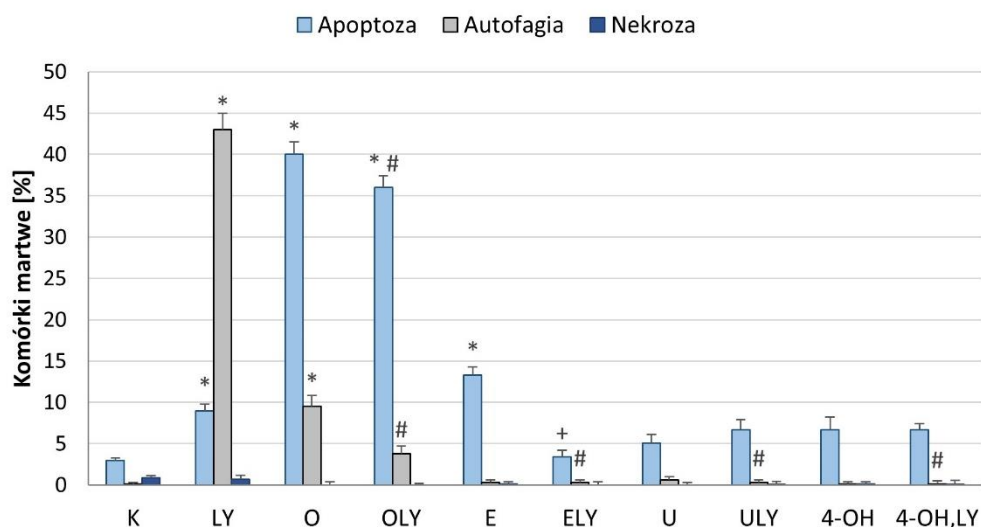
Kumaryny proste + LY294002

Inkubacja komórek gwiazdziaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego z LY294002 spowodowała indukcję autofagii w ok. 43% komórek MOGGCCM i niemal 20% komórek T98G (Ryc. 43). Dodatkowo, obserwowano również apoptozę w 9% populacji AA i 28% GBM.

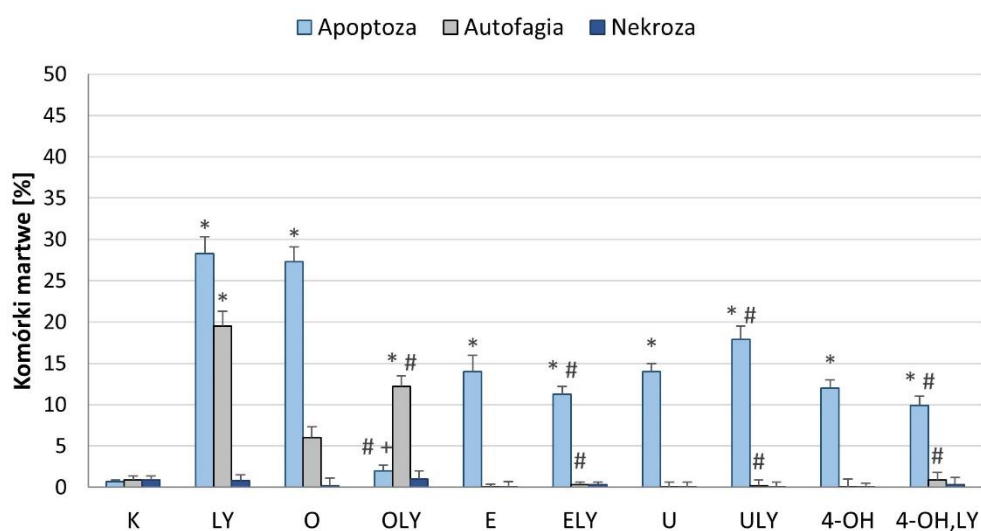
Zastosowanie badanych kumaryn prostych w aplikacji równoczesnej z LY294002 praktycznie całkowicie hamowało zdolność inhibitora PI3K do indukcji autofagii w komórkach MOGGCCM (Ryc. 43A). Co więcej, inhibitor w połączeniu z ostolem inicjował apoptozę w ponad 35% populacji, podczas gdy sam LY294002 wywoływał proces w niespełna 10% komórek. W przypadku pozostałych kumaryn prostych nie odnotowano ich istotnego wpływu na aktywność apoptotyczną inhibitora PI3K. LY294002 zmniejszał natomiast wrażliwość komórek gwiazdziaka anaplastycznego na indukcję apoptozy inicjowanej przez eskulinę.

Komórki glejaka wielopostaciowego poddane skojarzonej inkubacji inhibitorem PI3K i kumarynami prostymi wykazywały znaczną oporność na indukcję zarówno autofagii, jak i apoptozy w porównaniu do pojedynczej aplikacji LY294002 (Ryc. 43B). Co ciekawe, sam inhibitor hamował aktywność proapoptotyczną ostolu, zmniejszając odsetek komórek apoptotycznych o ok. 15%. Nie wpływał jednak na właściwości proapoptotyczne pozostałych pochodnych kumaryny.

MOGGCCM



T98G



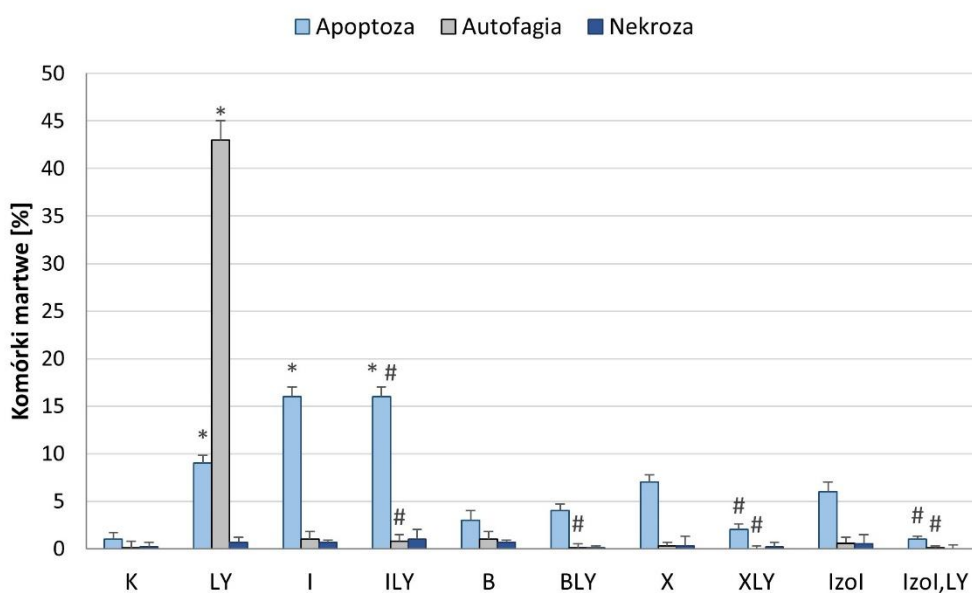
Rycina 43. Wpływ równoczesnej aplikacji kumaryn prostych z LY294002 na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznej MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, LY – LY294002 (10 μ M), O – ostol (150 μ M), E – eskulina (200 μ M), U – umbeliferon (200 μ M), 4-OH – 4-hydroksykumaryna (200 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

Furanokumaryny + LY294002

Analiza mikroskopowa komórek gwiazdziaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego poddanych jednoczesnej inkubacji z LY294002 i furanokumarynami wykazała, że kumaryny zmniejszały wrażliwość komórek nowotworowych na autofagię indukowaną przez LY294002 (Ryc. 44). Co więcej, w linii T98G zastosowanie terapii skojarzonej wiązało się ze spadkiem odsetka komórek apoptotycznych w porównaniu do inkubacji z samym inhibitorem PI3K we wszystkich wariantach eksperymentalnych (Ryc. 46B). Odmienne efekty uzyskano w linii MOGGCCM, gdzie po inkubacji z LY294002 i imperatoryną zaobserwowano wzrost ilości komórek apoptotycznych w porównaniu do aplikacji samego inhibitora PI3K, jednak ilość martwych na tej drodze komórek była porównywalna do poziomu obserwowanego po zastosowaniu samej kumaryny (Ryc. 46A). Kombinacja taka zarówno w linii MOGGCCM, jak i T98G okazała się antagonistyczna (Rozdział VII).

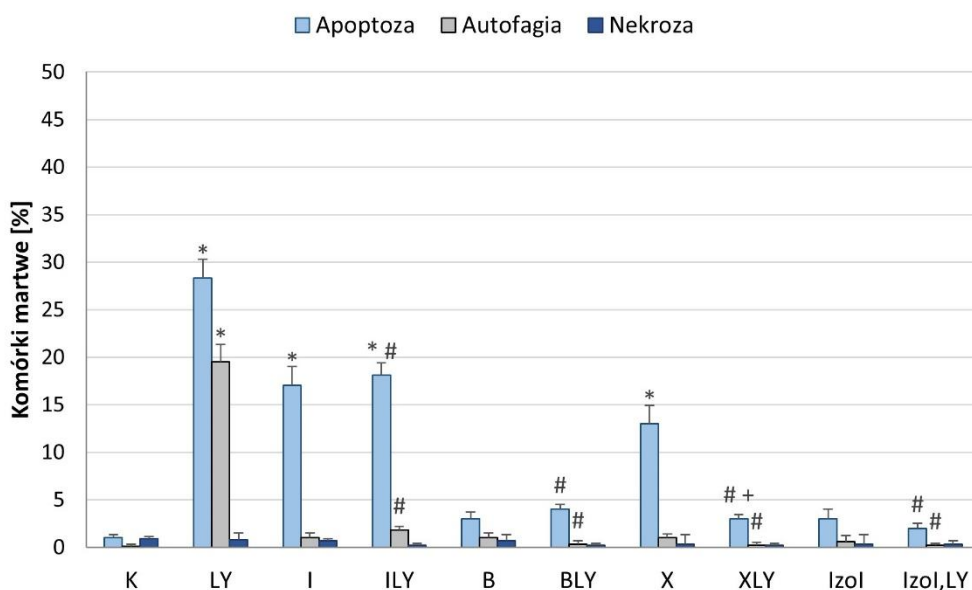
LY294002 w połączeniu z badanymi kumarynami prostymi i furanokumarynami nie posiadał właściwości pronekrotycznych w stosunku do komórek gwiazdziaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego.

MOGGCCM



T98G

B

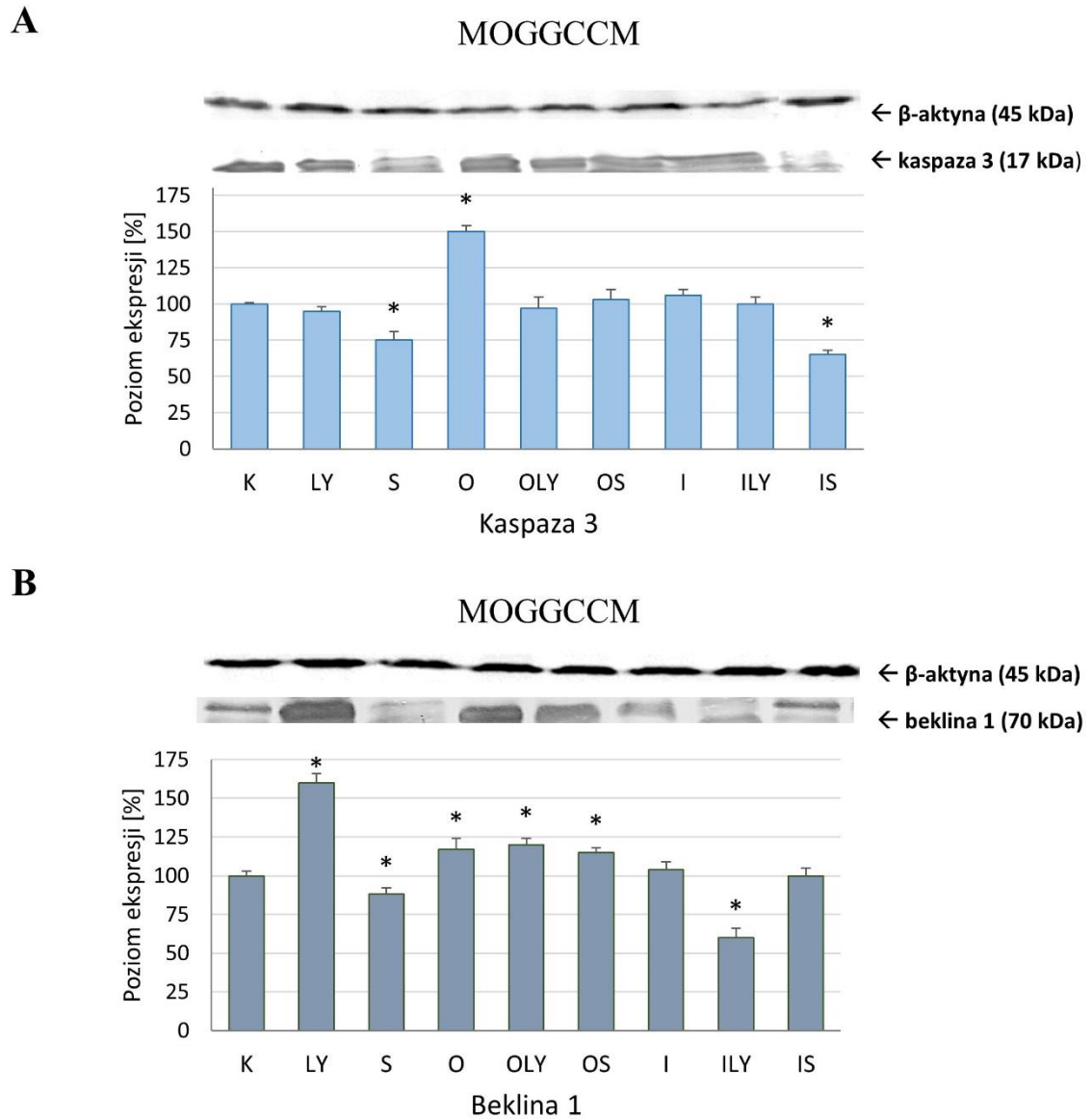


Rycina 44. Wpływ równoczesnej aplikacji furanokumaryn z LY294002 na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, LY – LY294002 (10 μ M), I – imperatoryna (50 μ M), B – bergapten (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), X – ksantotoksyna (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), IzoI – izoimperatoryna (25 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

2.4.3. Wpływ kumaryn w aplikacji z inhibitorami PI3K (LY294002) i RAF (sorafenib) na poziom kaspazy 3 i bekliny 1

Badania na poziomie molekularnym wykazały, że w linii MOGGCCM sam sorafenib, jak również w połączeniu z imperatoryną, skutecznie obniżał poziom kaspazy 3 poniżej poziomu kontrolnego. Inhibitor RAF zmniejszał również do poziomu kontrolnego ilość markera apoptozy obserwowanego po inkubacji z samym ostolem. Podobną właściwość w stosunku do tej kumaryny prostej wykazywał LY294002. Sam inhibitor kinazy PI3K, jak również w połączeniu z imperatoryną nie wpływał na poziom kaspazy 3. Podobne interakcje zaobserwowano w linii T98G. Odnotowano wówczas spadek poziomu kaspazy 3 po inkubacji z sorafenibem oraz wzrost poziomu markera po aplikacji ostolu. W tym przypadku jednak inhibitor RAF tylko nieznacznie hamował aktywność kumaryny. Skuteczniejszy okazał się LY294002, który w połączeniu z ostolem zmniejszał poziom kaspazy 3 do poziomu kontrolnego. W przypadku imperatoryny, jednoczesna aplikacja zarówno z sorafenibem, jak i LY294002 znacząco obniżała ilość kaspazy 3.

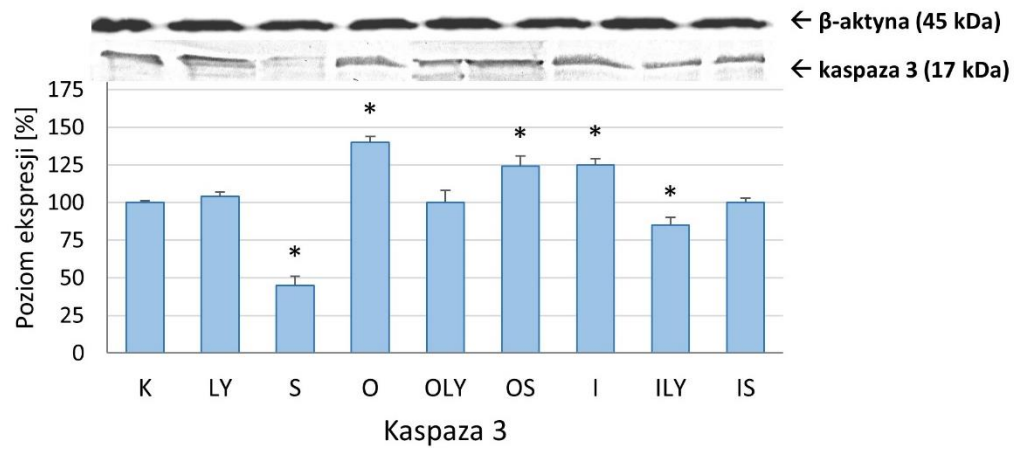
Analiza ilości bekliny 1 wykazała znaczny wzrost poziomu białka w komórkach AA poddanych inkubacji z LY294002 (Ryc. 45B). Podwyższony poziom markera zaobserwowano również po aplikacji ostolu zarówno pojedynczo, jak i równocześnie z LY294002 bądź sorafenibem. Co ciekawe, imperatoryna w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z sorafenibem nie miała istotnego wpływu na poziom bekliny 1, podczas gdy połączenie z LY294002 znacznie zmniejszało ilość białka. Podobnie jak w komórkach AA, również w linii GBM, pojedyncza aplikacja z LY294002 podwyższała poziom bekliny 1 w najwyższym stopniu, a połączenie działania inhibitora PI3K z ostolem zmniejszało ilość markera poniżej kontrolnego w porównaniu z pojedynczą aplikacją kumaryny (Ryc. 46B).



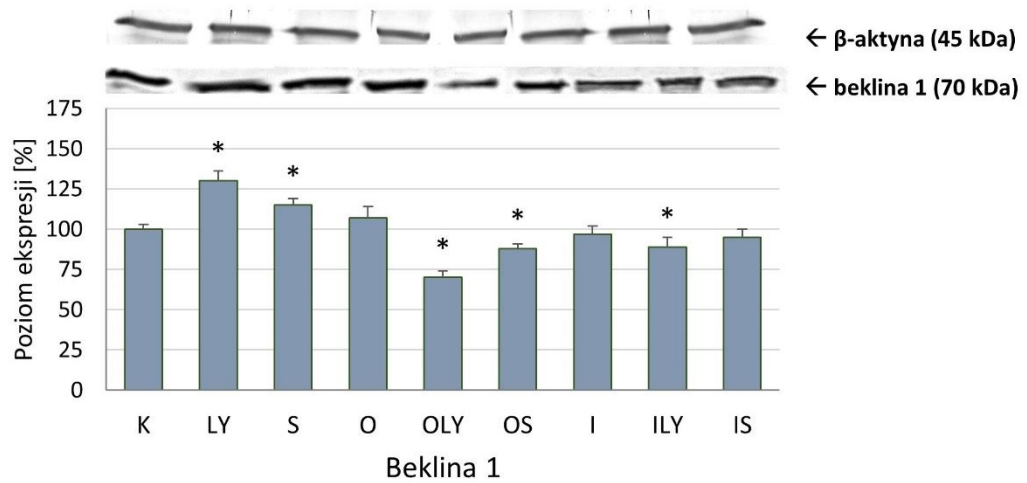
Rycina 45. Wpływ ostolu i imperatoryny w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z LY294002 bądź sorafenibem na poziom kaspazy 3 (A) i bekliny 1 (B) w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM; K – kontrola, LY – LY294002, S – sorafenib, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

A

T98G

**B**

T98G



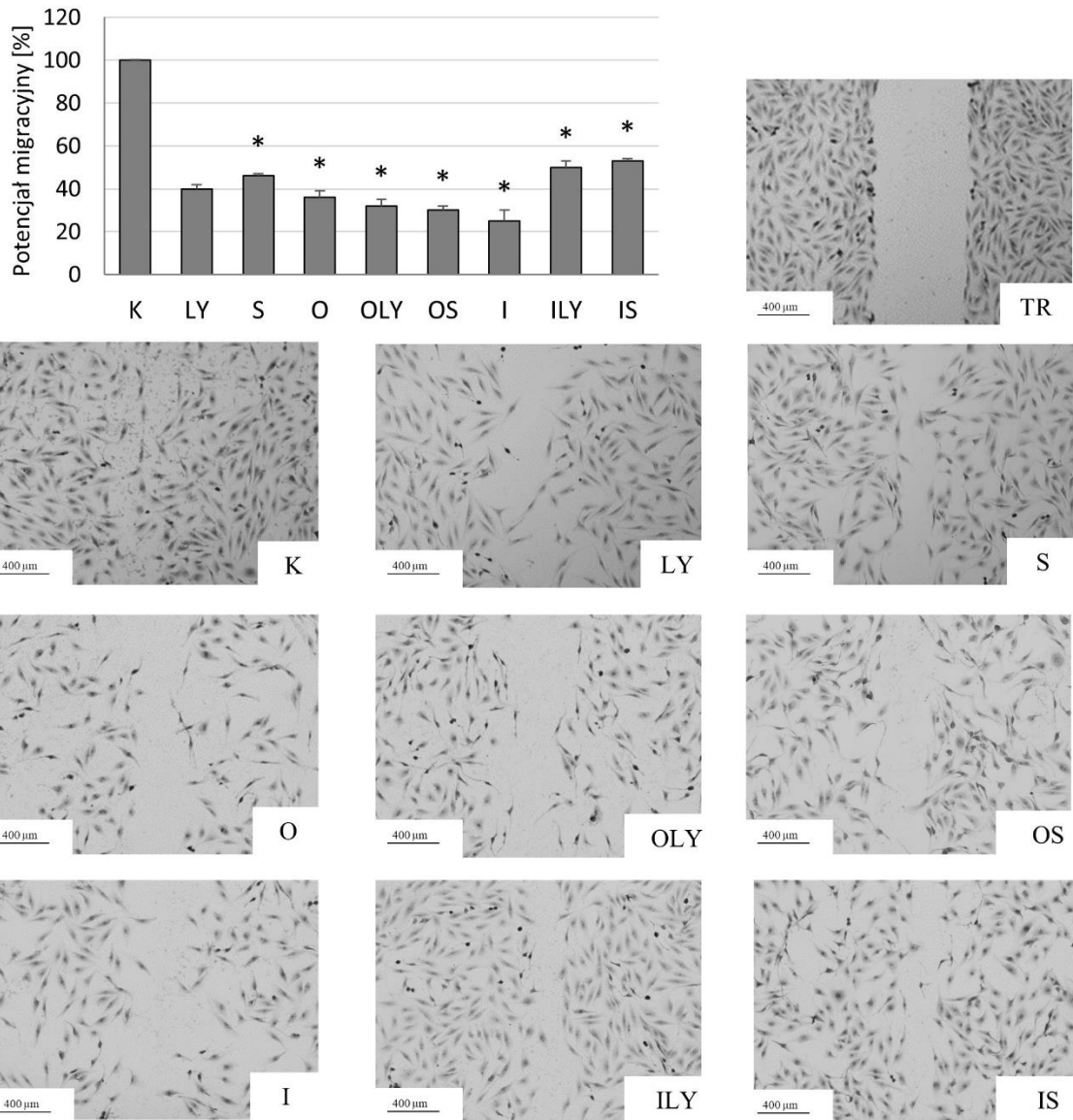
Rycina 46. Wpływ ostolu i imperatoryny w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z LY294002 bądź sorafenibem na poziom kaspazy 3 (A) i bekliny 1 (B) w ludzkich komórkach glejaka wielopostaciowego T98G; K – kontrola, LY – LY294002, S – sorafenib, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

2.4.4. Wpływ ostolu i imperatoryny w aplikacji skojarzonej z LY294002 i sorafenibem na potencjał migracyjny komórek glejaka

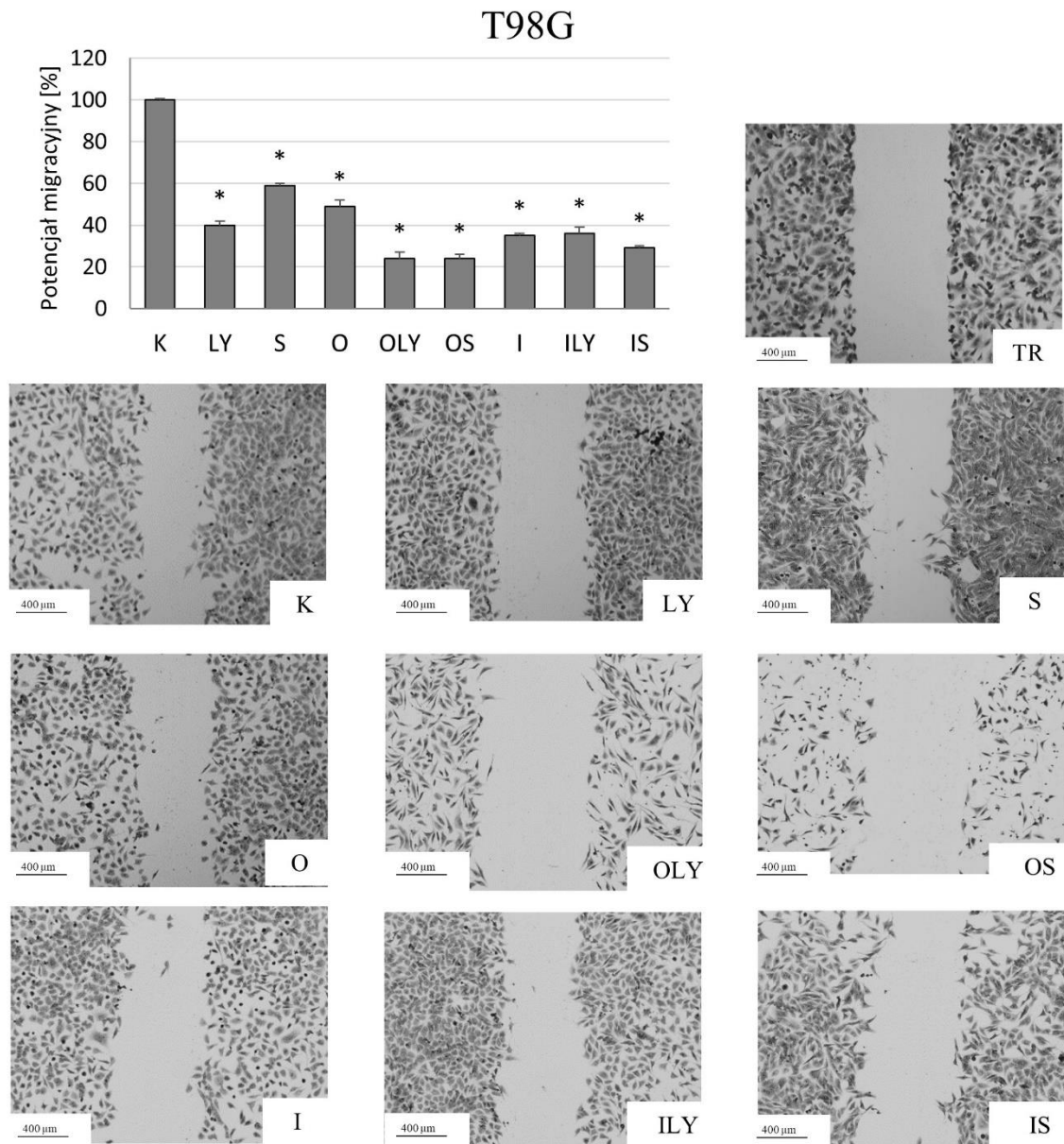
Sorafenib i LY294002 w aplikacji pojedynczej wykazywały zbliżoną aktywność i zmniejszały potencjał migracyjny komórek AA o około 60% (Ryc. 47). Kombinacja tych związków z ostolem okazała się być jeszcze skuteczniejsza i hamowała mobilność komórek nowotworowych o dodatkowe 10%. Zupełnie inne rezultaty uzyskano dla imperatoryny. Najskuteczniejsza okazała się pojedyncza aplikacja związku, podczas gdy skojarzone działanie z sorafenibem i LY294002 zmniejszało zdolność furanokumaryny do hamowania migracji komórek MOGGCCM.

W komórkach T98G, LY294002 obniżało potencjał migracyjny w stopniu zbliżonym do linii AA, który wynosił 40% (Ryc. 48). Sorafenib okazał się mniej efektywny w hamowaniu mobilności komórek gwiazdziaka, ograniczając ją o ok. 40%. Skuteczniejsza okazała się skojarzona aplikacja inhibitorów i ostolu, gdzie migracja komórek została zredukowana o ponad 75%. Imperatoryna w aplikacji pojedynczej oraz kombinacji z inhibitorem PI3K obniżała migrację o 65% w porównaniu do kontroli. Podobny wynik uzyskano stosując kombinację furanokumaryny z sorafenibem.

MOGGCCM



Rycina 47. Wpływ ostolu i imperatoryny, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na mobilność ludzkich komórek gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM; TR – test rysy, K – kontrola, LY – LY294002, S – sorefenib, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.



Rycina 48. Wpływ ostolu i imperatoryny, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na mobilność ludzkich komórek glejaka wielopostaciowego T98G; TR – test rysy, K – kontrola, LY – LY294002, S – sorefenib, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

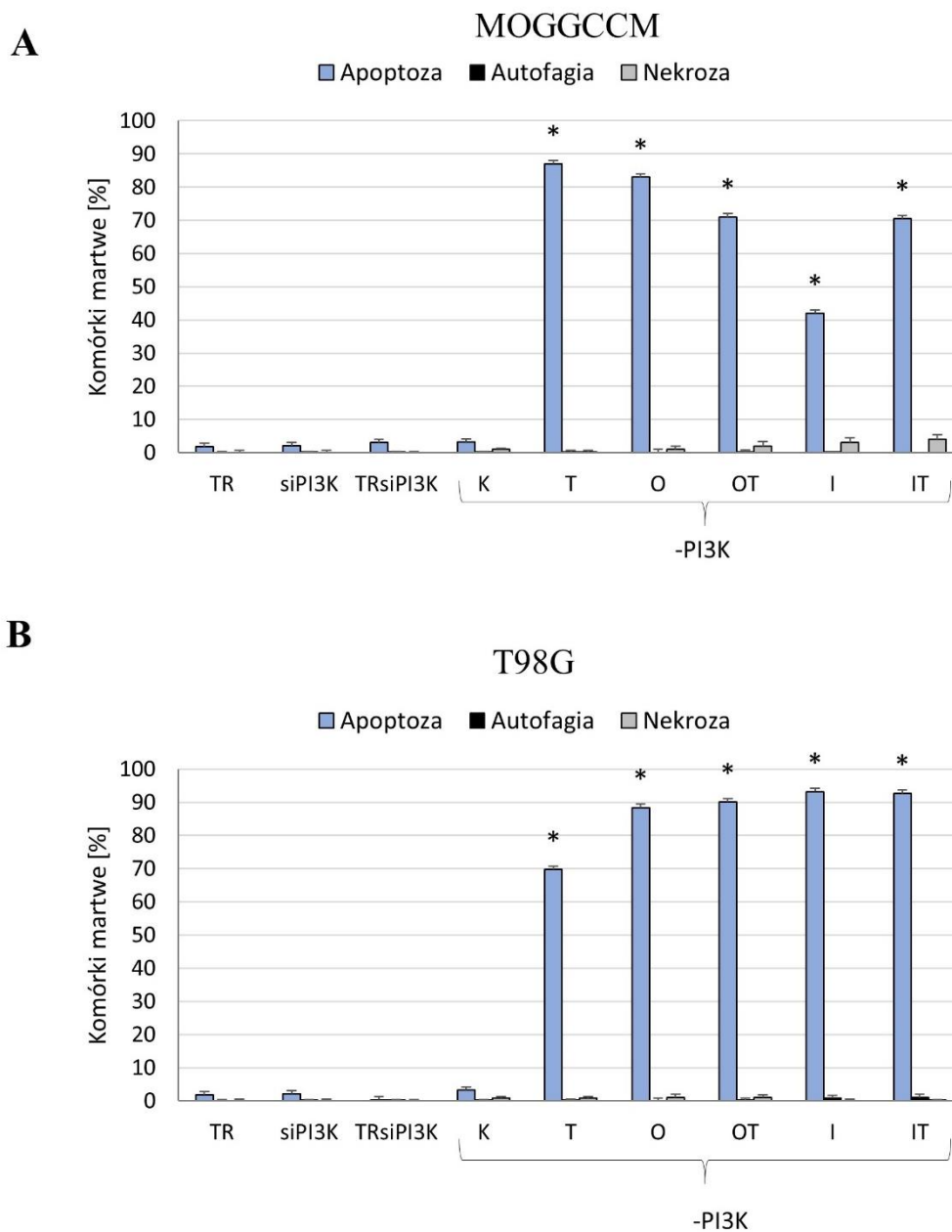
2.4.5. Blokowanie ekspresji PI3K i RAF

W celu potwierdzenia udziału szlaków RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR w oporności glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci, zablokowano pierwsze elementy tych ścieżek sygnałowych, czyli RAF i PI3K specyficznymi siRNA, a skuteczność transfekcji oceniono metodą immunoblottingu. Transfekowane komórki poddano następnie działaniu kumaryn (ostolu bądź imperatoryny) i temozolomidu, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej, w celu oceny wrażliwości komórek na indukcję zaprogramowanej śmierci.

Z przeprowadzonych badań wynika, że zablokowanie ekspresji kinaz PI3K i RAF było znacznie skuteczniejsze od zastosowania inhibitorów tych białek, odpowiednio LY294002 i sorafenibu, co przejawiało się większą wrażliwością na indukcję apoptozy przez temozolomid, ostol i imperatorynę, zarówno w aplikacji pojedynczej jak i skojarzonej.

Pojedyncza aplikacja pochodnych kumaryny w połączeniu z temozolomidem indukowała apoptozę w ok. 90% stransfekowanych anty-PI3K siRNA komórek glejaka wielopostaciowego, podczas gdy sam cytostatyk eliminował ok. 70% populacji. W przypadku gwiazdziaka anaplastycznego z zablokowaną ekspresją PI3K najskuteczniejsza okazała się pojedyncza aplikacja temozolomidu, prowadząca do apoptozy blisko 90% komórek nowotworowych. Połączenie cytostatyku z ostolem bądź imperatoryną okazało się mniej efektywne w indukcji zaprogramowanej śmierci, choć wciąż ilość martwych na tej drodze komórek oscylowała w granicy 70%. Najmniej apoptozy (40%) obserwowano po inkubacji z samą imperatoryną.

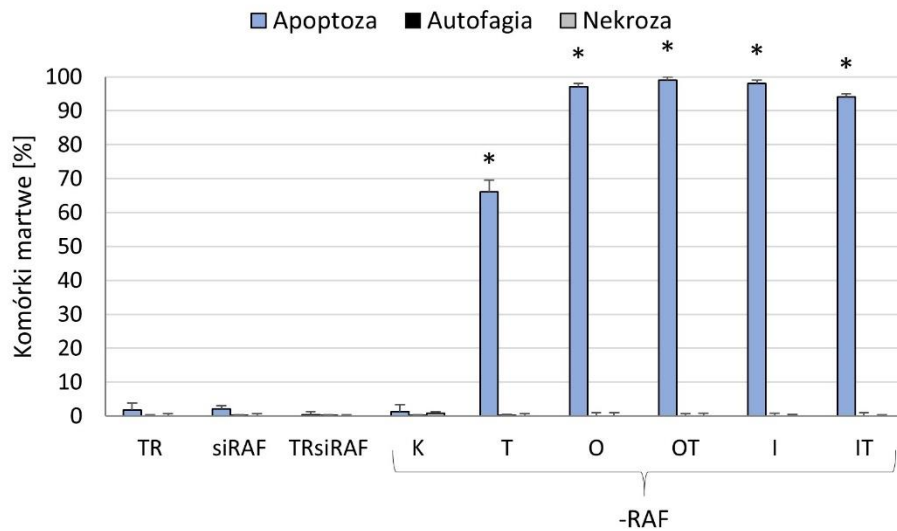
Zablokowanie ekspresji kinazy RAF w komórkach gwiazdziaka anaplastycznego okazało się być bardzo skuteczne w zwiększaniu wrażliwości na indukcję apoptozy pod wpływem kumaryn (Ryc. 42A). Pojedyncza aplikacja ostolu lub imperatoryny, jak również w połączeniu z temozolomidem niemal całkowicie eliminowała komórki nowotworowe na drodze zaprogramowanej śmierci (>95%). Co ciekawe, działanie samego cytostatyku było znacznie słabsze i prowadziło do apoptozy około 65% populacji. Stransfekowane komórki T98G, w porównaniu do MOGGCCM, były nieco mniej wrażliwe na indukcję zaprogramowanej śmierci inicjowanej przez ostol, prowadząc do apoptozy około 66% komórek (Ryc. 42B). Jednak połączenie jego działania z cytostatykiem całkowicie eliminowało komórki nowotworowe. W przypadku imperatoryny, pojedyncza aplikacja okazała się skuteczniejsza (90% apoptozy) od kombinacji z temozolomidem (71% apoptozy).



Rycina 49. Wpływ blokowania ekspresji PI3K w połączeniu z aplikacją ostolu, imperatoryny i temozolomidu na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

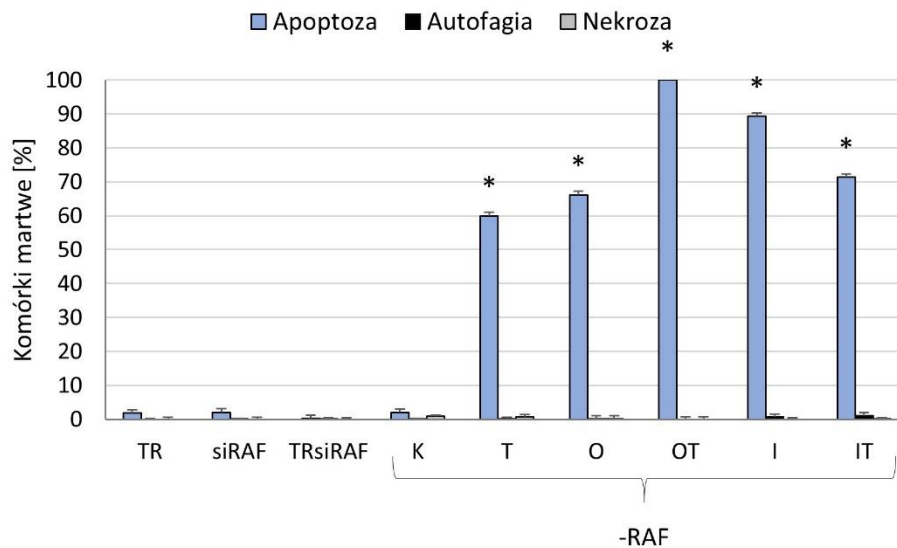
MOGGCCM

A



B

T98G



Rycina 50. Wpływ blokowania ekspresji RAF w połączeniu z aplikacją ostolu, imperatoryny i temozolomidu na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiaździstego anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.

Blokowanie ekspresji PI3K i RAF specyficznymi siRNA, jak i późniejsza inkubacja stransfekowanych komórek MOGGCCM i T98G z ostolem, imperatoryną i temozolomidem w aplikacji pojedynczej i skojarzonej nie miała wpływu na indukcję autofagii i nekrozy.

V. DYSKUSJA

Glejaki to nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, które stanowią około 70% wszystkich guzów mózgu. Wśród nich, najbardziej agresywnym przebiegiem charakteryzuje się gwiaździak anaplastyczny (AA) i glejak wielopostaciowy (GBM). Są to praktycznie niemożliwe do całkowitego usunięcia chirurgicznego, naciekające i unaczynione guzy o wysokim stopniu przerzutowania. Wdrożone leczenie pozwala jedynie na poprawę komfortu oraz wydłużenie życia pacjenta, które i tak w przypadku AA i GBM nie przekracza odpowiednio 5 i 2 lat od momentu postawienia diagnozy. Obok trudnej lokalizacji, dużym problemem jest ich zdolność do nabywania oporności na stosowaną radio- i chemioterapię. Z tego względu wciąż poszukiwane są nowe związki, mogące wspomóc stosowane leczenie. Biorąc pod uwagę powszechną dostępność oraz szerokie spektrum działania wiele uwagi poświęca się w tym aspekcie substancjom pochodzenia roślinnego, np. kumarynom. Wielokrotnie wykazano bowiem, że sprzężenie działania tych związków z chemioterapią potęguje przeciwnowotworowe działanie cytostatyków, zmniejszając równocześnie uszkodzenia komórek prawidłowych. Bardzo duży wpływ na właściwości przeciwnowotworowe kumaryn ma ich struktura chemiczna.

Jak wynika z danych literaturowych, wśród kumaryn prostych, udokumentowane znaczenie przeciwnowotworowe wykazuje ostol, 4-hydroksykumaryna, umbeliferon i eskulina. Ostol posiada ugrupowanie metoksyłowe i izoprenyłowe (izopentenyłowe), przyłączone odpowiednio w pozycji C7 i C8 pierścienia kumarynowego. 4-hydroksykumaryna i umbeliferon są pochodnymi monohydroksylowymi, podstawionymi odpowiednio w pozycjach C4 i C7. Eskulina z kolei jest analogiem umbeliferonu, który oprócz grupy –OH posiada podstawnik glikozydowy, dołączony do 6 atomu węgla w cząsteczce. W przypadku furanokumaryn duże znaczenie aplikacyjne przypisuje się pochodnym metoksyłowym (bergapten i ksantotoksyna) oraz izopentenyloksylowym (izoimperatoryna i imperatoryna), podstawionym odpowiednio w pozycjach C5 (bergapten, izoimperatoryna) i C8 (ksantotoksyna, imperatoryna).

Jak wykazałam w swoich badaniach, aktywność przeciwnowotworowa kumaryn prostych ściśle zależała od obecności, rodzaju oraz lokalizacji przyłączonych podstawników, a najskuteczniejszy okazał się ostol, zarówno w komórkach gwiaździaka anaplastycznego jak i glejaka wielopostaciowego. Związek eliminował na drodze apoptozy blisko 40% komórek AA i 30% GBM, co wiązało się z podwyższonym poziomem i

aktywnością markera tego procesu – kaspazy 3. Enzym ten, obok regulacji przebiegu apoptozy, ma zdolność do proteolizy markerowego białka autofagii – bekliny 1, na dwa fragmenty: N – końcowy oraz C – końcowy. Fragmenty N – końcowe, pozbawione tzw. sygnału eksportu jądrowego, zlokalizowane są w jądrze oraz posiadają domenę BH3, zdolną do wiązania białek antyapoptotycznych. Z kolei fragmenty C – końcowe przemieszczają się do mitochondrium, prowadząc do uwolnienia cytochromu c i indukcji apoptozy [Wirawan, 2010; Zhu, 2010]. W komórkach AA, obok zaprogramowanej śmierci typu I, zaobserwowano również autofagię (ok 10%), a podwyższonej aktywności kaspazy 3 towarzyszył zwiększony poziom bekliny 1. W tym przypadku, obecność funkcjonalnej kaspazy 3 mogła zmieniać właściwości bekliny 1 z proautofagalnych na proapoptotyczne. To może tłumaczyć zdecydowanie większy odsetek komórek apoptotycznych, mimo podwyższonego poziomu markera autofagii. Ostol obniżał również poziom białka Bcl-2, posiadającego zdolność do hamowania apoptozy poprzez interakcję i blokowanie aktywności białek proapoptotycznych, zlokalizowanych w błonie mitochondrium. Proteina ta może również wiązać się z bekliną 1, tworząc kompleks uniemożliwiający indukcję autofagii [Marquez, 2012]. Obecność takich kompleksów odnotowano w komórkach AA i GBM inkubowanych z ostolem, co może również wyjaśniać dość niski poziom autofagii w porównaniu do apoptozy. Z przeprowadzonych przeze mnie badań wynika, że obok właściwości proapoptotycznych, ostol posiadał również zdolność do hamowania potencjału migracyjnego glajeków III^o i IV^o, co może mieć duże znaczenie aplikacyjne. Wiadomo bowiem, że wysoka śmiertelność oraz trudności w leczeniu tych nowotworów związane są m.in. z ich potencjałem do szybkiego, naciekającego wzrostu oraz tworzenia odległych przerzutów [Armento, 2017; Langhans, 2017]. Zdolność ostolu do hamowania migracji komórek nowotworowych może być związana ze spadkiem ilości i aktywności metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9. Enzymy te odpowiadają za degradację białek macierzy zewnątrzkomórkowej (m.in. kolegeny, proteoglikanów oraz fibronektyny), ułatwiając tym samym przemieszczanie komórek, a ich nadmierna aktywność zazwyczaj towarzyszy chorobom nowotworowym [Jarzab, 2017; Kao, 2012; Yang, 2010].

Wysoka aktywność przeciwnowotworowa ostolu, związana z kierowaniem komórek na drogę apoptozy może wiązać się ze strukturą chemiczną związku i obecnością ugrupowania izopentenyłowego bądź metoksyłowego. Wydaje się, że większą rolę w tym procesie odgrywa grupa izopentenyłowa. Udowodniono bowiem, że obecność tego podstawnika w strukturze kumaryn zwiększa ich aktywność antyproliferacyjną [Kawaii,

2001]. Wykazano również, że cytotoksyczne działanie kumaryn nasila się wraz ze wzrostem hydrofobowości podstawnika, którym w tym przypadku jest grupa izoprenylova, a zwiększona lipofilność alkilu przyczynia się do poprawy zdolności związku do penetracji błony komórkowej [Yang, 2006]. Co więcej, wyższa aktywność przeciwnowotworowa uwarunkowana jest większą długością podstawionego łańcucha alifatycznego [Devji, 2011; Jun, 2014].

Pozostałe kumaryny proste okazały się mniej skuteczne od ostolu w eliminacji komórek glejaków na drodze zaprogramowanej śmierci, a ich właściwości przeciwnowotworowe zależały nie tylko od struktury chemicznej, ale również od zastosowanej linii komórkowej. Zaobserwowałam bowiem, że komórki gwiazdziaaka anaplastycznego były mniej wrażliwe na indukcję apoptozy przez hydroksykumaryny w porównaniu do komórek glejaka wielopostaciowego. W obu typach glejaków zmiana lokalizacji ugrupowania hydroksylowego z pozycji C4 (4-hydroksykumaryny) na C7 (umbeliferonu) nie miała istotnego wpływu na właściwości przeciwnowotworowe związku. Zbliżone wyniki uzyskano w komórkach raka szyjki macicy HeLa S5 [Gawron, 1987]. Hydroksykumaryny (4-hydroksykumaryna i umbeliferon) hamowały wówczas proliferację komórek z podobną skutecznością. Na tej podstawie stwierdzić można, że właściwości proapoptotyczne tej grupy związków w zdecydowanej mierze zależały od samej obecności ugrupowania hydroksylowego, a jego lokalizacja (w pozycji C4 lub C7) nie była już tak istotna. Co ciekawe, w swoich badaniach odnotowałam, że w komórkach AA aktywność proapoptotyczna 7-hydroksykumaryny była znacznie wyższa niż jej analogu – eskuliny, posiadającej dodatkowy podstawnik glikozydowy. W komórkach glejaka wielopostaciowego natomiast odsetek komórek apoptotycznych traktowanych 7-hydroksykumaryną i eskuliną był porównywalny. W tym przypadku podstawnik glikozydowy nie miał zatem istotnego wpływu na właściwości proapoptotyczne umbeliferonu. Otrzymane wyniki potwierdziły obserwacje opisane przez innych autorów, według których przeciwnowotworowe właściwości umbeliferonu i eskuliny zależą od zastosowanej linii komórkowej. Udowodniono bowiem, że linia KB ludzkich komórek raka nosogardzieli była bardziej wrażliwa na leczenie eskuliną niż 7-hydroksykumaryną, podczas gdy w komórkach białaczki HL60 bardziej skuteczny okazał się umbeliferon [Yang, 2007; Yang, 2006].

W przypadku furanokumaryn, najskuteczniejszym w indukcji apoptozy związkiem zaliczanym do tej klasy, okazała się imperatoryna, inicjująca ten proces w ok. 17% komórek

gwiazdziaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego. Było to skorelowane z aktywacją kaspazy 3 oraz zmniejszeniem poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2, które wchodząc w kompleks z bekliną 1, uniemożliwiało indukcję autofagii. Co więcej, furanokumaryna skutecznie ograniczała migrację komórek AA i GBM. Dużą rolę w tym procesie może odgrywać białko grupy wysokiej mobilności 2 – HMGB2 (ang. high mobility group box1), odpowiedzialne m.in. za wzmożoną ekspresję cykliny A oraz genów zaangażowanych w proces przejścia nabłonkowo – mezenchymalnego. Jak wykazują najnowsze badania, imperatoryna posiada zdolność do zmniejszenia aktywności tego białka [Gao, 2021]. Właściwości przeciwnowotworowe można rozpatrywać na podstawie struktury chemicznej związku. Furanokumaryna, podobnie jak ostol posiada podstawnik izoprenyloowy w pozycji C8, jednak jest on przyłączony do pierścienia kumaryny za pomocą atomu tlenu. Dodatkowo, w przypadku furanokumaryny podstawnik metoksyloowy w pozycji C7 charakterystyczny dla ostolu, zastąpiony jest pierścieniem furanu. Jak wykazały moje badania, jego obecność nie miała istotnego wpływu na aktywność proapoptotyczną w stosunku do komórek T98G, zmniejszała jednak odsetek komórek apoptotycznych linii MOGGCCM. Niekorzystny wpływ obecności pierścienia furanu został potwierdzony również przez Eken i wsp. Wykazali oni, że ostol znacznie skuteczniej od imperatoryny hamował proliferację komórek raka okrężnicy Colo205 [Eken, 2017]. Co ciekawe, zaobserwowałam, że oprócz samej substytucji alkilem izoprenylowym duże znaczenie w aktywności przeciwnowotworowej związku, odgrywa jego lokalizacja. Otóż inkubacja komórek AA i GBM z izoimperatoryną była mniej skuteczna w indukcji zaprogramowanej śmierci w porównaniu do inkubacji z jej izomerem – imperatoryną. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że osiągnięcie wyższej aktywności proapoptotycznej uwarunkowane jest obecnością ugrupowania izoprenylowego w pozycji C8 szkieletu kumarynowego, co dodatkowo potwierdzają wyniki otrzymane w komórkach raka piersi (linia MCF-7) [Dong, 2019]. W przypadku komórek HeLa natomiast zmiana lokalizacji podstawnika izoprenylowego z pozycji C5 na C8 nie miała wpływu na właściwości związku [Okuyama, 1990]. Zatem wnioskować można, że obok miejsca przyłączenia podstawnika, dużą rolę odgrywa rodzaj zastosowanej linii komórkowej. Co więcej, dane literaturowe wskazują, że zamiana ugrupowania izoprenylowego imperatoryny bądź izoimperatoryny na podstawnik metoksylowy bergaptenu lub ksantotoksyny znacznie zmniejsza wrażliwość linii HeLa na indukcję apoptozy [Okuyama, 1990]. Doniesienia te są zgodne z moimi wynikami, które uzyskałam po aplikacji imperatoryny i ksantotoksyny w liniach AA i GBM. Okazało się wówczas, że pochodna metoksylowa (ksantotoksyna), podstawiona w pozycji

C8 była zdecydowanie mniej skuteczna od pochodnej izoprenylowej (imperatoryna), w której podstawnik zlokalizowany był w tym samym miejscu. Podobne wyniki otrzymał zespół kierowany przez Sigurdsson, który zaobserwował, że aktywność antyproliferacyjna imperatoryny w stosunku do komórek raka trzustki (linia Panc-1) znacznie przewyższała aktywność ksantotoksyny [Sigurdsson, 2004]. W tym miejscu na podkreślenie zasługuje fakt, że w przypadku związków zawierających ugrupowanie przyłączone do 5 atomu węgla (bergapten i izoimperatoryna), ich właściwości nie zależały od rodzaju przyłączonego podstawnika (metoksyłowego bergaptenu i izoprenylowego izoimperatoryny), a poziom indukcji apoptozy pozostawał na zbliżonym poziomie. Co więcej, z przeprowadzonych przeze mnie badań wynika, że komórki glejaka wielopostaciowego były znacznie bardziej wrażliwe na działanie ksantotoksyny niż bergaptenu, co zostało zaobserwowane również przez Widelskiego i wsp. w komórkach białaczki (HL-60) [Widelski, 2017]. Korelacja taka nie występowała z kolei w linii MOGGCCM, gdzie obie kumaryny działały na podobnym poziomie.

Standardowo stosowana metoda leczenia glejaków obejmuje resekcję, po której następuje radio- i chemioterapia z wykorzystaniem środków alkilujących, głównie temozolomidu. Jak wiadomo, w trakcie stosowanego leczenia farmakologicznego, na poziomie komórkowym często dochodzi do uruchamiania mechanizmów oporności na indukcję apoptozy. Dlatego też duże nadzieje pokłada się w tzw. terapii skojarzonej, wykorzystującej kilka różnych leków jednocześnie. Dotychczasowe badania wykazały, że działanie przeciwnowotworowe temozolomidu może być potęgowane przez związki pochodzenia roślinnego [Jakubowicz-Gil, 2011; Jakubowicz-Gil, 2013]. Z tego względu, oprócz pojedynczej aplikacji cytostatyku podjęłam próbę sprawdzenia jak w roli adiuwanta sprawdzają się kumaryny. Jak wynika z przeprowadzonych przeze mnie badań, aktywność proapoptotyczna temozolomidu była wyższa w stosunku do linii glejaka wielopostaciowego, podczas gdy inkubacja komórek gwiaździaka anaplastycznego z cytostatykiem powodowała głównie autofagię. Na poziomie molekularnym obserwowałam wówczas wzrost ilości kaspazy 3 oraz obecność kompleksów Bcl-2:beklina 1, co wyjaśnia przewagę odsetka komórek apoptotycznych nad autofagalnymi w linii glejaka wielopostaciowego. W przypadku gwiaździaka anaplastycznego, przeważająca indukcja autofagii wiązała się ze znacznym wzrostem poziomu markera tego procesu – bekliny 1. Co więcej, cytostatyk hamował również migrację komórek obu typów glejaków, przy czym wyższą skuteczność odnotowałam w stosunku do linii MOGGCCM.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że kumaryny zmniejszały proautofagalny potencjał temozolomidu w ludzkich komórkach glejaka wielopostaciowego. W świetle ostatnich doniesień o możliwości wykorzystania tego procesu jako mechanizmu przeżycia komórek nowotworowych, uzyskane wyniki wydają się być wysoce pożądane [Jin, 2008]. Zaobserwowano, że zahamowanie procesu autofagii znacząco zwiększa skuteczność stosowanych terapii przeciwnowotworowych [Amaravadi, 2019]. Autofagia może również odpowiadać za wykształcanie oporności na stosowane chemioterapeutyki, m. in. poprzez ochronę komórek nowotworowych przed zaprogramowaną śmiercią [Lim, 2020], co wyjaśniałoby znacznie słabszy efekt proapoptotyczny kombinacji furanokumaryn z temozolomidem, w porównaniu do pojedynczej aplikacji każdej z nich. W hodowli glejaka wielopostaciowego, zmniejszeniu indukcji apoptozy pod wpływem imperatoryny i TMZ, towarzyszył wzrost ilości białka Bcl-2, którego poziom w przypadku pojedynczej aplikacji leków był o wiele niższy. Wyniki te są zgodne z innymi doniesieniami, według których wzmożona ekspresja genu kodującego Bcl-2 w komórkach glejaka prowadzi do wzrostu lekooporności i zmniejszenia odpowiedzi apoptotycznej *in vitro* [García-Aranda, 2018]. Dodatkowo, brak kompleksów Bcl-2:beklina 1 po równoczesnej aplikacji imperatoryny i TMZ, sugeruje, że Bcl-2 tworzyło wiązania z białkami proapoptotycznymi, uniemożliwiając przebieg apoptozy. Komórki glejaka wielopostaciowego okazały się znacznie bardziej wrażliwe na działanie cytostatyku w połączeniu z kumarynami prostymi. Temozolomid bowiem działał antagonistycznie jedynie w połączeniu z eskuliną, podczas gdy pozostałe kombinacje (z ostolem, umbeliferonem i 4-hydroksykumaryną) okazały się synergistyczne. Zwiększony poziom indukcji apoptozy po aplikacji ostolu z TMZ korelował ze wzrostem ilości i aktywności kaspazy 3, a spadek poziomu białka Bcl-2 wskazywać może na przebieg apoptozy drogą mitochondrialną [Guntuku, 2016]. Obecność kompleksów Bcl-2:beklina 1 w komórkach GBM wyjaśnia z kolei dość niski poziom autofagii w porównaniu do apoptozy.

W przypadku gwiazdziaka anaplastycznego kumaryny również znacząco zmniejszały proautofagalne właściwości cytostatyku, jednak w mniejszym stopniu niż w przypadku glejaka wielopostaciowego. Wyjaśnić to można niższym poziomem białek autofagalnych w glejakach o wysokim stopniu złośliwości w porównaniu z glejakami diagnozowanymi na niższym stopniu [Kaza, 2012; Pirtoli, 2009]. Jak wynika z moich badań, zastosowanie skojarzonej inkubacji nie wpływało na właściwości proapoptotyczne 7-hydroksykumaryn (eskulina i umbeliferon) i metoksyłowych pochodnych psoralenu (bergapten

i ksantotoksyna), natomiast obniżało skuteczność pochodnych izoprenylowych (ostol i imperatopryna). Na poziomie komórkowym, traktowanie komórek AA imperatoryną i TMZ zmniejszało zarówno ilość jak i aktywność kaspazy 3. Co więcej, pomimo obecności kompleksu białek Bcl-2:beklina 1, potencjał proapoptotyczny tej kombinacji był znacznie słabszy. Na poziomie molekularnym obserwowałam wówczas zwiększony poziom białka Bcl-2 przy stałym poziomie bekliny 1. Sugerować to może, że jedynie część Bcl-2 weszła w interakcje z bekliną 1, podczas gdy pozostała część mogła utworzyć kompleksy z białkami proapoptotycznymi, hamując tym samym przebieg tego procesu. W przypadku ostolu, związek w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z TMZ zwiększał poziom kaspazy 3, przy czym jej wzmożona aktywność występowała jedynie po zastosowaniu samej kumaryny. Inkubacja skojarzona obydwu związków blisko dwukrotnie zmniejszała ilość funkcjonalnego białka w porównaniu do aplikacji pojedynczej, co również może wyjaśniać słabszy efekt kombinacji związków. Kaspaza 3 jest wspólną kaspazą efektorową dla apoptozy przebiegającej szlakiem receptorowym i mitochondrialnym, a jak wiadomo nie sama ilość, a aktywność białka odgrywa tu kluczową rolę [Pfeffer, 2018]. Wyjaśnieniem spadku aktywności proapoptotycznej ostolu w kombinacji z TMZ może być też brak kompleksów Bcl-2:beklina 1, co wskazuje na antyapoptotyczną funkcję białka Bcl-2. Analiza mikroskopowa komórek AA inkubowanych z ostolem i temozolomidem, obok komórek apoptotycznych wykazała dodatkowo obecność autofagii. Proces ten jednak występował znacznie rzadziej w porównaniu do aplikacji każdego ze związków osobno i związany był ze wzrostem poziomu bekliny 1, będącej kluczowym składnikiem kompleksu PI3K, regulującego proces autofagii na wczesnych etapach powstawania autofagosomu. Nadmierana ilość białka PI3K często koreluje ze wzmożoną aktywnością tego procesu [Parzych, 2014]. Jak wiadomo z danych literaturowych, w zdecydowanej większości glejaków obserwowane są zmiany w przekazywaniu sygnału od błony komórkowej do jądra poprzez wewnątrzkomórkowe szlaki [Ludwig, 2017]. Na szczególną uwagę zasługują ścieżki RAS-RAF-MEK-ERK oraz PI3K-AKT/PKB-mTOR. Ich nadmierna aktywacja prowadzi do wzmożonej proliferacji komórek nowotworowych, promuje ich przeżycie oraz pobudza angiogenezę. Zaobserwowano, że szlaki te odgrywają również ważną rolę w nabywaniu oporności na stosowane terapie [Steelman, 2011]. Ich pobudzenie obserwuje się w przeważającej części wtórnych glejaków, nie podatnych na leczenie TMZ [Haas, 2018], a obecność aktywnej kinazy MAPK jest predyktorem oporności na radioterapię i tym samym słabszej skuteczności leczenia [Wang, 2015]. Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że jednym z mechanizmów przeciwnowotworowej aktywności kumaryn jest ich zdolność do

modulacji poziomu i aktywności białek zaangażowanych w przekazywaniu sygnału za pomocą wspomnianych szlaków. Analiza poziomu kluczowych elementów tych ścieżek – kinazy PI3K oraz RAF wykazała, że ostol, zarówno w aplikacji pojedynczej jak i skojarzonej z TMZ, znacząco zmniejszał poziom tych białek w obu liniach komórkowych oraz wpływał na aktywność białek efektorowych wspomnianych kinaz. W komórkach gwiazdzianki anaplastycznej, ostol zmniejszał aktywność AKT/PKB, podczas gdy aplikacja skojarzona znacząco zwiększała ilość ufosforylowanego białka, dodatkowo redukując aktywność ERK. Na poziomie mikroskopowym towarzyszyło temu zmniejszenie odsetka komórek apoptotycznych w porównaniu do monoterapii kumaryną, co sugerować może, że aktywność proapoptyczna ostolu związana była ze zdolnością do zmniejszania przeżywalności wewnątrzkomórkowej za pomocą szlaku PI3K-AKT/PKB-mTOR. Mechanizm hamowania apoptozy przez AKT/PKB opiera się na fosforylacji białek zaangażowanych w ten proces, m. in. proapoptycznego białka BAD oraz kaspazy 9. Co ciekawe, sekwencja konsensusowa fosforylowana przez tę kinazę występuje również w obrębie RAF, co prowadzi do inaktywacji enzymu, czego skutkiem jest zmniejszenie aktywności pozostałych ogniw szlaku RAS-RAF-MEK-ERK [Zimmermann, 1999]. Zatem spadek aktywności białka ERK w komórkach AA po aplikacji ostolu i temozolomidu, mógł być następstwem zwiększonej aktywności AKT/PKB. W linii glejaka wielopostaciowego aplikacja ostolu, pojedynczo i w kombinacji z TMZ w takim samym stopniu zmniejszała poziom PI3K oraz aktywność AKT/PKB. Dodatkowo, kumaryna znacząco redukowała aktywność kinazy ERK, podczas gdy zmian tych nie obserwowano po równoczesnej aplikacji ostolu i TMZ. Zwiększona indukcja apoptozy po jednoczesnej inkubacji korelowała ze spadkiem aktywności AKT/PKB oraz wzrostem aktywności białka ERK w porównaniu do monoterapii. Imperatoryna również miała zdolność do zmniejszania ilości kinaz PI3K i RAF. Co ciekawe, równoczesna aplikacja z TMZ redukowała poziom kinazy RAF w komórkach AA w takim samym stopniu jak sama furanokumaryna, jednak znacznie zmniejszała aktywność ERK (w porównaniu do aplikacji wyłącznie imperatoryny). Wskazywać to może na zmiany w obrębie ekspresji, aktywności bądź celu działania pozostałych ogniw tego szlaku. Wiadomo bowiem, że kinaza RAF podwyższa poziom białka Bcl-2, co obserwowałam w swoich badaniach. Bcl-2 z kolei wchodzi w interakcje z kinazą RAS, hamując tym samym jej proapoptyczne właściwości [Kang, 2013]. Jednocześnie, nie odnotowałam wpływu aplikacji imperatoryny w połączeniu z TMZ na przeżywalność za pomocą szlaku PI3K-AKT/PKB-mTOR. Niezmieniona aktywność obu szlaków obserwowana była również w komórkach T98G.

Ze względu na duży udział nadmiernej aktywności szlaków RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR w zwiększaniu oporności glejaków na stosowaną farmakoterapię, obiecującą formą leczenia wydaje się zastosowanie terapii ukierunkowanej molekularnie, której celem są białka przekąźnikowe wspomnianych szlaków sygnałowych. Opisano dotychczas, że zablokowanie transmisji przez RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR specyficznymi inhibitorami korzystnie zwiększa wrażliwość komórek glejaka na indukcję zaprogramowanej śmierci, a terapia skojarzona, zwłaszcza ze związkami naturalnymi, potęguje potencjał przeciwnowotworowy klinicznie stosowanej farmakoterapii [Jakubowicz-Gil, 2009; Schwartzbaum, 2006]. Dlatego też, obok pojedynczej aplikacji wspomnianych kumaryn, zastosowałam ich kombinację z inhibitorami wspomnianych białek: sorafenibem (inhibitor RAF) i LY294002 (inhibitor PI3K).

Sorafenib, lek aktualnie stosowany w leczeniu raka nerkowokomórkowego i wątrobowokomórkowego, a także raka tarczycy, jest inhibitorem kinazy RAF. Najnowsze doniesienia wskazują, że związek hamuje tworzenie nowych naczyń krwionośnych oraz proliferację komórek glejaków, dzięki czemu jest potencjalnym związkiem mogącym znaleźć zastosowanie również w leczeniu GBM [Jo, 2018; Siegelin, 2010]. Jak wynika z moich badań, proapoptotyczne działanie sorafenibu w stosunku do linii MOGGCCM i T98G było znikome, a w komórkach T98G związek ten okazał się skutecznym induktorem autofagii (12%), co związane było ze wzrostem poziomu bekliny 1. Wykazano dotychczas, że znacznie lepsze efekty od pojedynczej aplikacji sorafenibu otrzymuje się poprzez zastosowanie inkubacji skojarzonej, wykorzystującej związku pochodzenia naturalnego, m.in. kwercetynę bądź lenzozyd [Maciejczyk, 2021; Jakubowicz-Gil, 2014]. Dlatego też w przeprowadzonych badaniach zastosowałam kombinację sorafenibu z kumarynami. Okazało się, że połączenie takie istotnie zmniejszało aktywność proautofagalną chemioterapeutyku, co związane było ze spadkiem poziomu bekliny 1. Odnotowałam również znacznie wyższą skuteczność proapoptotyczną równoczesnej aplikacji sorafenibu z imperatoryną bądź ostolem w komórkach glejaka wielopostaciowego, co wyjaśnić można spadkiem poziomu kinazy RAF pod wpływem aplikacji samego leku [Zajac, 2021]. Wiadomo bowiem, że RAF, poprzez zdolność do aktywacji białek z rodziny IAP (ang. *inhibitors of apoptosis*), odpowiedzialnych za unieczynnianie kaspaz, wpływa na hamowanie przebiegu apoptozy. Co więcej, kinaza ma zdolność do fosforylacji białek z rodziny Bcl-2, w tym proapoptotycznego białka Bad. Zlokalizowana wówczas w cytozolu proteina nie ma

możliwości tworzenia megakanałów, przez które uwalniany jest cytochrom c [Baccarini, 2002]. Co ciekawe, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że komórki gwiazdki anaplastycznego były zdecydowanie bardziej odporne na indukcję zaprogramowanej śmierci przez sorafenib w połączeniu z badanymi kumarynami, w porównaniu do glejaka wielopostaciowego. Zastosowane kombinacje inhibitora z kumarynami okazały się antagonistyczne i towarzyszył im spadek poziomu kaspazy 3. Uzyskane wyniki wskazują zatem, że terapia skojarzona wykorzystująca sorafenib może być efektywniejsza w glejakach o wyższych stadiach złośliwości, co jest zgodne z dotychczasowymi doniesieniami, wg których zastosowanie inhibitora równocześnie z kwercetyną, lenzozodem oraz LY294002 jest efektywniejsze w komórkach glejaka wielopostaciowego w porównaniu do gwiazdki anaplastycznego [Zajac, 2021; Maciejczyk, 2021; Jakubowicz-Gil, 2014].

LY294002 jest morfolinową pochodną kwercetyny o silnych właściwościach przeciwnowotworowych. Wykazano dotychczas, że związek ten poprzez obniżenie poziomu PI3K i aktywności AKT/PKB, znacząco zmniejsza zdolność inwazyjną komórek glejaka linii U87 (GBM) [Chen, 2012]. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowałam, że związek indukował autofagię w ok. 40% komórek gwiazdki anaplastycznego, co korelowało ze wzrostem poziomu bekliny 1. W przypadku glejaka wielopostaciowego proces ten występował w ok. 20% komórek, a dominującym typem śmierci była apoptoza. Wcześniejsze badania wykazały, że procesowi temu towarzyszy spadek potencjału błony mitochondrialnej oraz wzrost aktywności kaspaz 3 i 9, co sugerować może o przebiegu apoptozy drogą mitochondrialną [Zajac, 2021]. W moich badaniach wykazałam, że właściwości proautofagelne inhibitora PI3K były niwelowane przez jednoczesną aplikację kumaryn, czemu towarzyszył spadek ekspresji bekliny 1. Równocześnie zaobserwowałam, że skuteczność takiej terapii w indukcji apoptozy była porównywalna do monoterapii większością zastosowanych kumaryn.

Jak wykazałam, zarówno sorafenib jak i LY294002 posiadają zdolność do ograniczania mobilności komórek nowotworowych. Opisano dotychczas, że sorafenib hamuje ekspresję białek macierzy zewnątrzkomórkowej - MMP-1 i MMP-9, zwiększając równocześnie poziom adhezyjnego białka - E-kadheryny w komórkach raka piersi (linie MCF-7 i MDA-MB-231) [Dattachoudhury, 2020]. Z kolei aktywność LY294002 związana jest z hamowaniem ekspresji metaloproteiny 2, a także wzrostem poziomu czynnika odpowiedzi na wczesny wzrost 1 - EGR-1 (ang. *early growth response factor 1*). Proteina

odpowiada za regulację ekspresji genów kodujących białka biorące udział w procesach nowotworzenia [Liu, 2008; Shukla, 2007]. Co ciekawe, przeprowadzone badania wykazały, że znacznie skuteczniejsza od aplikacji samych inhibitorów była równoczesna inkubacja ostolem bądź imperatoryną.

W celu uzyskania bezpośrednich dowodów na zaangażowanie szlaków RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR w zwiększanie oporności glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci przez chemioterapeutyki, zablokowałam ekspresję kinaz RAF i PI3K specyficznymi siRNA. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że wyciszenie ekspresji obu białek znacząco zwiększało aktywność proapoptotyczną temozolomidu, ostolu i imperatoryny, zarówno w aplikacji pojedynczej jak i skojarzonej. W przypadku gwiazdziaka anaplastycznego skuteczniejsze okazało się wyciszenie ekspresji kinazy RAF, podczas gdy w komórkach glejaka wielopostaciowego – kinazy PI3K. Wówczas aplikacja pochodnych kumaryny niemal całkowicie eliminowała komórki glejaków na drodze apoptozy (>90%). Uzyskane wyniki wskazują na ogromny potencjał, jaki daje zahamowanie przewodnictwa wewnątrzkomórkowego za pomocą wspomnianych szlaków w zwiększaniu wrażliwości komórek glejaków na indukcję apoptozy. Jak wykazałam, bezpośrednie zablokowanie aktywności szlaków, poprzez wyciszenie ekspresji PI3K i RAF jest znacznie skuteczniejsze od zastosowania inhibitorów tych białek, co związane jest z niższą specyficznością działania stosowanych chemioterapeutyków. Skuteczne zablokowanie przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego wymaga zatem opracowania precyzyjniejszych leków.

Uzyskane wyniki sugerują zatem, że aktywność przeciwnowotworowa zastosowanych związków zależy od ich struktury chemicznej oraz linii komórkowej. Wyższa aktywność kumaryn prostych i furanokumaryn uwarunkowana jest obecnością podstawnika izoprenyloвого ostolu bądź imperatoryny w pozycji C8, a zmiana jego lokalizacji wiąże się ze spadkiem właściwości proapoptotycznych związku. Obok zdolności do indukcji zaprogramowanej śmierci, kumaryny ograniczają również potencjał migracyjny komórek glejaków. Jak wykazałam związki te mogą być stosowane jako adiuwanty, zwiększające skuteczność chemioterapeutyków – temozolomidu, sorafenibu i LY294002, a efektywność ich działania zależy od aktywności przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego przez szlaki RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do opracowywania nowych strategii terapeutycznych, uwrażliwiających komórki glajaka na indukcję zaprogramowanej śmierci

VI. WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie najważniejszych wniosków:

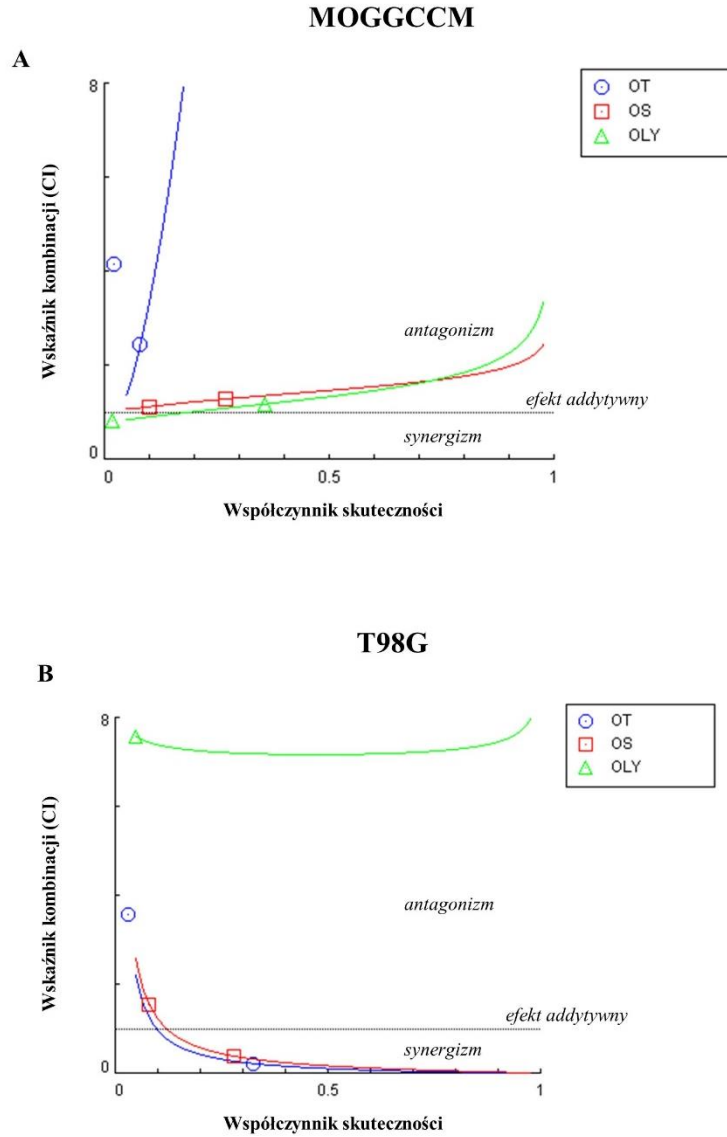
1. Wrażliwość komórek glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci zależała od linii komórkowej i zastosowanego związku.
2. Kumaryny proste i furanokumaryny skutecznie indukowały zaprogramowaną śmierć w ludzkich komórkach glejaków, a dominującym typem śmierci była apoptoza, przebiegająca szlakiem mitochondrialnym.
3. Proapoptotyczna aktywność badanych kumaryn zależała od ich struktury chemicznej. Obecność ugrupowania izoprenyloвого zwiększała właściwości przeciwnowotworowe, podczas gdy zastąpienie podstawnika metoksylowego przez pierścień furanu obniżało cytotoksyczność związku w stosunku do komórek glejaków.
4. Kompleksy białek Bcl-2 i beklina 1 odgrywały kluczową rolę w kierowaniu śmiertelnego sygnału na drogę apoptozy bądź autofagii w komórkach glejaków.
5. Zablockowanie przekazywania sygnałów poprzez wewnątrzkomórkowe szlaki RAS-RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT/PKB-mTOR znacząco uwrażliwiało komórki gwiazdziaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego na działanie ostolu i imperatoryny.
6. Ostol i imperatoryna, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z TMZ skutecznie hamowały migrację komórek glejaków III^o i IV^o.
7. Ostol i imperatoryna obniżały potencjał proautofagalny temozolomidu, sorafenibu i LY294002 w ludzkich komórkach glejaka wielopostaciowego i gwiazdziaka anaplastycznego.

VII. SUPLEMENT - ocena skuteczności aplikacji skojarzonej

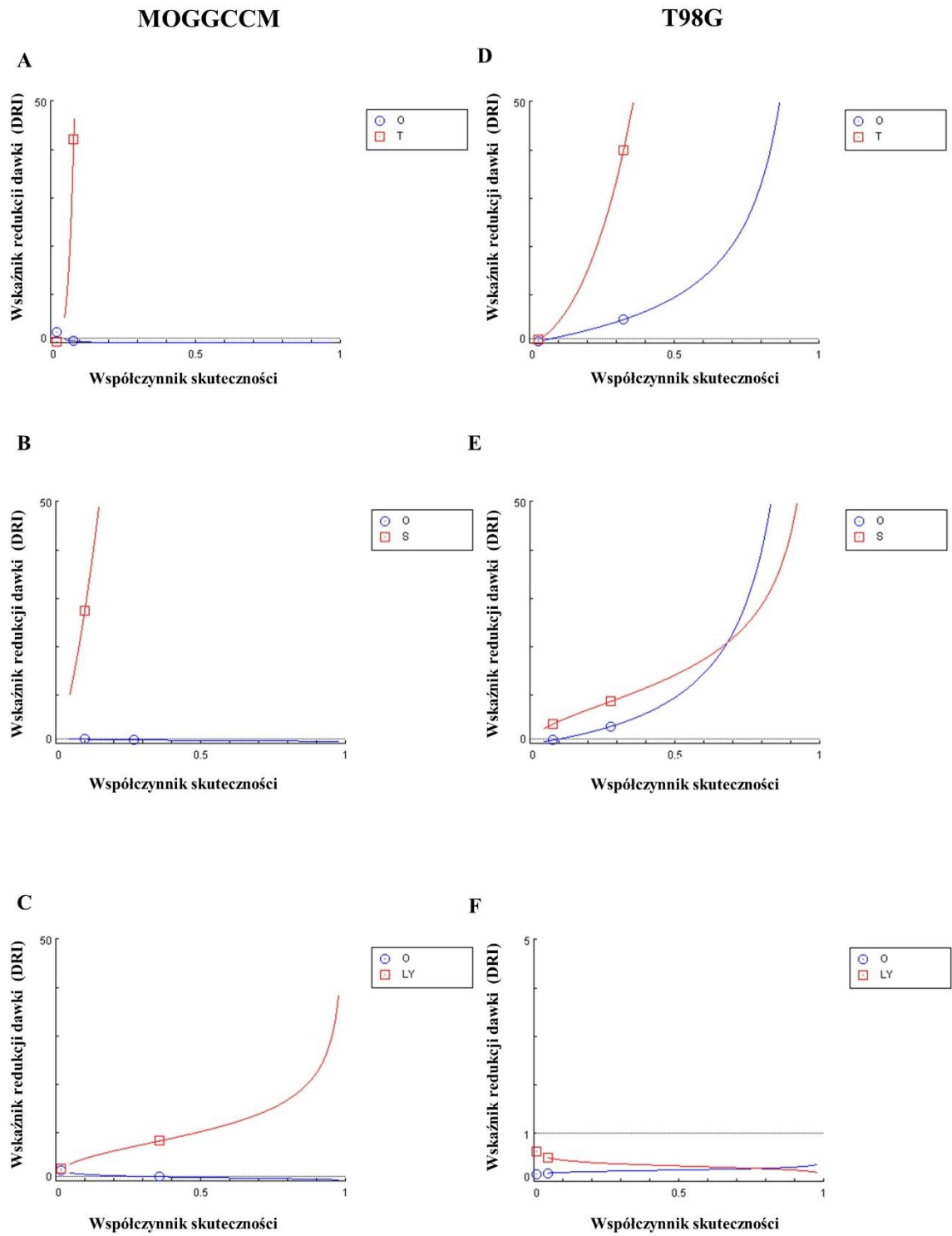
Obok metody doświadczalnej, skuteczność zastosowanego leczenia skojarzonego oceniono przy pomocy metody Chou-Talalay, wykorzystując w tym celu program CompuSyn. Określono wówczas wskaźnik kombinacji (CI, ang. *combination index*) oraz wskaźnik redukcji dawki (DRI, ang. *dose reduction index*) dla poszczególnych wariantów terapii skojarzonej, a także wykreślono izobologramy, na podstawie których dobrano odpowiednie stężenia leków w terapii skojarzonej.

2.5.Ostol

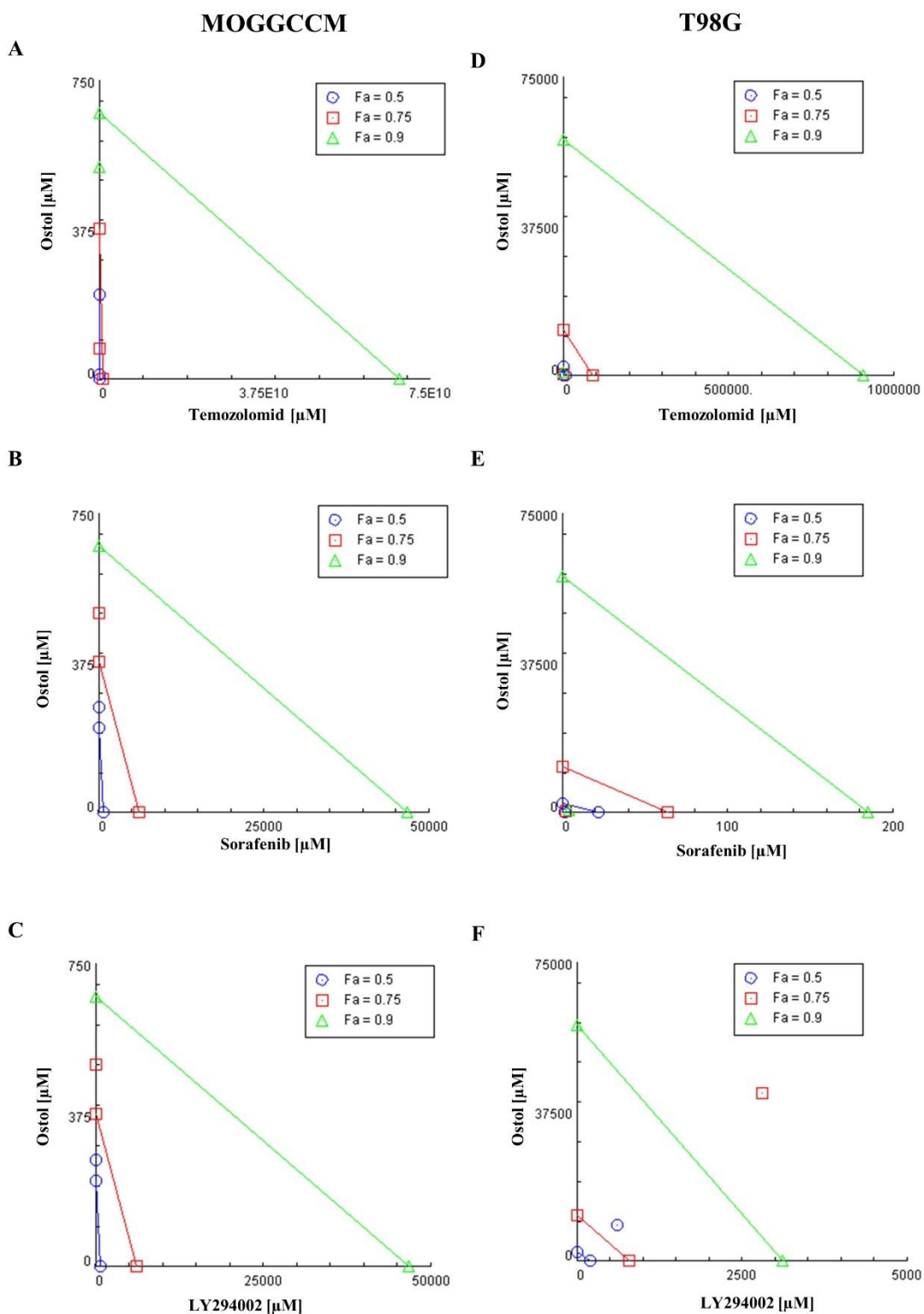
W celu określenia wzajemnego oddziaływania ostolu z temozolomidem, sorafenibem oraz LY294002 wyznaczono wskaźnik kombinacji (CI). $CI = 1$ informuje o addytywnym działaniu kombinacji leków, podczas gdy $CI < 1$ i $CI > 1$ oznacza odpowiednio efekt synergistyczny i antagonistyczny. Wyniki uzyskane w linii MOGGCCM wskazały na istnienie antagonizmu pomiędzy ostolem a pozostałymi związkami (temozolomidem, sorafenibem i LY294002) (Ryc. 51A). Jedynie przy niższych efektach działania leków ($IC > 20\%$), kombinacja ostolu z inhibitorem kinazy PI3K okazała się synergistyczna bądź addytywna. Wyniki te korelowały z kolejnym parametrem, mającym duże znaczenie przy planowaniu terapii skojarzonej - wskaźnikiem DRI. Informuje on o redukcji dawki związku ($DRI > 1$) w porównaniu do monoterapii, pozwalając tym samym na zmniejszenie ilości leku podawanego pacjentowi. W linii MOGGCCM osiągnięcie tego samego efektu przeciwnowotworowego ostolu w terapii skojarzonej wymagało znacznego zwiększenia dawki leku (Ryc. 52A-C). Jednocześnie kumaryna zwielokrotniała DRI pozostałych związków użytych w kombinacji. Dodatkowo, na podstawie sporządzonych izobologramów sprawdzono, czy stężenia leków dobrane na podstawie pojedynczej aplikacji leków były równie skuteczne w terapii skojarzonej (Ryc. 53A-C). W przypadku aplikacji ostolu z inhibitorami (sorafenibem i LY294002), dawki stosowane w monoterapii okazały się optymalne również w leczeniu skojarzonym. Inne wyniki uzyskano dla kombinacji kumaryny z temozolomidem. Wówczas osiągnięcie oczekiwanych efektów wymagałoby zastosowania znacznie wyższych stężeń. W badaniach eksperymentalnych zaobserwowano jednak, że stężenie ostolu powyżej $200 \mu\text{M}$ wykazuje działanie nekrotyczne, dlatego również w tym przypadku zastosowano stężenia dobrane doświadczalnie.



Rycina 51. Wykres zależności wskaźnika kombinacji (CI) od współczynnika skuteczności zastosowanego leczenia skojarzonego (1 oznacza 100% komórek martwych) w linii MOGGCCM (A) i T98G (B); CI < 1, CI = 1 i CI > 1 wskazują odpowiednio na efekt synergistyczny, addytywny i antagonistyczny; O-ostol, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002.



Rycina 52. Wykres zależności wskaźnika redukcji dawki (DRI) od współczynnika skuteczności zastosowanego leczenia skojarzonego (1 oznacza 100% komórek martwych) w linii MOGGCCM (A) i T98G (B); DRI>1 oznacza redukcję dawki; O-ostol, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002.



Rycina 53. Klasyczny izobologram przedstawiający interakcje ostolu z temozolomidem (A,D), sorafenibem (B,E) oraz LY294002 (C,F) przy 50%, 75% i 100% efekcie działania leków w linii MOGGCCM (A,B,C) oraz T98G (D,E,F); O-ostol, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002.

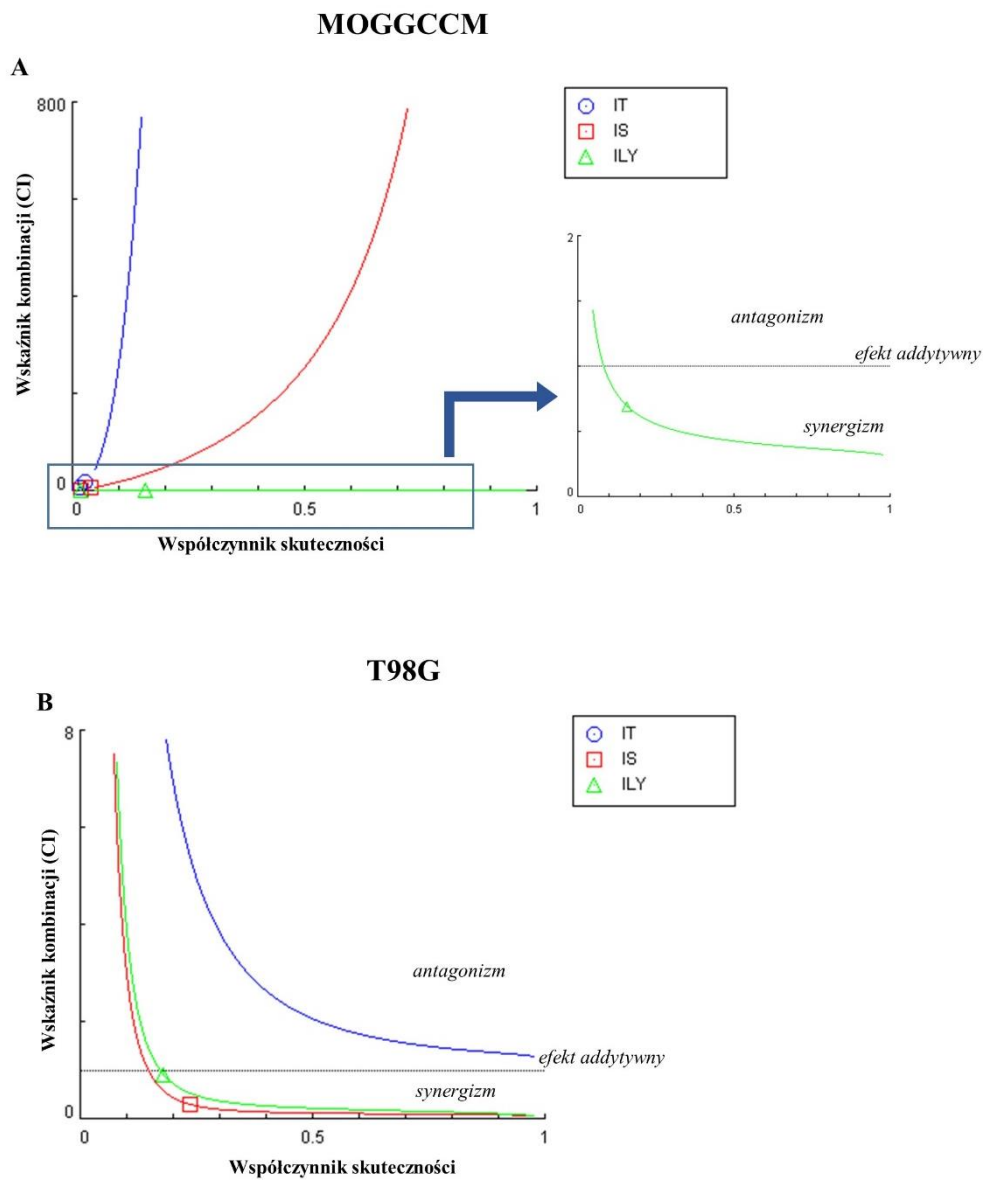
Zupełnie inne wyniki otrzymano w linii T98G (Ryc. 51B). Wówczas antagonizm zaobserwowano jedynie po podaniu kumaryny z LY294002. Synergizm działania pozostałych kombinacji (ostolu z sorafenibem oraz z temozolomidem) wzrastał wraz ze wzrostem efektywności leczenia, co jest niezwykle istotne w przypadku terapii przeciwnowotworowej. Wyniki te korelowały z wartościami DRI (Ryc. 52D-F). Współczynnik, w przypadku terapii ostolem i temozolomidem bądź sorafenibem, wzrastał wraz ze wzrostem skuteczności leczenia, zmniejszając tym samym dawki obu leków. Jedynie aplikacja kumaryny z LY294002 zmniejszała jego wartość poniżej 1 ($DRI < 1$). Analiza izobolograficzna wykazała, że stężenia leków stosowanych w aplikacji pojedynczej dawały optymalny efekt również w terapii skojarzonej.

2.6.Imperatoryna

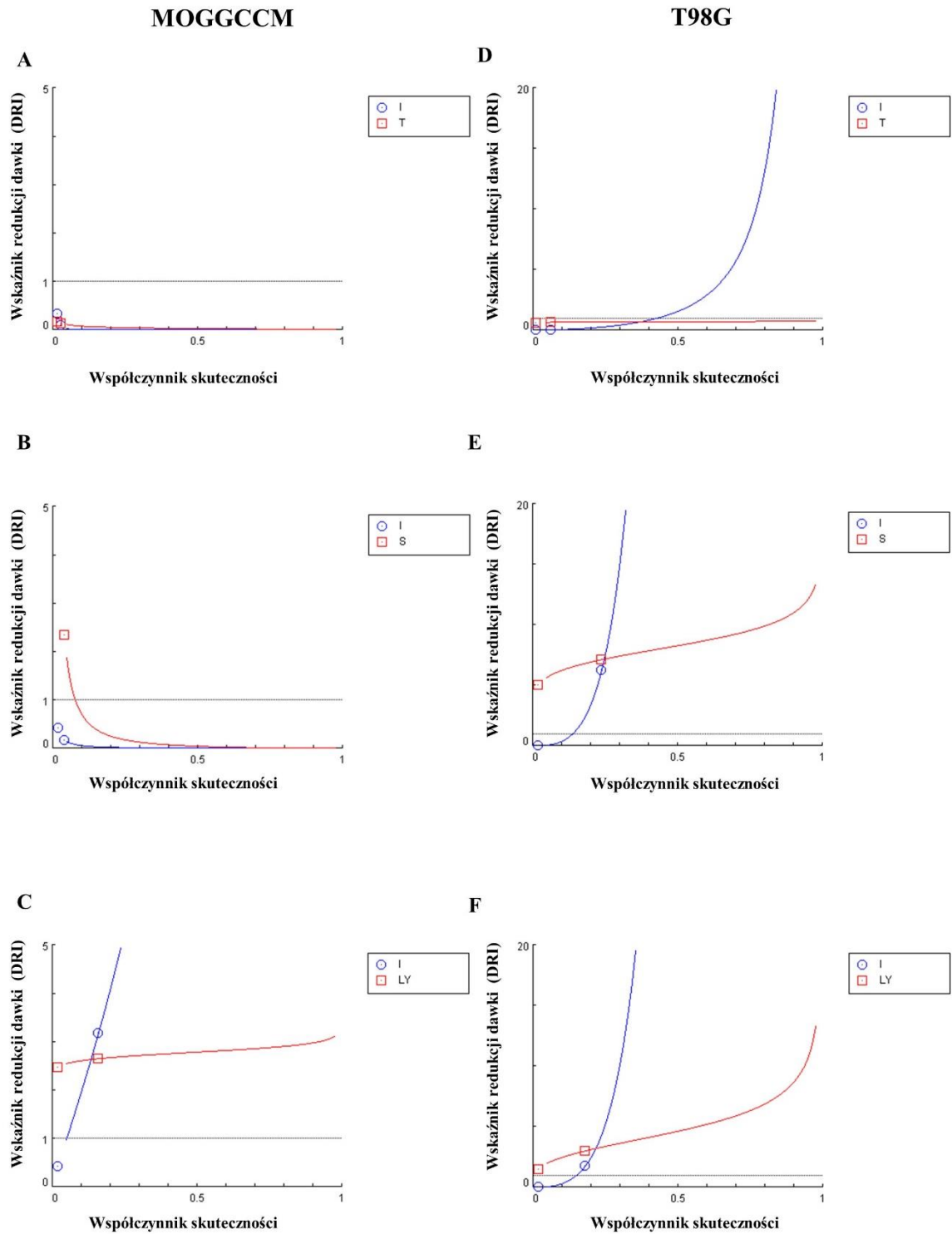
Podobnie jak kombinacje ostolu, również terapia skojarzona z zastosowaniem imperatoryny poddana została analizie przy pomocy testu Chou-Talalay. Wyniki uzyskane w linii MOGGCCM świadczą, że furanokumaryna wykazywała działanie synergistyczne jedynie w połączeniu z LY294002 dla $CI > 10\%$. Dla niższych efektów działania, kombinacja ta dawała efekt antagonistyczny. Występował on także po zastosowaniu terapii z temozolomidem bądź sorafenibem (Ryc. 54A). Otrzymane wyniki korelowały z uzyskaną wartością DRI ($DRI < 1$), a stężenie leków (ostolu, temozolomidu i sorafenibu), dających ten sam efekt proapoptotyczny, powinny być wyższe przy aplikacji równoczesnej, w porównaniu do podania pojedynczego (Ryc. 55A,B). Jedynie kombinacja furanokumaryny z LY294002 w znaczący sposób redukowała dawki obu leków (Rycina 53C). Na podstawie wartości CI oraz wykonanych izobogramów określono, że stężenia wszystkich związków stosowanych w monoterapii są optymalne również w przypadku terapii skojarzonej (Ryc. 56A-C).

Znacznie lepsze efekty otrzymano w hodowli glejaka wielopostaciowego. Wówczas jedynie po sprzężeniu działania imperatoryny z cytostatykiem obserwowano efekt antagonistyczny (Ryc. 54B). Kombinacja furanokumaryny z inhibitorami (sorafenibem bądź LY294002) wykazywała takie działanie jedynie przy niskim współczynniku skuteczności (< 0.15). Wyższe efekty działania ($> 15\%$) korelowały z występowaniem synergizmu, który wzrastał wraz z efektywnością leczenia (Ryc. 55B). Również w tym przypadku uzyskane wartości DRI były równoważne z wyznaczonym CI. Wówczas współczynnik ten wzrastał

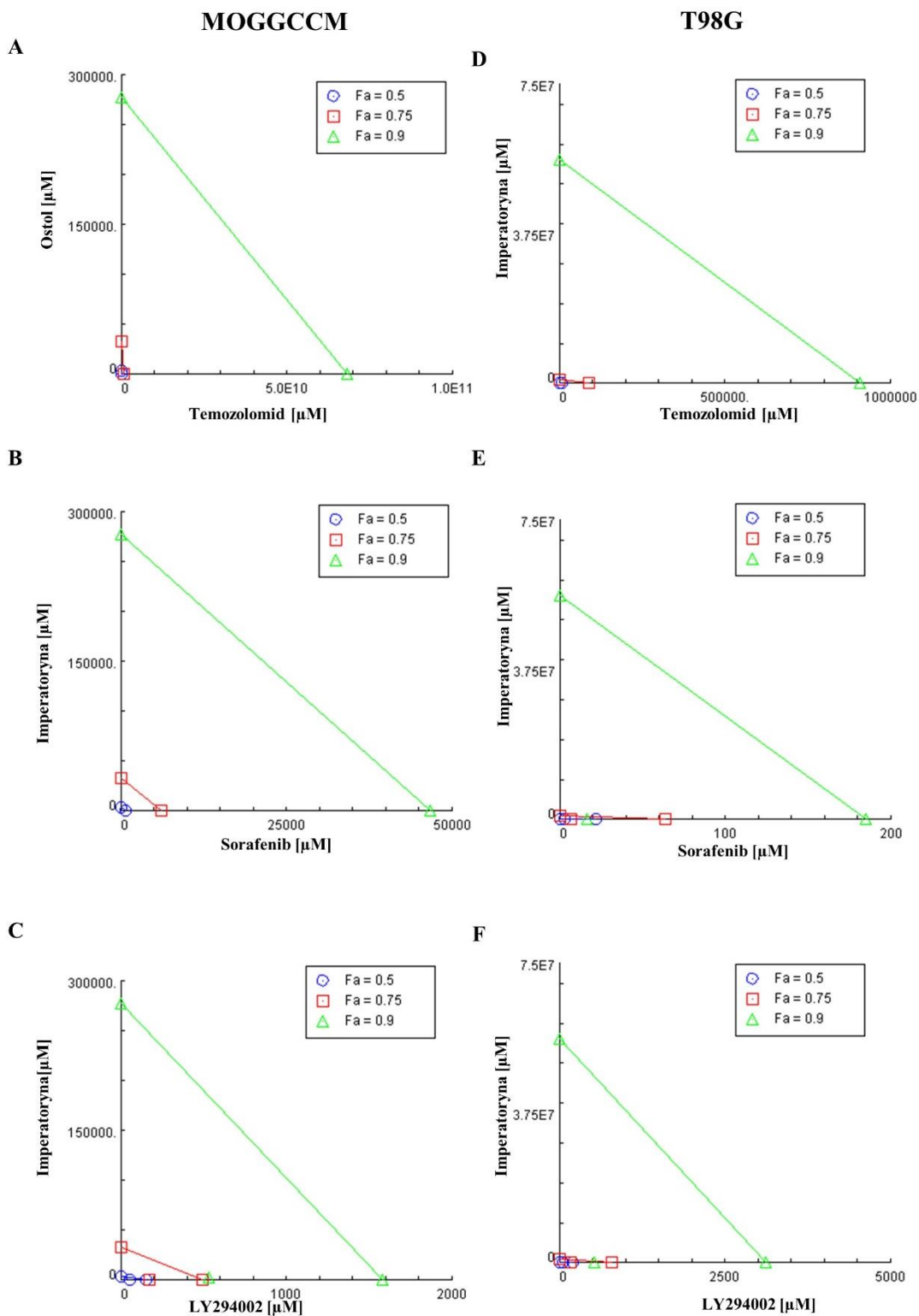
dla terapii imperatoryną w połączeniu z sorafenibem i LY294002 oraz zmniejszał się w kombinacji z TMZ (Ryc. 55D-F). Analiza izobolograficzna wykazała, że stężenia wybrane w sposób doświadczalny dają najlepszy efekt również w terapii skojarzonej (Ryc. 56D-F).



Rycina 54. Wykres zależności wskaźnika kombinacji (CI) od współczynnika skuteczności zastosowanego leczenia skojarzonego (1 oznacza 100% komórek martwych) w linii MOGGCCM (A) i T98G (B); CI <1, CI = 1 i CI > 1 wskazują odpowiednio na efekt synergistyczny, addytywny i antagonistyczny; I-imperatoryna, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002.



Rycina 55. Wykres zależności wskaźnika redukcji dawki (DRI) od współczynnika skuteczności zastosowanego leczenia skojarzonego (1 oznacza 100% komórek martwych) w linii MOGGCCM (A) i T98G (B); DRI>1 oznacza redukcję dawki; I-imperatoryna, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002.



Rycina 56. Klasyczny izoblogram przedstawiający interakcje ostolu z temozolomidem (A,D), soforefanibem (B,E) oraz LY294002 (C,F) przy 50%, 75% i 100% efekcie działania leków w linii MOGGCCM (A,B,C) oraz T98G (D,E,F); I-imperatoryna, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Allen S., Sotos J., Sylte MJ., Czuprynski CJ., 2001, Use of Hoechst 33342 *Staining To Detect Apoptotic Changes in Bovine Mononuclear Phagocytes Infected with.* Microbiology 8(2): 460 – 464.
2. Amaravadi RK., Kimmelman AC., Debnath J., 2019, *Targeting Autophagy in Cancer: Recent Advances and Future Directions.* Cancer Discov. 9: 1167 – 1181.
3. Amicis F., Aquila S., Morelli C., Guido C., Santoro M., Perrotta I., Mauro L., Giordano F., Nigro A., Andò S., Panno M., 2015, *Bergapten drives autophagy through the up-regulation of PTEN expression in breast cancer cells,* Molecular Cancer 14: 130, DOI: 10.1186/s12943-015-0403-4.
4. Annunziata F., Pinna C., Dallavalle S., Tamborini L., Pinto A., 2020, *An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities.* Int. J. Mol. Sci. 21(13): 4618, DOI: 10.3390/ijms21134618.
5. Armento A., Ehlers J., Schotterl S., Naumann U., 2017, Molecular mechanisms of glioma cell motility. W: De Vleeschouwer S. (red.), *Glioblastoma*, Codon Publications 53: 89 – 96.
6. Avni D., Glucksam Y., Zor T., 2012, *The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 modulates cytokine expression in macrophages via p50 nuclear factor κ B inhibition, in a PI3K-independent mechanism.* Biochem Pharmacol. 83(1): 106 – 114.
7. Baccarini M., 2002, *An old kinase on a new path: Raf and apoptosis.* Cell Death Differ. 9(8): 783 – 785.
8. Balloni H., 2019, *Role of Radiotherapy in High Grade Glioma*, W: Da Silva Junior EB. i Buzetti Milano J. (red.), IntechOpen, Primary Intracranial Tumors, DOI: 10.5772/intechopen.80923.
9. Bądziul D., Jakubowicz-Gil J., Paduch R., Głowniak K., Gawron A., 2014, *Combined treatment with quercetin and imperatorin as a potent strategy for killing HeLa and Hep-2 cells,* Mol Cell Biochem. 392(1-2): 213 – 227.
10. Bendas G., Borsig L., 2012, *Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins,* Int J Cell Biol. 2012: 676731, DOI: 10.1155/2012/676731.
11. Bielawska K., Malinowska M., Cyuńczyk M., 2014, *Wpływ kumaryn na organizm człowieka,* Bromat. Chem. Toksykol. 47: 213 – 221.

12. Bigos E., Spych M., Masłowski M., Gottwald L., Fijuth J., 2014, *Glejak wielopostaciowy mózgu – problem coraz bardziej aktualny*. *Medycyna Paliatywna* 6(1): 7 – 13.
13. Bradford MM., 1976, *A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*. 72: 248 – 254.
14. 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.
15. Budzyńska B., Boguszewska-Czubara A., Kruk-Słomka M., Skalicka-Woźniak K., Michalak A., Musik I., Biała G., Głowniak K., 2013, *Effects of imperatorin on nicotine-induced anxiety- and memory-related responses and oxidative stress in mice*. *Physiol Behav*. 122: 46 – 55.
16. Caccese M., Padovan M., D'Avella D., Chioffi F., Gardiman MP., Berti F., Busato F., Bellu L., Bergo E., Zoccarato M., Fassan .M, Zagonel V., Lombardi G., 2020, *Anaplastic Astrocytoma: State of the art and future directions*. *Crit Rev Oncol Hematol*. 153: 103062, DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.103062.
17. Cantley LC., Neel BG., 1999, *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(8): 4240 – 4245.
18. 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*. *Mol Med Rep*. 5(2): 575 – 579.
19. Cheng GZ., Zhang W., Wang LH., 2008, *Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by Twist: AKT2 comes to interplay*. *Cancer Res*. 68: 957 – 960.
20. Choochuay K., Chunhacha P., Pongrakhananon V., Luechapudiporn R., Chanvorachote P., 2013, *Imperatorin sensitizes anoikis and inhibits anchorage-independent growth of lung cancer cells*. *J Nat Med*. 67(3): 599 – 606.
21. Chou SY., Hsu CS., Wang KT., Wang MC., Wang CC., 2007, *Antitumor effects of Osthol from *Cnidium monnieri*: an in vitro and in vivo study*. *Phytother Res*. 21(3): 226 – 230.
22. Chou TC., 2010, *Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method*. *Cancer Res*. 70(2): 440 – 446.

23. Chougule M., 2020, *Diffuse Astrocytic and Oligodendroglial Tumors*. W: Chougule M. (red.) Springer, *Neuropathology of Brain Tumors with Radiologic Correlates* 15 – 72.
24. Cohen AL., Holmen SL., Colman H., 2013, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13(5): 345, DOI: 10.1007/s11910-013-0345-4.
25. Dai X., Yin C., Zhang Y., Guo G., Zhao C., Wang O., Xiang Y., Zhang X., Liang G., 2018, *Osthole inhibits triple negative breast cancer cells by suppressing STAT3*. *J Exp Clin Cancer Res.* 37(1): 322, DOI: 10.1186/s13046-018-0992-z.
26. Darkes MJM., Plosker GL., Jarvis B., 2002, *Temozolomide: A Review of its Use in the Treatment of Malignant Gliomas, Malignant Melanoma and Other Advanced Cancers*. *American Journal of Cancer.* 1: 55 – 80.
27. Dattachoudhury S., Sharma R., Kumar A., Jaganathan BG., 2020, *Sorafenib Inhibits Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cells*. *Oncology.* 98(7): 478 – 486.
28. Davis ME., 2016, *Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment*. *Clin J Oncol Nurs.* 20(5 Suppl):S2 – S8, DOI:10.1188/16.CJON.S1.2-8.
29. Degirmenci U., Wang M., Hu J., 2020, *Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy*. *Cells.* 9(1): 198, DOI: 10.3390/cells9010198.
30. Devji T., Reddy C., Woo C., Awale S., Kadota S., Carrico-Moniz D., 2011, *Pancreatic anticancer activity of a novel geranylgeranylated coumarin derivative*. *Bioorg Med Chem Lett.* 21(19): 5770 – 5773.
31. Dębska S., Potemski P., 2010, *Leczenie hormonalne chorych na raka piersi z nadekspresją receptora HER2*, *Onkol. Prak. Klin.* 6: 301 – 310.
32. Dong W., Tang X., Zhao G., Jiang Q., Liao Z., Liang X., 2019, *Effects of coumarins from *Angelica dahurica* on chemotherapeutic sensitivity of human breast cancer cells*. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 24(2): 140 – 146.
33. Eken A., Arslan AKK., Öztürk E., Ökçesiz A., Yerer MB., 2017, *Cytotoxic Effects of Coumarin Compounds Imperatorin and Osthole, Alone and in Combination with 5-Fluorouracil in Colon Carcinoma Cells*. *Proceedings* 1: 1003, DOI: 10.3390/proceedings1101003.
34. Elmore S., 2007, *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495 – 516.

35. Fang D., Zhu L., Yang Z., Hua X., 2010, *Isolation and identification of bergapten in dry root of Glehnia littoralis and preliminary determination of its antitumor activity in vitro*, Journal of Plant Resources and Environment 19: 95 – 96.
36. Fijuth J., Dziadziuszek R., Biernat W., Bobek-Billewicz B., Bonicki W., Jarzab M., Krzakowski M., Nawrocki S., Trojanowski T., 2013, *Nowotwory osrodkowego ukkladu nerwowego*. W: Krzakowski M. i Warzocha K. (red.), Via Medica, Zalecenia postepowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach zlosliwych 33 – 68.
37. Gan HK., Cvrljevic AN., Johns TG., 2013, *The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered*. FEBS J. 280(21): 5350 – 5370.
38. Gao KL., Li M., Zhang KP., 2021, *Imperatorin inhibits the invasion and migration of breast cancer cells by regulating HMGB2*. J Biol Regul Homeost Agents. 35(1): 227 – 230.
39. Garcia-Aranda M., Perez-Ruiz E., Redondo M., 2018, *Bcl-2 Inhibition to Overcome Resistance to Chemo- and Immunotherapy*. Int J Mol Sci. 19(12): 3950, DOI: 10.3390/ijms19123950.
40. Gawron A., Glowniak K., 1987, *Cytostatic activity of coumarins in vitro*. Planta Med. 53(6): 526 – 529.
41. Gharbi SI., Zvelebil MJ., Shuttleworth SJ., Hancox T., Saghir N., Timms JF., Waterfield MD., 2007, *Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002*. Biochem J. 404(1): 15 – 21.
42. Grimm SA., Chamberlain MC., 2016, *Anaplastic astrocytoma*. CNS Oncol. 5(3): 145 – 157.
43. Guntuku L., Naidu VG., Yerra VG., 2016, *Mitochondrial dysfunction in gliomas: Pharmacotherapeutic potential of natural compounds*. Curr Neuropharmacol. 14(6): 567 – 583.
44. Haas B., Klinger V., Kexsel C., Bonigut V., Kiefer D., Caspers J., Walther J., Wos-Maganga M., Weickhardt S., Rohn G., Timmer M., Frötschl R., Eckstein N., 2018, *Inhibition of the PI3K but not the MEK/ERK pathway sensitizes human glioma cells to alkylating drugs*. Cancer Cell Int. 18: 69, DOI: 10.1186/s12935-018-0565-4.
45. Hassler MR., Ackerl M., Flechl B., Sax C., Wöhrer A., Widhalm G., Dieckmann K., Hainfellner J., Preusser M., Marosi C., 2014, *Sorafenib for patients with pretreated recurrent or progressive high-grade glioma: a retrospective, single-institution study*. Anticancer Drugs. 25(6): 723 – 728.

46. Houillier C., Wang X., Kaloshi G., Mokhtari K., Guillevin R., Laffaire J., Paris S., Boisselier B., Idbaih A., Laigle-Donadey F., Hoang-Xuan K., Sanson M., Delattre JY., 2010, *IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas*. *Neurology*. 75(17): 1560 – 1566.
47. Hu J., Xu Ch., Cheng B., Jin L., Li J., Gong Y., Lin W., Pan Z., Pan Ch., 2016, *Imperatorin acts as a cisplatin sensitizer via downregulating Mcl-1 expression in HCC chemotherapy*, *Tumour Biol*. 37(1): 331 – 339.
48. Huang L., Zhao X., He Z., Guo L., 2019, *Osthole represses growth of multiple myeloma cells by regulating PI3K/AKT and ERK pathways*. *Trop. J. Pharm. Res.* 18(11): 2287 – 2292.
49. Hung CM., Kuo DH., Chou CH., Su YC., Ho CT., Way TD., 2011, *Osthole suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-mesenchymal transition via repression of the c-Met/Akt/mTOR pathway in human breast cancer cells*. *J Agric Food Chem*. 59(17): 9683 – 9690.
50. Hung W., Suh J., Wang Y., 2017, *Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit*, *Journal of food and drug analysis* 25(1): 71 – 83.
51. Jain PK., Joshi H., 2012, *Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile*, *J. Appl. Pharm. Sci.* 02 (06): 236 – 240.
52. Jakubowicz-Gil J., 2009, *Inhibitory szlaku PI3K-Akt/ PKB-mTOR w leczeniu glejaków*, *Postępy Biologii Komórki* 2: 189 – 201.
53. 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*. *Neurotox Res*. 26(1): 64 – 77.
54. Jakubowicz-Gil J., Langner E., Bądziul D., Wertel I., Rzeski W., 2013, *Quercetin and sorafenib as a novel and effective couple in programmed cell death induction in human gliomas*. *Neurotox Res*. 26(1): 64 – 77.
55. 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*. *Tumour Biol*. 34(4): 2367 – 2378.
56. Jakubowicz-Gil J., Langner E., Rzeski W., 2011, *Kinetic studies of the effects of Temodal and quercetin on astrocytoma cells*. *Pharmacol Rep*. 63(2): 403 – 416.

57. 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 Histochem Cytobiol.* 50(3): 381 – 391.
58. Jan R., Chaudhry GE., 2019, *Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics*. *Adv Pharm Bull.* 9(2): 205 – 218.
59. Jarzab A., Grabarska A., Kielbus M., Jeleniewicz W., Dmoszyńska-Graniczka M., Skalicka-Woźniak K., Sieniawska E., Polberg K., Stepulak A., 2014, *Osthole induces apoptosis, suppresses cell-cycle progression and proliferation of cancer cells*. *Anticancer Res.* 34(11): 6473 – 6480.
60. Jarzab A., Grabarska A., Skalicka-Woźniak K., Stepulak A., 2017, *Farmakologiczne właściwości ostolu*. *Postepy Hig Med Dośw.* 71(0): 411 – 421.
61. Jeuken J., van den Broecke C., Gijzen S., Boots-Sprenger S., Wesseling P., 2007, *RAS/RAF pathway activation in gliomas: the result of copy number gains rather than activating mutations*. *Acta Neuropathol.* 114(2): 121 – 133.
62. Jiang G., Liu J., Ren B., Tang Y., Owusu L., Li M., Zhang J., Liu L., Li W., 2016, *Anti-tumor effects of osthole on ovarian cancer cells in vitro*. *J Ethnopharmacol.* 4 (193): 368 – 376.
63. 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*. *J Exp Clin Cancer Res.* 29(1): 34, DOI: 10.1186/1756-9966-29-34.
64. Jiménez-Orozco FA., López-González JS., Nieto-Rodríguez A., Velasco-Velázquez MA., Molina-Guarneros JA., Mendoza-Patiño N., García-Mondragón MJ., Elizalde-Galvan P., León-Cedeño F., Mandoki JJ., 2001, *Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin*. *Lung Cancer.* 34(2): 185 – 194.
65. Jin S., White E., 2008, *Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress*. *Autophagy* 4: 563 – 566.
66. Jo Y., Kim EH., Sai S., Kim JS., Cho JM., Kim H., Baek JH., Kim JY., Hwang SG., Yoon M., 2018, *Functional Biological Activity of Sorafenib as a Tumor-Treating Field Sensitizer for Glioblastoma Therapy*. *Int J Mol Sci.* 19(11): 3684, DOI: 10.3390/ijms19113684.
67. Jun M., Bacay AF., Moyer J., Webb A., Carrico-Moniz D., 2014, *Synthesis and biological evaluation of isoprenylated coumarins as potential anti-pancreatic cancer agents*. *Bioorg Med Chem Lett.* 24(19): 4654 – 4658.

68. Kale J., Osterlund EJ., Andrews DW., 2018, BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 25(1): 65 – 80.
69. Kang J., Lee S., Yim D., 2005, *Effect of Isoimperatorin on the Proliferation of Prostate Cancer Cell Line DU145 Cells*, *Biomolecules & Therapeutics* 13: 185 – 189.
70. Kang J., Pervaiz S., 2013, *Crosstalk between Bcl-2 family and Ras family small GTPases: potential cell fate regulation?* *Front Oncol.* 2: 206, DOI: 10.3389/fonc.2012.00206.
71. Kao SJ., Su JL., Chen CK., Yu MC., Bai KJ., Chang JH., Bien MY., Yang SF., Chien MH., 2012, *Osthole inhibits the invasive ability of human lung adenocarcinoma cells via suppression of NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression.* *Toxicol Appl Pharmacol.* 261(1): 105 – 115.
72. Karczarek-Borowska B., Zmorzyński Sz., Filip A., 2008, *Biologiczna rola surwiwiny.* *Współcz Onkol.* 12:437 – 440.
73. Kawaii S., Tomono Y., Ogawa K., Sugiura M., Yano M., Yoshizawa Y., Ito C., Furukawa H., 2001, *Antiproliferative effect of isopentenylated coumarins on several cancer cell lines*, *Anticancer Res.* 21 (3B): 1905 – 1911.
74. Kaza N., Kohli L., Roth KA., 2012, *Autophagy in brain tumors: a new target for therapeutic intervention.* *Brain Pathol.* 22 (1): 89 – 98.
75. Kiełbus M., Skalicka-Woźniak K., Grabarska A., Jeleniewicz W., Dmoszyńska-Graniczka M., Marston A., Polberg K., Gawda P., Klatka J., Stępulak A., 2013, *7-substituted coumarins inhibit proliferation and migration of laryngeal cancer cells in vitro.* *Anticancer Res.* 33(10): 4347 – 4356.
76. Kosidło K., Żurek A., Zarosa K., 2015, *Furanocoumarins – properties and biological activity*, *Nauki przyrodnicze* 3: 3 – 11.
77. Kozioł E., Skalicka-Woźniak K., 2016, *Imperatorin-pharmacological meaning and analytical clues: profound investigation.* *Phytochem Rev.* 15: 627 – 649.
78. Krześlak A., 2010, *Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów*, *Postępy HigMed Dosw.* 64: 490 – 503.
79. Kundu M., Chatterjee S., Ghosh N., Manna P., Das J., Sil PC., 2020, *Tumor targeted delivery of umbelliferone via a smart mesoporous silica nanoparticles controlled-release drug delivery system for increased anticancer efficiency.* *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 116: 111239, DOI: 10.1016/j.msec.2020.111239.

80. Küpeli Akkol E., Genç Y., Karpuz B., Sobarzo-Sánchez E., Capasso, R., 2020, *Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer*. *Cancers* 12(7): 1959, DOI:10.3390/cancers12071959.
81. Lacouture ME., Wu S., Robert C., Atkins MB., Kong HH., Guitart J., Garbe C., Hauschild A., Puzanov I., Alexandrescu DT., Anderson RT., Wood L., Dutcher JP., 2008, *Evolving strategies for the management of hand-foot skin reaction associated with the multitargeted kinase inhibitors sorafenib and sunitinib*. *Oncologist*. 13(9): 1001 – 1011.
82. Laemmli UK., 1970, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227, 680 – 685.
83. Langhans J., Schneele L., Trenkler N., von Bandemer H., Nonnenmacher L., Karpel-Massler G., Siegelin MD., Zhou S., Halatsch ME., Debatin KM., Westhoff MA., 2017, *The effects of PI3K-mediated signalling on glioblastoma cell behaviour*. *Oncogenesis*. 6(11): 398, DOI:10.1038/s41389-017-0004-8.
84. Lee YM., Wu TH., Chen SF., Chung JG., 2003, *Effect of 5-methoxypsoralen (5-MOP) on cell apoptosis and cell cycle in human hepatocellular carcinoma cell line*, *Toxicol In Vitro* 17(3): 279 – 287.
85. Lim J., Murthy A., 2020, *Targeting Autophagy to Treat Cancer: Challenges and Opportunities*. *Front Pharmacol*. 11: 590344, DOI: 10.3389/fphar.2020.590344.
86. Lisiak N., Totoń E., Rybczyńska M., 2014, *Autofagia, nowe perspektywy w terapii przeciwnowotworowej*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 68: 925 – 935.
87. Liu P., Xu B., Li J., Lu H., 2008, *LY294002 inhibits leukemia cell invasion and migration through early growth response gene 1 induction independent of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*. 377(1): 187 – 190.
88. Louis DN., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee WK., Ohgaki H., Wiestler OD., Kleihues P., Ellison DW., 2016, *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathol*. 131(6): 803 – 820.
89. Ludwig K., Kornblum HI, 2017, *Molecular markers in glioma*. *J. Neurooncol*. 134: 505 – 512.
90. Luo KW., Sun JG., Chan JY., Yang L., Wu SH., Fung KP., Liu FY., 2011, *Anticancer effects of imperatorin isolated from Angelica dahurica: induction of apoptosis in HepG2*

- cells through both death-receptor- and mitochondria-mediated pathways. Chemotherapy* 57(6): 449 – 459.
91. Maciejczyk A., Kapral-Piotrowska J., Sumorek-Wiadro J., Zając A., Grela E., Luchowski R., Gruszecki W., Lemieszek M., Wertel I., Pecio Ł., Żuchowski J., Skalicka-Woźniak K., Pawlikowska-Pawłęga B., Hułas-Stasiak M., Rzeski W., Rola R., Jakubowicz-Gil J., 2021, *Lentoside A β as an Adjuvant to the Anti-Glioma Potential of Sorafenib*. *Cancers* 13(11): 2637, DOI: 10.3390/cancers13112637.
 92. Maejima Y., Isobe M., Sadoshima J., 2016, *Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart*. *J Mol Cell Cardiol.* 95:19 – 25.
 93. Malinowska M., Bielawska K., 2013, *Metabolizm i właściwości antyoksydacyjne kumaryn*, 2013, *Bromat. Chem. Toksykol.* 46(3): 393 – 403.
 94. Marquez RT., Xu L., 2012, *Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch*. *Am J Cancer Res.*2(2): 214 – 221.
 95. Mishra AP., Salehi B., Sharifi-Rad M., Pezzani R., Kobarfard F., Sharifi-Rad J., Nigam M., 2018, *Programmed cell death, from a cancer perspective: An overview*. *Mol Diagn Ther.* 22(3): 281 – 295.
 96. Mo M., Chen MJ., Huang Y., Jiang W., Qin QH., Liang ZJ., Yang WP., Wei CY., 2020, *Esculin inhibits proliferation of triple negative breast cancer cells by down-regulating FBI-1*. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 23; 42(8): 629 – 634.
 97. Mokdad-Bzeouich I., Kovacic H., Ghedira K., Chebil L., Ghoul M., Chekir-Ghedira L., Luis J., 2016, *Esculin and its oligomer fractions inhibit adhesion and migration of U87 glioblastoma cells and in vitro angiogenesis*. *Tumour Biol.* 37(3): 3657 – 3664.
 98. Molinaro AM., Taylor JW., Wiencke JK., Wrensch MR., 2019, *Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma*. *Nat Rev Neurol.* 15(7): 405 – 417, DOI: 10.1038/s41582-019-0220-2.
 99. Mukhopadhyay S., Panda PK., Sinha N., Das DN., Bhutia SK., 2014, *Autophagy and apoptosis: where do they meet?* *Apoptosis.*19(4): 555 – 566.
 100. Muthu R., Selvaraj N., Vaiyuri M., 2016, *Anti-inflammatory and proapoptotic effects of umbelliferone in colon carcinogenesis*. *Hum Exp Toxicol.* 35(10): 1041 – 1054.
 101. Nakada M., Kita D., Watanabe T., Hayashi Y., Teng L., Pyko IV., Hamada J., 2011, *Aberrant signaling pathways in glioma*. *Cancers (Basel).* 3(3): 3242 – 3278.
 102. Ohgaki H., Kleihues P., 2013, *The definition of primary and secondary glioblastoma*. *Clin Cancer Res.* 19(4): 764 – 772.

103. Okuyama T., Takata M., Nishino H., Nishino A., Takayasu J., Lwashima A., 1990, *Studies on the antitumor-promoting activity of naturally occurring substances. II. Inhibition of tumor-promoter-enhanced phospholipid metabolism by umbelliferous materials*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 38: 1084 – 1086.
104. Paduch R., Klatka M., Klatka J., 2015, *Rodzaje śmierci komórkowej*, Pomeranian J Life Sci. 61(4): 411 – 418.
105. Panno M., Giordano F, 2014, *Effects of psoralens as anti-tumoral agents in breast cancer cells*, World J Clin Oncol 5(3): 348 – 358.
106. Parzych KR., Klionsky DJ., 2014, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxid Redox Signal. 20(3): 460 – 473.
107. Pfeffer CM., Singh ATK., 2018, *Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy*. Int J Mol Sci. 19(2): 448, DOI:10.3390/ijms19020448.
108. Pirtoli L., Cevenini G., Tini P., Vannini M., Oliveri G., Marsili S., Mourmouras V., Rubino G., Miracco C., 2009, *The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas*. Autophagy 5 (7): 930 – 936.
109. Polewska J., 2012, *Autofagia – mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory*, Postępy Hig Med Dosw 66 : 921 – 936.
110. Potemski P., 2010, *Molekularne uwarunkowania leczenia glejaków*, Onkologia w Praktyce Klinicznej 2: 73 – 78.
111. Rahman A., Siddiqui SA., Jakhar R., Kang SC., 2015, *Growth inhibition of various human cancer cell lines by imperatorin and limonin from poncirus trifoliata rafin. Seeds*. Anticancer Agents Med Chem 15(2): 236 – 241.
112. Reed JC., 2000, *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol. 157(5): 1415 – 1430.
113. Ruiz-Moreno AJ., Dömling A., Velasco-Velázquez MA., 2021, *Reverse Docking for the Identification of Molecular Targets of Anticancer Compounds*. W: Robles-Flores M. (red.), Cancer Cell Signaling. Methods in Molecular Biology 2174: 31 – 43.
114. Saxton RA., Sabatini DM., 2017, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell. 168(6): 960 – 976.
115. Schwartzbaum JA., Fisher JL., Aldape KD., Wrensch M., 2006, *Epidemiology and molecular pathology of glioma*. Nat Clin Pract Neurol. 2(9): 494 – 503.
116. Shokoohinia Y., Hosseinzadeh L., Alipour M., Mostafaie A., Mohammadi-Motlagh HR., 2014, *Comparative evaluation of cytotoxic and apoptogenic effects of several*

- coumarins on human cancer cell lines: Osthole induces apoptosis in p53-deficient H1299 cells.* Adv Pharmacol Sci. 2014:847574, DOI: 10.1155/2014/847574.
117. Shukla S., Maclennan GT., Hartman DJ., Fu P., Resnick MI., Gupta S., 2007, *Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion.* Int J Cancer. 121(7): 1424 – 1432.
 118. Siegelin MD., Raskett CM., Gilbert CA., Ross AH., Altieri DC., 2010, *Sorafenib exerts anti-glioma activity in vitro and in vivo.* Neurosci Lett. 478(3): 165 – 170.
 119. Sigurdsson S., Ögmundsdóttir H., Gudbjarnason S., 2004, *Antiproliferative Effect of Angelica archangelica Fruits,* Z. Naturforsch. 59: 523 – 527.
 120. Skalicka-Woźniak K., Mendel M., Chłopecka M., Dziekan N., 2015, *Isolation and evaluation of the myorelaxant effect of bergapten on isolated rat jejunum.* Pharm Biol. 54(1): 48 – 54.
 121. Skalicka-Woźniak K., Zagaja M., Głowniak K., Łuszczki JJ., 2014, *Purification and anticonvulsant activity of xanthotoxin (8- methoxypsoralen).* Centr Eur J Biol 9: 431 – 436.
 122. Steelman LS., Chappell WH., Abrams SL., Kempf RC., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazzarino MC., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Bäsecke J., Cocco L., Evangelisti C., Martelli AM., Montalto G., Cervello M., McCubrey JA., 2011, *Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging.* Aging 3: 192 – 222.
 123. Stefanova TH., Nikolova NJ., Toshkova RA., Neychev HO., 2007, *Antitumor and immunomodulatory effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin against Sarcoma 180 in mice.* J Exp Ther Oncol. 6(2): 107 – 115.
 124. Stupp R., Reni M., Gatta G., Mazza E., Vecht C., 2007, *Anaplastic astrocytoma in adults.* Crit Rev Oncol Hematol. 63(1): 72 – 80.
 125. Szala S., Jarosz M., Smolarczyk R., Cichoń T., 2012, *„Błędne koła” glejaków: unaczynienie i inwazyjność,* Post. Hig. 66:888 – 900.
 126. Taal W., Bromberg JE., van den Bent MJ., 2015, *Chemotherapy in glioma.* CNS Oncol. 4(3): 179 – 192.
 127. Thomé MP., Filippi-Chiela EC., Villodre ES., Migliavaca CB., Onzi GR., Felipe KB., 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.

128. Tong K., Xin C., Chen W., 2017, *Isoimperatorin induces apoptosis of the SGC-7901 human gastric cancer cell line via the mitochondria-mediated pathway*. *Oncol Lett.* 13(1): 518 – 524.
129. Velasco-Velázquez MA., Agramonte-Hevia J., Barrera D., Jiménez-Orozco A., García-Mondragón MJ., Mendoza-Patiño N., Landa A., Mandoki J., 2003, *4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility*. *Cancer Lett.* 198(2): 179 – 186.
130. Velasco-Velázquez MA., Salinas-Jazmín N., Mendoza-Patiño N., Mandoki JJ., 2008, *Reduced paxillin expression contributes to the antimetastatic effect of 4-hydroxycoumarin on B16-F10 melanoma cells*. *Cancer Cell Int.* 20: 8, DOI: 10.1186/1475-2867-8-8.
131. Vijayalakshmi A., Sindhu G., 2017, *Umbelliferone arrest cell cycle at G0/G1 phase and induces apoptosis in human oral carcinoma (KB) cells possibly via oxidative DNA damage*. *Biomed Pharmacother.* 92: 661 – 671.
132. Vogt PK., Hart JR., Gymnopoulos M., Jiang H., Kang S., Bader AG., Zhao L., Denley A., 2010, *Phosphatidylinositol 3-kinase: the oncoprotein*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 347: 79 – 104.
133. Wang H., Xu T., Jiang Y., Xu H., Yan Y., Fu D., Chen J., 2015, *The challenges and the promise of molecular targeted therapy in malignant gliomas*. *Neoplasia* 17(3): 239 – 255.
134. Wang L., Peng Y., Shi K., Wang H., Lu J., Li Y., Ma C., 2015, *Osthole inhibits proliferation of human breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis*. *J Biomed Res.* 29(2): 132 – 138.
135. Wang X., Huang S., Xin X., Ren Y., Weng G., Wang P., 2019, *The antitumor activity of umbelliferone in human renal cell carcinoma via regulation of the p110 γ catalytic subunit of PI3K γ* . *Acta Pharm.* 69(1): 111 – 119.
136. Weller M., Wick W., Aldape K., Brada M., Berger M., Pfister SM., Nishikawa R., Rosenthal M., Wen PY., Stupp R., Reifenberger G., 2015, *Glioma*. *Nat Rev Dis Primers.* 16(1):15017, DOI: 10.1038/nrdp.2015.17.
137. Widelski J., Kukula-Koch W., Baj T., Kedzierski B., Fokialakis N., Magiatis P., Pozarowski P., Rolinski J., Graikou K., Chinou I, Skalicka-Wozniak K., 2017, *Rare*

- Coumarins Induce Apoptosis, G1 Cell Block and Reduce RNA Content in HL60 Cells*, Open Chem. 15: 1 – 6.
138. Wilhelm SM., Adnane L., Newell P., Villanueva A., Llovet JM., Lynch M., 2008, *Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling*. Mol Cancer Ther. 7(10): 3129 – 3140.
139. Wirawan E., Vande Walle L., Kersse K., Cornelis S., Claerhout S., Vanoverberghe I., Roelandt R., De Rycke R., Verspurten J., Declercq W., Agostinis P., Vanden Berghe T., Lippens S., Vandenabeele P., 2010, *Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria*. Cell Death Dis 1 (e18), DOI: 10.1038/cddis.2009.16.
140. Xu X., Liu X., Zhang Y., 2018, *Osthole inhibits gastric cancer cell proliferation through regulation of PI3K/AKT*. PLoS One. 13(3): e0193449, DOI:10.1371/journal.pone.0193449.
141. Xu X., Zhang Y., Qu D., Jiang T., Li S., 2011, *Osthole induces G2/M arrest and apoptosis in lung cancer A549 cells by modulating PI3K/Akt pathway*. J Exp Clin Cancer Res. 30(1): 33, DOI: 10.1186/1756-9966-30-33.
142. Xu XM., Zhang Y., Qu D., Feng XW., Chen Y., Zhao L., 2012, *Osthole suppresses migration and invasion of A549 human lung cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in vitro*. Mol Med Rep. 6(5): 1018 – 1022.
143. Yang D., Gu T., Wang T., Tang Q., Ma C., 2010, *Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 74(7): 1430 – 1434.
144. Yang H., Xiong J., Luo W., Yang J., Xi T., 2015, *8-Methoxypsoralen Induces Intrinsic Apoptosis in HepG2 Cells: Involvement of Reactive Oxygen Species Generation and ERK1/2 Pathway Inhibition*, Cell Physiol Biochem 37: 361 – 374.
145. Yang X., Xu B., Ran F., Wang R., Wu J., Cui J., 2006, *Inhibitory effects of 40 coumarins compounds against growth of human nasopharyngeal carcinoma cell line KB and human leukemia cell line HL-60 in vitro*. Modern Chinese Medicine 8(10): 8 – 13.
146. Yang XW., Xu B., Ran FX., Wang RQ., Wu J., Cui JR., 2007, *Inhibitory effects of 11 coumarin compounds against growth of human bladder carcinoma cell line E-J in vitro*. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao 5(1): 56 – 60.
147. Yang Z., Klionsky DJ., 2009, *An overview of the molecular mechanism of autophagy*. Curr Top Microbiol Immunol. 335: 1 – 32.

148. Yu SM., Hu DH., Zhang JJ., 2015, *Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells*. Mol Med Rep. 12(3): 3869 – 3873.
149. Zając A., Sumorek-Wiadro J., Langner E., Wertel I., Maciejczyk A., Pawlikowska-Pawłęga B., Pawelec J., Wasiak M., Hułas-Stasiak M., Bądziul D., Rzeski W., Reichert M., Jakubowicz-Gil J., 2021, *Involvement of PI3K Pathway in Glioma Cell Resistance to Temozolomide Treatment*. International Journal of Molecular Sciences. 22(10): 5155, DOI: 10.3390/ijms22105155.
150. Zając A., Sumorek-Wiadro J., Maciejczyk A., Langner E., Wertel I., Rzeski W., Jakubowicz-Gil J., 2021, *LY294002 and sorafenib as inhibitors of intracellular survival pathways in the elimination of human glioma cells by programmed cell death*. Cell Tissue Res. 2021, DOI: 10.1007/s00441-021-03481-0.
151. Zhang L., Jiang G., Yao F., He Y., Liang G., Zhang Y., Hu B., Wu Y., Li Y., Liu H., 2012, *Growth inhibition and apoptosis induced by osthole, a natural coumarin, in hepatocellular carcinoma*. PLoS One.7(5): e37865, DOI: 10.1371/journal.pone.0037865.
152. Zhao DL., Zou LB., Lin S., Shi JG., Zhu HB., 2007, *Anti-apoptotic effect of esculin on dopamine-induced cytotoxicity in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line*. Neuropharmacology 53(6): 724 – 732.
153. Zhao S., Lin Y., Xu W., Jiang W., Zha Z., Wang P., Yu W., Li Z., Gong L., Peng Y., Ding J., Lei Q., Guan KL., Xiong Y., 2009, *Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha*. Science. 324(5924): 261 – 265.
154. Zhu X., Song X., Xie K., Zhang X., He W., Liu F., 2017, *Osthole induces apoptosis and suppresses proliferation via the PI3K/Akt pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma*. Int J Mol Med. 40(4): 1143 – 1151.
155. Zhu Y., Zhao L., Liu L., Gao P., Tian W., Wang X., Jin H., Xu H., Chen Q., 2010, *Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis*. Protein Cell. 1 (5): 468 – 477.
156. Zimmermann S., Moelling K., 1999, *Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)*. Science 286(5445): 1741 – 1744.

Strony internetowe:

http1: Anaplastic astrocytoma | Radiology Reference Article | Radiopaedia.org

http2: HSP Atlas - Histopathology Atlas (umk.pl)

http3: CNS Pathology (utah.edu)

http4: HSP Atlas - Histopathology Atlas (umk.pl)

IX. SPIS RYCIN

- Rycina 1.** Gwiaździatek anaplastyczny: A- obraz otrzymany techniką MRI T2 (ang. T2-weighted magnetic resonance imaging) [zmodyfikowane na podstawie Weller, 2015], B- przekrój poprzeczny mózgu z dużym, słabo zaznaczonym guzem w lewym obszarze czołowo-skroniowym bez rażącej martwicy i ognisk krwotocznych [http1], C- obraz histologiczny AA (10x) otrzymany przez barwienie hematoksyliną–eozyną [http2]. 18
- Rycina 2.** Glejak wielopostaciowy: A- obraz otrzymany techniką MRI T2 [zmodyfikowane na podstawie Weller, 2015], B- przekrój poprzeczny mózgu z widocznym guzem, w obrębie którego znajdują się obszary martwicy i ogniska krwotoczne [http3], C- obraz histologiczny GBM (10x) uzyskany przy pomocy barwienia hematoksyliną–eozyną z widocznym palisadowym układem komórek (zaznaczone strzałką) wokół ognisk nekrotycznych (ON) [http4]. 19
- Rycina 3.** Struktura kinazy RAF [opracowanie własne]; S/T – region bogaty w serynę i treoninę; CR1- region zawierający domenę wiążącą RAS; CR2 - region bogaty w serynę i treoninę; CR3 – region o właściwościach kinazy..... 20
- Rycina 4.** Uproszczony schemat transmisji sygnału za pomocą szlaku RAS-RAF-MEK-ERK w glejakach i jego regulatory [opracowanie własne]. Nadmierne pobudzenie szlaku związane jest z amplifikacją genów EGFR bądź PDGFR oraz obecnością mutacji EGFRvIII, prowadzącą do sygnalizacji niezależnej od obecności liganda. W odpowiedzi na sygnał z tych receptorów bądź poprzez kinazę c-src dochodzi do aktywacji białka RAS, które aktywuje kinazę serynowo-treoninową RAF. Ta z kolei fosforyluje kinazę MEK, odpowiedzialną za przyłączenie reszty fosforanowej w obrębie ERK. Aktywowane ERK przemieszcza się do jądra, aktywując czynniki transkrypcyjne zaangażowane w cykl komórkowy i hamowanie apoptozy. Kolorem niebieskim zaznaczono zwiększony, a czerwonym zmniejszony poziom białek w komórkach glejaków. 22
- Rycina 5.** Uproszczony schemat transmisji sygnału za pomocą szlaku PI3K-AKT/PKB-mTOR w glejakach i jego regulatory [opracowanie własne]. W odpowiedzi na sygnał z receptorów EGFR bądź PDGFR dochodzi do aktywacji kinazy PI3K, która fosforyluje serynowo-treoninową kinazę AKT. Proteina, poprzez interakcje z białkami zaangażowanymi w przebieg apoptozy, hamuje ten proces a także odpowiada za fosforylację mTOR. W konsekwencji dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za przeżycie. Negatywnym regulatorem PI3K jest fosfataza PTEN, której zmniejszony poziom obserwowany jest w glejakach. Kolorem niebieskim zaznaczono zwiększony, a czerwonym zmniejszony poziom białek w komórkach glejaków. 23
- Rycina 6.** Struktura AKT. W domenie katalitycznej i regulatorowej zaznaczono reszty treoniny i seryny, których fosforylacja jest konieczna do aktywacji izoform AKT: AKT1 – T308 i S473, AKT2 – T309, S474, AKT3 – T305 i S472 [opracowanie własne]. 24
- Rycina 7.** Schemat hydrolizy temozolomidu do formy aktywnej (kationu dimetylodiazoniowego) i tworzenie O⁶metylo-guaniny [opracowanie własne]..... 28
- Rycina 8.** Schemat działania sorafenibu [opracowanie własne na podstawie: Lacouture, 2008; Wilhelm, 2008]..... 30
- Rycina 9.** Schemat aktywności przeciwnowotworowej LY294002 [na podstawie Avni, 2012; Jiang, 2010]. 31

Rycina 10. Przebieg procesu apoptozy szlakiem zewnątrzpochodnym i wewnątrzpochodnym [opracowanie własne]. Szczegółowy opis w tekście rozprawy (Rozdział 2.1. Apoptoza).....	33
Rycina 11. Przebieg procesu makroautofagii [opracowanie własne]. Dokładny opis w tekście rozprawy (Rozdział 2.2. Autofagia).	37
Rycina 12. Regulacja procesu apoptozy i autofagii przez białko Bcl2 [na podstawie Maejima, 2016].....	38
Rycina 13. Budowa strukturalna cząsteczki kumaryny.	40
Rycina 14. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności 4-hydroksykumaryny [opracowanie własne].....	40
Rycina 15. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności umbeliferonu [opracowanie własne].	41
Rycina 16. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności eskuliny [opracowanie własne].	42
Rycina 17. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności ostolu [opracowanie własne].	44
Rycina 18. Furanokumaryny: typu psoralen (A) i angelicyna (B) oraz różnice w ich strukturze.	45
Rycina 19. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności bergaptenu [opracowanie własne].	46
Rycina 20. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności ksantotoksyny [opracowanie własne].	47
Rycina 21. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności imperatoryny [opracowanie własne].	48
Rycina 22. Molekularny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności izoimperatoryny [opracowanie własne].	49
Rycina 23. Schemat ilustrujący zastosowaną aplikację skojarzoną.....	56
Rycina 24. Schemat wykresów zależności wskaźnika kombinacji (A) i wskaźnika redukcji dawki (B) od współczynnika skuteczności oraz izobogramu (C), sporządzonych za pomocą programu CompuSyn.	65
Rycina 25. Wpływ 4-hydroksykumaryny (A), umbeliferonu (B), eskuliny (C) i ostolu (D) w stężeniach 50-200 μM na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego (MOGGCCM); K – kontrola; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.	68
Rycina 26. Wpływ 4-hydroksykumaryny (A), umbeliferonu (B), eskuliny (C) i ostolu (D) w stężeniach 50-200 μM na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach glejaka wielopostaciowego (T98G); K – kontrola; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta.	69
Rycina 27. Wpływ bergaptenu (A), ksantotoksyny (B), imperatoryny (C) i izoimperatoryny (D) w stężeniach 25-150 μM na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich	

komórkach gwiazdździaka anaplastycznego (MOGGCCM); K – kontrola; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 70

Rycina 28. Wpływ bergaptenu (A), ksantotoksyny (B), imperatoryny (C) i izoimperatoryny (D) w stężeniach 25-150 μ M na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach glejaka wielopostaciowego (T98G); K – kontrola; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 71

Rycina 29. Wpływ równoczesnej aplikacji kumaryn prostych z temozolomidem na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdździaka anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B) oraz w prawidłowych oligodendrocytach OLN-93 (C); K – kontrola, T – temozolomid (MOGGCCM – 100 μ M, T98G – 50 μ M), O – ostol (150 μ M), E – eskulina (200 μ M), U – umbeliferon (200 μ M), 4-OH – 4-hydroksykumaryna (200 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 73

Rycina 30. Wpływ równoczesnej aplikacji furanokumaryn z temozolomidem na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdździaka anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B) oraz w prawidłowych oligodendrocytach (C); K – kontrola, T – temozolomid (MOGGCCM – 100 μ M, T98G – 50 μ M), I – imperatoryna (50 μ M), B – bergapten (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), X – ksantotoksyna (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), IzoI – izoimperatoryna (25 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 75

Rycina 31. Wpływ ostolu i imperatoryny, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na mobilność ludzkich komórek gwiazdździaka anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); TR- test rysy, K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 77

Rycina 32. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji kaspazy 3 w ludzkich komórkach gwiazdździaka anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 79

Rycina 33. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na aktywność kaspazy 3 w ludzkich komórkach gwiazdździaka anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 80

Rycina 34. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji bekliny 1 w ludzkich komórkach gwiazdździaka anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K –

kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 81

Rycina 35. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji białka Bcl-2 w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 82

Rycina 36. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na tworzenie kompleksów Bcl-2:Beklina 1 w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna. 83

Rycina 37. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji kinazy RAF w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 85

Rycina 38. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na poziom ekspresji kinazy PI3K w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 86

Rycina 39. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na aktywność ERK w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 87

Rycina 40. Wpływ ostolu (A,B) i imperatoryny (C,D) w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na aktywność AKT/PKB w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A,C) i glejaka wielopostaciowego T98G (B,D); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 88

Rycina 41. Wpływ równoczesnej aplikacji kumaryn prostych z sorafenibem na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, S – sorafenib (1 μM), O – ostol (150 μM), E – eskulina (200 μM), U – umbeliferon (200 μM), 4-OH – 4-hydroksykumaryna (200 μM); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 90

Rycina 42. Wpływ równoczesnej aplikacji furanokumaryn z sorafenibem na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, S – sorafenib (1 μM), I – imperatoryna (50 μM), B – bergapten (MOGGCCM – 25 μM , T98G – 50 μM), X

– ksantotoksyna (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), IzoI – izoimperatoryna (25 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 92

Rycina 43. Wpływ równoczesnej aplikacji kumaryn prostych z LY294002 na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdziaka anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, LY – LY294002 (10 μ M), O – ostol (150 μ M), E – eskulina (200 μ M), U – umbeliferon (200 μ M), 4-OH – 4-hydroksykumaryna (200 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 94

Rycina 44. Wpływ równoczesnej aplikacji furanokumaryn z LY294002 na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdziaka anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, LY – LY294002 (10 μ M), I – imperatoryna (50 μ M), B – bergapten (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), X – ksantotoksyna (MOGGCCM – 25 μ M, T98G – 50 μ M), IzoI – izoimperatoryna (25 μ M); * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, # wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do temozolomidu, + wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do pojedynczej aplikacji pochodnej kumaryny; one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 96

Rycina 45. Wpływ ostolu i imperatoryny w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z LY294002 bądź sorafenibem na poziom kaspazy 3 (A) i bekliny 1 (B) w ludzkich komórkach gwiazdziaka anaplastycznego MOGGCCM; K – kontrola, LY – LY294002, S – sorafenib, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 98

Rycina 46. Wpływ ostolu i imperatoryny w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z LY294002 bądź sorafenibem na poziom kaspazy 3 (A) i bekliny 1 (B) w ludzkich komórkach glejaka wielopostaciowego T98G; K – kontrola, LY – LY294002, S – sorafenib, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 99

Rycina 47. Wpływ ostolu i imperatoryny, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na mobilność ludzkich komórek gwiazdziaka anaplastycznego MOGGCCM; TR – test rysy, K – kontrola, LY – LY294002, S – sorefenib, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 101

Rycina 48. Wpływ ostolu i imperatoryny, w aplikacji pojedynczej i skojarzonej z temozolomidem na mobilność ludzkich komórek glejaka wielopostaciowego T98G; TR – test rysy, K – kontrola, LY – LY294002, S – sorefenib, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 102

Rycina 49. Wpływ blokowania ekspresji PI3K w połączeniu z aplikacją ostolu, imperatoryny i temozolomidu na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich

komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 104

Rycina 50. Wpływ blokowania ekspresji RAF w połączeniu z aplikacją ostolu, imperatoryny i temozolomidu na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy w ludzkich komórkach gwiazdki anaplastycznego MOGGCCM (A) i glejaka wielopostaciowego T98G (B); K – kontrola, T – temozolomid, O – ostol, I – imperatoryna; * wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, one-way ANOVA, post-hoc: test Dunnetta. 105

Rycina 51. Wykres zależności wskaźnika kombinacji (CI) od współczynnika skuteczności zastosowanego leczenia skojarzonego (1 oznacza 100% komórek martwych) w linii MOGGCCM (A) i T98G (B); $CI < 1$, $CI = 1$ i $CI > 1$ wskazują odpowiednio na efekt synergistyczny, addytywny i antagonistyczny; O-ostol, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002. 119

Rycina 52. Wykres zależności wskaźnika redukcji dawki (DRI) od współczynnika skuteczności zastosowanego leczenia skojarzonego (1 oznacza 100% komórek martwych) w linii MOGGCCM (A) i T98G (B); $DRI > 1$ oznacza redukcję dawki; O-ostol, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002. 120

Rycina 53. Klasyczny izobologram przedstawiający interakcje ostolu z temozolomidem (A,D), sofefanibem (B,E) oraz LY294002 (C,F) przy 50%, 75% i 100% efekcie działania leków w linii MOGGCCM (A,B,C) oraz T98G (D,E,F); O-ostol, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002. 121

Rycina 54. Wykres zależności wskaźnika kombinacji (CI) od współczynnika skuteczności zastosowanego leczenia skojarzonego (1 oznacza 100% komórek martwych) w linii MOGGCCM (A) i T98G (B); $CI < 1$, $CI = 1$ i $CI > 1$ wskazują odpowiednio na efekt synergistyczny, addytywny i antagonistyczny; I-imperatoryna, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002. 123

Rycina 55. Wykres zależności wskaźnika redukcji dawki (DRI) od współczynnika skuteczności zastosowanego leczenia skojarzonego (1 oznacza 100% komórek martwych) w linii MOGGCCM (A) i T98G (B); $DRI > 1$ oznacza redukcję dawki; I-imperatoryna, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002. 124

Rycina 56. Klasyczny izobologram przedstawiający interakcje ostolu z temozolomidem (A,D), sofefanibem (B,E) oraz LY294002 (C,F) przy 50%, 75% i 100% efekcie działania leków w linii MOGGCCM (A,B,C) oraz T98G (D,E,F); I-imperatoryna, T-temozolomid, S-sorafenib, LY-LY294002. 125

X. SPIS TABEL

Tabela 1. Klasyfikacja nowotworów pochodzenia glejowego według WHO.....	17
Tabela 2. Stężenia związków użytych w badaniach.....	55
Tabela 3. Skład żelu separującego i zagęszczającego stosowanego do elektroforezy.	60

XI. ANEKS – ŻYCIORYS NAUKOWY

Imię i nazwisko: Joanna Sumorek - Wiadro
E-mail: joanna.sumorek-wiadro@mail.umcs.pl

WYKSZTAŁCENIE

- 10.2016 – obecnie** Uczestniczka studiów III stopnia na kierunku **biologia**
- 10.2014- 06.2016** **Magister biologii, spec. biologia ogólna i eksperymentalna**
Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie
Tytuł pracy dyplomowej: „*Wpływ inhibitorów kinaz PI3K oraz Raf na zwiększanie pro-apoptotycznej aktywności temozolomidu w ludzkich komórkach glejaka.*”
promotor – dr hab. J. Jakubowicz-Gil
- 10.2012 – 09.2015** **Inżynier fizyki technicznej, spec. fizyka medyczna**
Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie
Tytuł pracy dyplomowej: „*Zastosowanie spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego w badaniu oddziaływań białek transportujących z lipidami błonowymi.*”
promotor – prof. dr hab. W.I. Gruszecki
- 10.2011 – 06.2014** **Licencjat biologii, spec. nauczanie biologii i chemii,**
Uniwersytet Marii Curie - Skłodowskiej w Lublinie
Tytuł pracy dyplomowej: „*Innowacyjne metody leczenia niewydolności serca. Protezy serca.*”
promotor – dr M. Niedźwiedź

UDZIAŁ W GRANTACH I PROJEKTACH BADAWCZYCH

- 2021** Kierownik grantu zespołowego „*Wpływ budowy strukturalnej kumaryn na potencjał migracyjny ludzkich komórek glejaka*” przyznanego przez Komisję ds. Oceny Projektów Badawczych Młodych Naukowców
- 2020** Kierownik grantu indywidualnego „*Zastosowanie furanokumaryn w terapii skojarzonej z inhibitorami kinaz PI3K i Raf w eliminacji ludzkich komórek glejaka na drodze*”

	<i>zaprogramowanej śmierci</i> ” przyznanego przez Komisję ds. Oceny Projektów Badawczych Młodych Naukowców
2019	Członek grantu zespołowego dla młodych pracowników i doktorantów Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS z dotacji celowej MNiSW „ <i>Rola kompleksów białek Bcl 2 i Bclina 1 w indukcji zaprogramowanej śmierci komórkowej w ludzkich komórkach glejaków in vitro</i> ”
2018	Kierownik grantu indywidualnego dla młodych pracowników i doktorantów pt. „ <i>Wpływ budowy strukturalnej cząsteczek ostolu i imperatoryny na indukcję zaprogramowanej śmierci w ludzkich komórkach glejaka</i> ” przyznany przez Komisję ds. Badań Naukowych Młodych Pracowników Naukowych i Doktorantów

**WYKAZ PUBLIKACJI RECENZOWANYCH W CZASOPISMACH Z LISTY
JOURNAL CITATION REPORTS (JCR):**

1. Zając A, **Sumorek-Wiadro J**, Maciejczyk A, Langner E, Wertel I, Rzeski W, Jakubowicz-Gil J, 2021, *LY294002 and sorafenib as inhibitors of intracellular survival pathways in the elimination of human glioma cells by programmed cell death*, Cell and Tissue Research 386(1):17-28; DOI: 10.1007/s00441-021-03481-0 (IF = 5,249, Pkt MNiSW =70)
2. Zając A, **Sumorek-Wiadro J**, Langner E, Wertel I, Maciejczyk A, Pawlikowska-Pawłęga B, Pawelec J, Wasiak M, Hułas-Stasiak M, Bądziul D, Rzeski W, Reichert M, Jakubowicz-Gil J, 2021, *Involvement of PI3K Pathway in Glioma Cell Resistance to Temozolomide Treatment*, International Journal of Molecular Sciences 22(10): 5155; DOI: 10.3390/ijms22105155 (IF = 4,556, Pkt MNiSW=140)
3. Maciejczyk A, Kapral-Piotrowska J, **Sumorek-Wiadro J**, Zając A, Grela E, Luchowski R, Gruszecki W, Lemieszek M, Wertel I, Pecio Ł, Żuchowski J, Skalicka-Woźniak K, Pawlikowska-Pawłęga B, Hułas-Stasiak M, Rzeski W, Rola R, Jakubowicz-Gil J, 2021, *Lensoside A β as an Adjuvant to the Anti-Glioma Potential of Sorafenib*, Cancers 13(11): 2637; DOI: 10.3390/cancers13112637 (IF = 6,126, Pkt MNiSW =140)

4. **Sumorek-Wiadro J**, Zając A, Langner E, SkalickaWoźniak K, Maciejczyk A, Rzeski W, Jakubowicz-Gil J, 2020, *Antiglioma Potential of coumarins combined with sorafenib*, *Molecules* 25(21): 5192 (IF = 3,267, Pkt_{MNiSW}= 100)
5. **Sumorek-Wiadro J**, Zając A, Bądziul D, Langner E, Skalicka-Woźniak K, Maciejczyk A, Wertel I, Rzeski W, Jakubowicz-Gil J, 2020, *Coumarins modulate the anti-glioma properties of temozolomide*. *European Journal of Pharmacology* 881: 173207; DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173207 (IF=3,17, Pkt_{MNiSW}=100)
6. **Sumorek-Wiadro J**, Zając A, Maciejczyk A., Jakubowicz-Gil J, 2020, *Furanocoumarins in anticancer therapy - For and against*, *Fitoterapia* 142: 104492; DOI: 10.1016/j.fitote.2020.104492 (IF=2,431, Pkt_{MNiSW}=100)
7. Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Skalicka-Woźniak K, **Sumorek-Wiadro J**, Zając A, Gawron A, 2019, *Hsps responsible for apoptosis induction failure in cervical cancer cells upon osthole and tamoxifen treatment*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 73:563 – 571; DOI: 10.5604/01.3001.0013.5447 (IF=1,106, Pkt_{MNiSW}=40)

WYKAZ PUBLIKACJI Z LISTY B CZASOPISM NAUKOWYCH I MONOGRAFII

1. Maciejczyk A, Madoń M, Kulik J, **Sumorek-Wiadro J**, Zając A, 2021, *Rak jajnika –charakterystyka*, *Monografia naukowa Poszerzamy Horyzonty* 25:381-388
2. Domaciuk M, Śmigala M, **Sumorek-Wiadro J**, Polak P, Maciejczyk A, Stępniewska A, 2017, *Effect of Ca²⁺ ion blockers on another development, microsporogenesis and formation of pollen grains in Gasteria verrucosa (Mill.)*, *European Journal of Medical Technologies* 2/2017 (Pkt_{MNiSW}=5)
3. Domaciuk M, Śmigala M, Anusiewicz M, **Sumorek-Wiadro J**, Maciejczyk A, Stępniewska A, 2016, *Effect of plant-origin compounds on changes in the cytoplasmic skeleton in meristematic cells*, *European Journal of Medical Technologies* 3/2016 (Pkt_{MNiSW}=5)

WYKAZ KOMUNIKATÓW ZJAZDOWYCH

1. Maciejczyk A., Madoń M., Zając A, **Sumorek-Wiadro J**, Jakubowicz-Gil J. „*Autophagy – the mechanism of death or survival?*”. OMNIBUS CZ. V, 10-11.09.2020, Kraków
2. **Sumorek-Wiadro J**, Zając A, Maciejczyk A, Langner E, Rzeski W, Jakubowicz-Gil J. “*Bcl-2 and Beclin 1 as a molecular toggle switch between apoptosis and autophagy in human glioma cells*”. Młody Naukowiec część VIII – Nauki Interdyscyplinarne, 21.11.2019, Kraków
3. Maciejczyk A, Zając A, **Sumorek-Wiadro J**, Jakubowicz-Gil J, Madoń M. “*PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in glioma*”. Młody Naukowiec część VIII – Nauki Interdyscyplinarne, 21.11.2019, Kraków
4. **Sumorek-Wiadro J**, Jakubowicz-Gil J, Langner E, Rzeski W, Skalicka-Woźniak K. “*The effects of simple coumarins on programmed cell death induction in glioma cells*”. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa ‘Rośliny w naukach medycznych i przyrodniczych’, 24.05.2019, Lublin
5. **Sumorek-Wiadro J**, Zając A, Jakubowicz-Gil J, Langner E, Rzeski W, Skalicka-Woźniak K. “*The effects of osthole and imperatorin treatment to programmed cell death induction in glioma cells*”. 5th International Conference and Workshop ‘Plant – The Source of Research Material’; 21-23.06.2017, Lublin
6. **Sumorek-Wiadro J**, Zając A, Jakubowicz-Gil J, Langner E, Rzeski W. “*The influence of inhibitors of Raf and PI3K kinases on increasing the proapoptotic activity of quercetin in human glioma cells*”. 5th International Conference and Workshop ‘Plant – The Source of Research Material’; 21-23.06.2017, Lublin
7. Zając A, **Sumorek-Wiadro J**, Jakubowicz-Gil J. “*Human glioma cells sensitivity to programmed cell death induction after Temozolomide, Sorafenib and LY294002 treatment*”. 5th International Conference and Workshop ‘Plant – The Source of Research Material’; 21-23.06.2017, Lublin
8. Zając A, **Sumorek-Wiadro J**, Jakubowicz-Gil J. “*The effect of blocking the expression of PI3K and Raf kinases to apoptosis and autophagy induction in glioma*”

cells". 5th International Conference and Workshop 'Plant – The Source of Research Material'; 21-23.06.2017, Lublin

9. Zając A, **Sumorek-Wiadro J**, Jakubowicz-Gil J. „*Bcl-2 regulates apoptosis-autophagy cross-talk in human glioma cells upon combined Temozolomide, Sorafenib and LY294002 treatment*”. BioChemMed Session, 25-27.11.2016, Gdańsk

PRAKTYKI I STAŻE

08.2015-09.2015	Staż w Laboratorium Badawczym Pracowni Polskiego Sztucznego Serca w Fundacji Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religii w Zabrze.
09.2014-10.2014	Praktyka zawodowa w Zakładzie Radiochemii i Medycyny Nuklearnej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego Nr 4 w Lublinie.
09.2013-10.2013	Praktyki pedagogiczne z dydaktyki biologii i chemii w Gimnazjum przy Zespole Szkół im. H. Sienkiewicza w Końskowoli
09.2012-10.2012	Praktyki asystenckie w Gimnazjum przy Zespole Szkół im. H. Sienkiewicza w Końskowoli

DOŚWIADCZENIE ZAWODOWE

10.2020- obecnie	Asystent w Katedrze Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii
10.2016-obecnie	Doktorant w Katedrze Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii
09.2016-09.2020	Nauczyciel chemii w Zespole Szkół Agrobiznesu im. M. Rataja w Klementowicach

PRACA NA RZECZ UCZELNI I WYDZIAŁU

2017, 2018	Prowadzenie pokazów podczas Nocy Biologów
2017, 2021	Prowadzenie pokazów w ramach Festiwalu Nauki
2017	Prowadzenie pokazów i współorganizacja Drzwi Otwartych UMCS
2020	Prowadzenie pokazów w ramach programu „Szkoły partnerskie UMCS”