

## UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE Wydział Biologii i Biotechnologii

Kierunek: Biologia

Katarzyna Anna Kaławaj

nr albumu: 983953

# Aktywność przeciwnowotworowa alfaketoglutaranu w modelu komórkowym ludzkiego kostniakomięsaka

(Anticancer activity of alpha-ketoglutarate in a human osteosarcoma cell model)

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

wykonana w Zakładzie Wirusologii i Immunologii Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii UMCS pod kierunkiem dr hab. Barbary Zdzisińskiej, prof. nadzw. UMCS

Promotor pomocniczy: dr Adrianna Sławińska-Brych

**LUBLIN 2019** 

Badania wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane z grantu badawczego Opus 6 Narodowego Centrum Nauki, nr 2013/11/B/NZ4/04557

### Składam serdeczne podziękowania

Mojemu Promotorowi, Pani dr hab. Barbarze Zdzisińskiej, prof. nadzw. UMCS, za opiekę merytoryczną, cenne rady, cierpliwość oraz czas poświęcony podczas przygotowywania niniejszej rozprawy,

Promotorowi pomocniczemu, Pani dr Adriannie Sławińskiej-Brych za miłą współpracę, życzliwość oraz cenne wskazówki związane z metodyką wykonywanych przeze mnie badań,

> Wszystkim Pracownikom i Doktorantom Zakładu Wirusologii i Immunologii UMCS w Lublinie za stworzenie miłej i sympatycznej atmosfery pracy,

Rodzinie i Najbliższym, za wsparcie, cierpliwość i zrozumienie.

# SPIS TREŚCI

| I. Wykaz skrótów   | 7  |
|--|----|
| II. Wstęp  | 13 |
| 1. Wprowadzenie  | 13 |
| 2. Kostniakomięsak   | 14 |
| 2.1. Cechy charakterystyczne   | 14 |
| 2.2. Lokalizacja i typy histologiczne                                  | 15 |
| 2.3. Klasyfikacja kostniakomięsaka                                     | 15 |
| 2.4. Epidemiologia, czynniki ryzyka, rokowanie                         | 18 |
| 2.5. Etiologia kostniakomięsaka  | 20 |
| 2.6. Najczęstsze zaburzenia molekularne występujące w kostniakomięsaku | 22 |
| 2.7. Objawy, diagnostyka i leczenie kostniakomięsaka                   | 26 |
| 3. Alfa-ketoglutaran   | 28 |
| 3.1. Powstawanie i rola AKG  |    |
| 3.2. Właściwości egzogennego AKG                                       |    |
| 3.3. Przeciwnowotworowe działanie AKG                                  |    |
| III. Cel pracy   | 38 |
| IV. Materiały  | 39 |
| 1. Alfa ketoglutaran   | 39 |
| 2. Płyny odżywcze do hodowli komórkowej                                | 39 |
| 3. Antybiotyki   | 39 |
| 4. Linie komórkowe   | 39 |
| 5. Odczynniki  | 40 |
| 6. Bufory i żele   | 41 |
| 7. Przeciwciała  | 42 |
| 8. Zestawy dostępne komercyjnie  | 42 |
| 9. Sprzęt laboratoryjny  | 44 |
| V. Metody  | 46 |
| 1. Przygotowanie hodowli komórkowych                                   | 46 |
| 2. Określanie toksyczności AKG – test LDH                              | 46 |
| 3. Określanie żywotności/proliferacji komórek                          | 47 |
| 3.1. Test MTT  |    |
| 3.2. Test BrdU   |    |

| 4. Analiza cyklu komórkowego  | 49 |
|---|----|
| 5. Ocena apoptozy i nekrozy   | 50 |
| 6. Ocena aktywacji kaspazy-3 przy użyciu cytometrii przepływowej        | 51 |
| 7. Ocena aktywacji kaspazy-8 i -9 za pomocą cytometrii przepływowej     | 51 |
| 8. Metoda Western blotting  | 52 |
| 9. Metoda immunoenzymatyczna (ang. enzyme-linked immunosorbent assay    | _  |
| ELISA)  | 54 |
| 9.1. Oznaczanie wewnątrzkomórkowego poziomu białek                      |    |
| 9.2. Określanie ilości cytokin w płynie hodowlanym                      | 56 |
| 10. Określanie stopnia migracji komórek metodą rysy (scratch assay)     | 56 |
| 11. Określanie inwazyjności komórek                                     | 58 |
| 12. Analiza statystyczna  | 59 |
| VI. Wyniki  | 60 |
| 1. Wpływ AKG na żywotność komórek prawidłowych                          | 60 |
| 2. AKG hamuje proliferację komórek kostniakomięsaka                     | 61 |
| 3. AKG hamuje cykl komórkowy w komórkach Saos-2 i HOS w fazie $G_1$     | 62 |
| 4. Wpływ AKG na ekspresję białek związanych z cyklem komórkowym         | 64 |
| 4.1. Wpływ AKG na ekspresję cykliny D1 w komórkach linii Saos-2 i HOS   | 65 |
| 4.2. Wpływ AKG na ekspresję inhibitora kinaz zależnych od cyklin pź     | 21 |
| Waf1/Cip1 w komórkach linii Saos-2 i HOS                                | 66 |
| 5. AKG indukuje śmierć komórek kostniakomięsaka poprzez apoptozę        | 68 |
| 6. Wpływ AKG na aktywację kaspaz  | 71 |
| 6.1. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3                                   | 71 |
| 6.2. Ocena zdolności AKG do aktywowania apoptozy drogą zewnątr          | Z- |
| i wewnątrzpochodną  | 74 |
| 6.2.1. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-8                                 | 74 |
| 6.2.2. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-9                                 | 76 |
| 7. Wpływ AKG na ekspresję białek związanych z wewnątrzpochodnym szlakie | m  |
| apoptozy  | 77 |
| 8. Wpływ AKG na aktywację kinaz białkowych aktywowanych mitogenar       | ni |
| (MAPK)  | 79 |
| 8.1. AKG obniża poziom fosforylacji kinazy ERK1/2                       | 79 |
| 8.2. AKG aktywuje kinazę JNK  | 80 |
| 8.3. Wpływ AKG na fosforylację kinazy p-38                              | 81 |

| 9. Wpływ AKG na aktywację kinazy białkowej Akt 82                           | 2 |
|---|---|
| 10. AKG indukuje apoptozę w komórkach linii Saos-2 poprzez aktywację JNK 84 | 4 |
| 11. Wpływ AKG na wytwarzanie TGF-β przez komórki kostniakomięsaka linii     |   |
| Saos-2 i HOS  | 7 |
| 12. Wpływ AKG na wytwarzanie VEGF przez komórki kostniakomięsaka linii      |   |
| Saos-2 i HOS  | 8 |
| 13. Wpływ AKG na zdolności migracyjne komórek kostniakomięsaka              | 0 |
| 14. Wpływ AKG na inwazyjność komórek kostniakomięsaka                       | 3 |
| VII. Omówienie wyników i dyskusja   | 5 |
| VIII. Wnioski   | 8 |
| IX. Streszczenie  | 9 |
| X. Abstract   | 2 |
| XI. Piśmiennictwo   | 4 |
| SPIS RYCIN I TABEL  | 6 |
| SPIS WYKRESÓW   | 8 |

### I. Wykaz skrótów:

143B – linia komórkowa ciągła ludzkiej osteosarkomy

**2-HG** – D-2-hydroksyglutaran (*D-2-hydroxyglutarate*)

**2-OGDDs** – dioksygenazy zależne od alfa-ketoglutaranu (2-*oxoglutarate-dependent dioxygenases*)

**5-hmC** – 5-hydroksymetylocytozyna (5-hydroxymethylcytosine)

**5mC** – 5-metylocytozyna (*5-methylcytosine*)

A/A – roztwór antybiotyków (antibiotic/antimycotic)

AJCC – Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka (American Joint Committee on Cancer)

AKG – alfa-ketoglutaran (alpha-ketoglutarate)

Akt – kinaza białkowa B, inaczej PKB (protein kinase B)

ALP – alkaliczna fosfataza (alkaline phosphatase)

ANOVA – analiza wariancji (analysis of variance)

**AP1** – białko aktywujące 1 (*activator protein 1*)

**Apaf** – czynnik aktywujący proteazy apoptotyczne (*apoptotic protease activating factor*)

**APS** – nadsiarczan amonu (*ammonium persulfate*)

ATCC – Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (American Type Culture Collection)

**ATP** – adenozyno-5'-trifosforan (*adenosine-5'-triphosphate*)

**Bad** – białko proapoptotyczne podrodziny BH3-only (*Bcl-2 associated agonist of cell death*)

**Bak** – białko proapoptotyczne podrodziny Bax (*Bcl-2 antagonist/killer 1*)

Bax – białko proapoptotyczne podrodziny Bax (Bcl-2-associated X protein)

**Bcl-2** – białko antyapoptotyczne (*B-cell lymphoma 2*)

**Bcl-xl** – białko antyapoptotyczne (*B-cell lymphoma-extra large*)

**BCA** – metoda oznaczania ilości białka z zastosowaniem kwasu bicynchoninowego (*bicinchoninic acid assay for protein assessment*)

bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor)

**Bim** – aktywatorowe białko proapoptotyczne podrodziny BH3-only (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*)

BLM – gen warunkujący zespół Blooma

BrdU – 5-bromo-2'-deoksyurydyna (5-bromo-2'-deoxyuridine)

Caco-2 – linia komórkowa ludzkiego raka jelita grubego

*CDC25A* – gen kodujący białko CDC25A związane z cyklem komórkowym (*cell division cycle 25 homolog A*)

**CDKs** – kinazy zależne od cyklin (*cyclin-dependent kinases*)

**c-Fos** – komórkowy protoonkogen

c-Jun – jądrowy czynnik transkrypcyjny wchodzący w skład czynnika AP1

c-Myc – protoonkogen

**CoA** – koenzym A

**CREB** – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP (*cAMP response* element-binding protein)

**CT** – tomografia komputerowa (*computed tomography*)

**DMSO** – dimetylosulfotlenek (*dimethyl sulfoxide*)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (deoxyribonucleic acid)

E2F – rodzina czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w kontrolę proliferacji

EDTA – kwas wersenowy (ethylenediaminetetraacetic acid)

ELISA – test immunoenzymatyczny (enzyme-linked immunosorbent assay)

**EMEM** – podłoże hodowlane (*Eagle's Minimum Essential Medium*)

**EMT** – przejście epitelialno-mezenchymalne (*epithelial-mesenchymal transition*)

**ERK** – kinaza białkowa regulowana sygnałem zewnatrzkomórkowym (*extracellular signal-regulated kinases*)

**FADH**<sub>2</sub> – zredukowana forma dinukleotydu flawinoadeninowego (*reduced flavin adenine dinucleotide*)

Fas-L – ligand receptora Fas

**FBS** – bydlęca surowica płodowa (*fetal bovine serum*)

FH – hydrataza fumaranowa (fumarate hydratase)

**FITC** – izotiocyjanian fluoresceiny (*fluorescein isothiocyanate*)

**FLICA** – metoda oceny aktywności kaspazy polegająca na wiązaniu się inhibitora połączonego z fluorochromem z centrum aktywnym kaspazy (*Fluorochrome-Labeled Inhibitor of Caspase Assay*)

FOXO3a – czynnik transkrypcyjny (forkhead box-O3a)

G<sub>0</sub> – faza spoczynku podczas cyklu komórkowego (*G zero phase*)

 $G_1$  – faza wzrostu podczas cyklu komórkowego (*Growth 1*)

G<sub>2</sub> – faza wzrostu podczas cyklu komórkowego (Growth 2)

HDL – lipoproteina wysokiej gęstości (high density lipoprotein)

Hep3B – ludzka linia raka wątrobowokomórkowego

**hFOB 1.19** – ludzka linia prawidłowych osteoblastów, transfekowana antygenem T wirusa SV40

HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor)

HIF – czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją (hypoxia-inducible factor)

HOS – linia komórkowa ciągła ludzkiej osteosarkomy

HRE – element odpowiedzi na hipoksję (hypoxia responsive element)

HRP – peroksydaza chrzanowa (horseradish peroxidase)

HSF – linia komórkowa prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej

HT-29 – linia komórkowa ludzkiego raka jelita grubego

IC<sub>50</sub> – stężenie powodujące zahamowanie proliferacji komórek o 50% (50% *inhibitory concentration*)

**IDH** – dehydrogenaza izocytrynianowa (*isocitrate dehydrogenase*)

*IDH* – gen kodujący IDH

IGF-I/II – insulinopodobny czynnik wzrostu I/II (insulin-like growth factor I/II)

**IGF-RI** – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu I (*insulin-like growth factor I receptor*)

JNK – kinaza białkowa aktywowana stresem (c-Jun N-terminal kinases)

kDa – kilodalton, jednostka masy cząsteczkowej

**KDM 2-7** – demetylazy lizynowe zawierające domenę Jumonji C (*Jumonji C domain containing lysine demethylases*)

**LDH** – dehydrogenaza mleczanowa (*lactate dehydrogenase*)

LDL – lipoproteina niskiej gęstości (low density lipoprotein)

LLC – linia raka płuca Lewisa

**LPS** – lipopolisacharyd (*lipopolysaccharide*)

LRP 5/6 – ko-receptor receptora białek Wnt (*lipoprotein-related protein 5/6*)

LS180 – linia komórkowa ludzkiego raka jelita grubego;

**MAP** – chemioterapia oparta na połączeniu 3 leków: metotreksatu, doksorubicyny i cisplatyny

**MAPK** – kinazy białkowe aktywowane mitogenem (*mitogen-activated protein kinases*)

**MDM2** – białko hamujące działanie (inhibitor) czynnika transkrypcyjnego p53 (*mouse double minute 2*)

MDM2 – gen kodujący MDM2

MG63 – linia komórkowa ciągła ludzkiej osteosarkomy

MMP-2 – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 2 (*matrix metalloproteinase-*2)

**MRI** – rezonans magnetyczny (magnetic resonance imaging)

**mTOR** – kinaza tzw. ssaczy cel rapamycyny (*mammalian target of rapamycin kinase*)

**mTORC1** – kompleks kinazy mTOR 1 (mammalian target of rapamycin complex 1)

**MTT** – bromek dimetylotetrazoliowy (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide*)

**NAD**<sup>+</sup> – utleniona forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (*oxidized nicotinamide adenine dinucleotide*)

**NADH** – zredukowana forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (*reduced nicotinamide adenine dinucleotide*)

**NF-κB** – czynnik jądrowy κB (*nuclear factor κB*)

ODD – zależna od tlenu domena degradacji (*oxygen-dependent degradation domain*)
OS – kostniakomięsak (*osteosarcoma*)

p16 – białko o właściwościach supresora nowotworowego (protein 16)

**p21 Waf1/Cip1** – białko p21, produkt genu *WAF1/CIP1*, inhibitor kinaz zależnych od cyklin

p27 – białko p27, inhibitor kinaz zależnych od cyklin

p38 – kinaza białkowa należąca do kinaz białkowych aktywowanych mitogenami

p53 – czynnik transkrypcyjny o właściwościach supresora nowotworowego (*protein* 53)

p73 – białko o właściwościach supresora nowotworowego (protein 73)

**PAGE** – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (*polyacrylamide gel electrophoresis*)

**PBS** – sól fizjologiczna buforowana fosforanami (*phosphate buffered saline*)

**PCNA** – jądrowy antygen komórek proliferujących (*proliferating cell nuclear antygen*)

**PE** – fikoerytryna (*phycoerythrin*)

**PET** – pozytonowa tomografia emisyjna (*positron emission tomography*)

**PHDs** – hydroksylazy prolinowe (*proline hydroxylases*)

**PI** – jodek propidyny (*propidium iodide*)

PI3K – kinaza 3 fosfatydyloinozytolu (phosphatidylinositol 3-kinase)

PKB – kinaza białkowa B, inaczej Akt (protein kinase B)

pRb – białko retinoblastoma (Retinoblastoma protein)

PMSF – fluorek fenylometanosulfonylu (phenylmethanesulfonyl fluoride)

**PTEN** – negatywny regulator szlaku sygnałowego PI3K/Akt (*phosphatase and tensin homolog*)

PTEN – gen kodujący PTEN

**PVDF** – fluorek poliwinylidenowy (polyvinylidene difluoride)

pVHL – białko von Hippel-Lindau (von Hippel-Lindau protein)

RB1 – gen supresorowy kodujący białko retinoblastoma

RECQ – rodzina helikaz DNA

**RECQL4** – gen kodujący białka helikaz z rodziny RECQ

**RIPA** – bufor lizujący (radioimmunoprecipitation assay buffer)

**RNA** – kwas rybonukleinowy (*ribonucleic acid*)

**RNAza** – rybonukleaza (*ribonuclease*)

**ROS** – reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species*)

S – faza syntezy DNA podczas cyklu komórkowego (synthesis)

Saos-2 – linia komórkowa ciągła ludzkiej osteosarkomy

**SD** – odchylenie standardowe (*standard deviation*)

**SDH** – dehydrogenaza bursztynianowa (*succinate dehydrogenase*)

**SDS** – siarczan dodecylu sodu (*sodium dodecyl sulfate*)

Smad - rodzina białek będących głównymi przekaźnikami sygnału dla receptorów

TGF-β oraz spełniających rolę czynników transkrypcyjnych

**TBS** – wodny roztwór soli fizjologicznej zbuforowany Tris o pH 7,4 (*tris-buffered* saline)

**TBS-T** – wodny roztwór soli fizjologicznej zbuforowany Tris o pH 7,4, z dodatkiem Tween-20 (*tris-buffered saline Tween-20*)

TCA – cykl kwasów trikarboksylowych (tricarboxylic acid cycle)

**TCF** – czynnik transkrypcyjny zaangażowany w szlak sygnalizacyjny Wnt (*T-cell factor*)

**TEMED** – N,N,N',N' – tetrametyloetylenodiamina (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine)

**TET 1-3** – metylotransferazy DNA (ten-eleven translocation hydroxylases)

**TGF-** $\beta$  – transformujący czynnik wzrostu (*transforming growth factor*  $\beta$ )

**TNF-** $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor*  $\alpha$ )

**TNM** – guz, węzły chłonne, przerzuty; klasyfikacja nowotworów (*tumor, nodus, metastases*)

TP53 – gen kodujący czynnik transkrypcyjny p53

**Tris** – trójhydroksymetyloaminometan (*tris*(*hydroxymethyl*)*aminomethane*)

**UICC** – Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem (*Union for International Cancer Control*)

**VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (vascular endothelial growth factor)

*Vegf* – gen kodujący czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular* endothelial growth factor)

**VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular* endothelial growth factor receptor)

Wnt – białko wydzielnicze typu Wingless (Wingless-type protein)

WRN – gen warunkujący zespół Wernera

## II. Wstęp

#### 1. Wprowadzenie

Nowotwory są główną przyczyną zachorowalności niezakaźnej oraz śmiertelności pojawiającej się na całym świecie, ustępując tylko chorobom sercowonaczyniowym. Mięsaki są jedną z najstarszych poznanych form nowotworowych w historii onkologii. Mięsaki kości to grupa bardzo rzadkich nowotworów u dorosłych. Ich dokładna histogeneza w części przypadków nie jest znana. Klinicznie mięsaki kości dzieli się na mięsaki wrzecionowatokomórkowe, do których należą mięsaki kościopochodne, większość chrzęstniakomięsaków i inne rzadko występujące podtypy oraz na mięsaki drobnokomórkowe, zawierające głównie rodzinę mięsaków Ewinga. Najczęstszym nowotworem kości z grupy wrzecionowatokomórkowych jest kostniakomięsak (osteosarcoma), inaczej mięsak kościopochodny.

Kostniakomięsak jest najczęstszym pierwotnym nowotworem kości występującym u dzieci i młodzieży. Stanowi około 1% wszystkich nowotworów u osób dorosłych oraz 5-7% u dzieci i młodzieży. Jedną z najczęściej podawanych predyspozycji do zachorowania na ten typ nowotworu u dzieci jest wysoki wzrost. Leczenie przynosi korzystne efekty u około 60% przypadków kostniakomięsaka, natomiast u około 40% pacjentów nowotwór ten jest silnie przerzutujący, oporny na chemioterapię, dający gorsze rokowanie. W związku z tym poszukuje się wciąż nowych środków, które mogłyby wspomagać leczenie tego nowotworu i polepszyć rokowania pacjentów cierpiących na kostniakomięsaka.

Alfa-ketoglutaran (AKG) jest metabolitem występującym naturalnie w organizmie, powstającym w cyklu Krebsa z izocytrynianu. W związku z tym AKG pełni istotną rolę w metabolizmie energetycznym. Jest również prekursorem aminokwasów, dzięki czemu uczestniczy w metabolizmie białkowym. AKG jako kosubstrat dioksygenaz uczestniczy w regulacji stabilizacji czynnika transkrypcyjnego indukowanego hipoksją (HIF), który zapoczątkowuje transkrypcję wielu genów kodujących białka wspomagające rozwój nowotworu. Związek ten pełni również istotną rolę w epigenetycznej modyfikacji chromatyny poprzez regulację aktywności hydroksylaz TET 1-3, które uczestniczą w demetylacji DNA oraz demetylaz lizynowych KDM (zawierających domenę Jumonji), przeprowadzających demetylację histonów.

Egzogenny AKG podawany pacjentom w formie wlewów dożylnych wykazuje szereg korzystnych właściwości w organizmie, m. in. przyspiesza gojenie się ran, zapobiega urazom niedokrwiennym, wyczerpaniu białka mięśniowego, poprawia przepływ krwi przez nerki, a jako suplement diety używany przez sportowców zwiększa masę mięśni. AKG w połączeniu z hydroksymetylofurfuralem (związkiem o właściwościach antyoksydacyjnych) jest dostępny jako komercyjny preparat stosowany w okresie przedoperacyjnym. Według danych literaturowych, AKG wykazuje również właściwości przeciwnowotworowe, jednak jak dotychczas nie badano jego bezpośredniego wpływu na kostniakomięsaka. W związku powyższym, niniejszej pracy podjeto się określenia aktywności z W przeciwnowotworowej alfa-ketoglutaranu w modelu komórkowym ludzkiego kostniakomięsaka oraz poznania mechanizmu zwiazanego Z jego przeciwnowotworowym działaniem.

#### 2. Kostniakomięsak (łac. Osteosarcoma)

#### 2.1. Cechy charakterystyczne

Kostniakomięsak (OS) jest rozpoznawany od ponad dwóch stuleci i jest najczęstszym pierwotnym, niehematopoetycznym nowotworem układu kostnego o wysokim stopniu złośliwości. Uważa się, że powstaje z prymitywnych, mezenchymalnych komórek kościotwórczych, a jego charakterystyczną cechą histologiczną jest produkcja osseiny (ang. osteoid) i/lub tworzenie zmineralizowanej kości. Osteoid jest to organiczna, niezmineralizowana część macierzy kostnej, składająca się głównie z włókien kolagenowych typu I. W guzie mogą również występować inne populacje komórek, które podobnie jak osteoblasty wywodzą się z pluripotencjalnych komórek mezenchymalnych. O rozpoznaniu kostniakomięsaka decyduje wykrycie osteoidu lub obszaru kości, które zostały zsyntetyzowane przez komórki złośliwe (Campanaccci M., 2013; Agarwal M., 2012; Simpson S., i in., 2017; Hameed O., i in., 2011).

#### 2.2. Lokalizacja i typy histologiczne

Kostniakomięsak może występować w każdej kości, jednak szczególnie często pojawia się w obszarze przynasadowym szybko rosnących kości długich kończyn. Najczęściej atakuje dystalną kość udową (w 30% przypadków), następnie proksymalną kość piszczelową (15%) i proksymalną kość ramieniową (15%). W kościach długich zazwyczaj tworzy się w części przynasadowej (90%), niekiedy w trzonie (9%) i rzadko w nasadzie kości. Około 50% przypadków kostniakomięsaka występuje w okolicy kolana. Inną, częstą lokalizacją tego nowotworu jest czaszka, szczęka i miednica. Odnotowano również przypadki kostniakomięsaka w kości rzepki (Aoki M., i in., 2014; Agarwal M., 2012; Bielack S., i in., 2002; Bielack S., i in., 2009; Klein M. i Siegal G., 2006; Morello E., i in., 2011; Fletcher C., i in., 2013).

Mięsaki kości są bardzo heterogenną grupą nowotworów. W zależności od miejsca wzrostu wyróżnia się kostniakomięsaki wewnątrzszpikowe, rozwijające się w jamie szpikowej oraz kostniakomięsaki powierzchniowe. Kostniakomięsaki wewnątrzszpikowe dzieli się następnie na: typowe wewnątrzszpikowe (inaczej klasyczne lub konwencjonalne), teleangiektatyczne, wysokozróżnicowane oraz drobnokomórkowe. Wśród kostniakomięsaków powierzchniowych wyróżnia się typ przykostny (parostealny), okostnowy (periostealny) oraz niskozróżnicowany (Klein M. i Siegal G., 2006; Gorlick R., 2009). Najbardziej powszechnym typem histologicznym jest kostniakomięsak konwencjonalne, który stanowi około 75% wszystkich przypadków tego nowotworu. Konwencjonalne kostniakomięsaki dalej są klasyfikowane jako typy osteoblastyczne, chondroblastyczne i fibroblastyczne. Typy te zależą od tego, które komórki dominują w produkcji macierzy komórkowej (Fox M. i Trotta B., 2013; Raymond A i Jaffe N., 2009; Gorlick R., 2009).

#### 2.3. Klasyfikacja kostniakomięsaka

Obecnie do klasyfikacji mięsaków kości stosowane są dwa systemy: klasyfikacja Ennekinga i TNM (Durfee R., i in., 2016; Moore D. i Luu H., 2014).

Kompleksowy system klasyfikacji mięsaka kości jako pierwszy utworzył Enneking. System ten do opisu nowotworu wykorzystuje ocenę histologiczną (stopień złośliwości – G), obecność lub brak przerzutów odległych (M), a pod

względem oceny położenia guza w obrębie anatomicznej bariery (T) rozróżnia, czy masa jest wewnątrzprzedziałowa, czy stała się pozaprzedziałowa. W systemie Ennekinga wyróżnia się trzy różne stadia rozwoju kostniakomięsaka. Guzy pierwszego stadium cechują się niskim stopniem złośliwości i niewielkim ryzykiem powstania przerzutu. Guzy drugiego stadium posiadają wysoki stopień złośliwości i większe prawdopodobieństwo utworzenia przerzutu. Stadia I i II są dodatkowo podzielone na podkategorie A lub B, przy czym A dotyczy nowotworów zlokalizowanych w obrębie dobrze określonej bariery anatomicznej (np. kości korowej, torebki stawowej), tzw. wewnątrzprzedziałowych, a B - nowotworów anatomiczną wychodzących poza bariere W której powstały, tzw. pozaprzedziałowych. W końcu wyróżniamy guzy w III stadium rozwoju, którym towarzyszy występowanie miejscowych lub odległych przerzutów (Enneking W., i in., 1980; Durfee R., i in., 2016; Moore D. i Luu H., 2014).

| 0.1     |                     |                           | D                      |
|---------|---------------------|---------------------------|------------------------|
| Stadium | Stopień             | Miejsce położenia         | Przerzuty              |
|         | histologiczny       |                           |                        |
| IA      | G1 - niski stopień  | T1 – wewnątrzprzedziałowy | M0 – brak przerzutów   |
|         | złośliwości         |                           |                        |
| IB      | G1 - niski stopień  | T2 – pozaprzedziałowy     | M0 – brak przerzutów   |
|         | złośliwości         |                           |                        |
| IIA     | G2 - wysoki         | T1 – wewnątrzprzedziałowy | M0 – brak przerzutów   |
|         | stopień złośliwości |                           |                        |
| IIB     | G2 - wysoki         | T2 – pozaprzedziałowy     | M0 – brak przerzutów   |
|         | stopień złośliwości |                           |                        |
| III     | każdy               | Każde                     | M1 – przerzuty         |
|         |                     |                           | regionalne lub odległe |

Tab. 1. Klasyfikacja kostniakomięsaka wg. Ennekinga [opracowanie własne na podstawie Enneking W., i in., 1980]

Z kolei system klasyfikacji TNM został opracowany i jest utrzymywany przez Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka (AJCC – American Joint Committee on Cancer) i Międzynarodową Unię do Walki z Rakiem (UICC – Union for *International Cancer Control*). Jest to najczęściej stosowany system klasyfikacji nowotworów przez lekarzy na całym świecie. W swoich podstawowych zasadach jest bardzo podobny do systemu Ennekinga. System TNM opiera się na ocenie rozległości guza (T – *tumor*), zajęcia węzłów chłonnych (N - *nodes*), obecności przerzutów (M – *metastasis*) oraz czterostopniowej ocenie histologicznej (G1-G4), w której G1 i G2 oznacza niski stopień złośliwości histologicznej, natomiast G3 i G4 - wysoki stopień złośliwości histologicznej (Sobin L., i in., 2009; Moore D. i Luu H., 2014; AJCC, 2010).

| Stadium | Guz pierwotny | Regionalne węzły | Przerzuty   | Stopień złośliwości |
|---------|---------------|------------------|-------------|---------------------|
|         | (T)           | chłonne (N)      | odległe (M) | histologicznej (G)  |
| IA      | T1            | NO               | M0          | G1, G2              |
| IB      | T2, T3        | NO               | M0          | G1, G2              |
| IIA     | T1            | NO               | M0          | G3, G4              |
| IIB     | T2            | NO               | M0          | G3, G4              |
| III     | Т3            | NO               | M0          | G3, G4              |
| IVA     | każdy T       | NO               | M1a         | każdy G             |
| IVB     | każdy T       | N1               | każdy M     | każdy G             |
|         | każdy T       | każdy N          | M1b         | każdy G             |

Tab. 2. Klasyfikacja kostniakomięska wg. TNM [opracowanie własne na podstawie AJCC, 2010]

Guz pierwotny (T): T1 - guz o wielkości ≤8 cm w największym wymiarze, T2 - guz o wielkości >8 cm w największym wymiarze, T3 - oddzielne ogniska nowotworowe w obrębie pierwotnej kości. Regionalne węzły chłonne (N): N0 - brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, N1 - obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Przerzuty odległe (M): M0 - brak przerzutów odległych, M1 - obecność przerzutów odległych, M1a - przerzuty do płuc, M1b - przerzuty do innych narządów odległych. Stopień złośliwości histologicznej (G): G1 - dobrze zróżnicowany nowotwór (niski stopień złośliwości histologicznej), G2 - pośrednio zróżnicowany nowotwór (wysoki stopień złośliwości histologicznej), G3 - słabo zróżnicowany nowotwór (wysoki stopień złośliwości histologicznej).

#### 2.4. Epidemiologia, czynniki ryzyka, rokowanie

Kostniakomięsak stanowi mniej niż 1% wszystkich nowo zdiagnozowanych nowotworów u osób dorosłych i 3 - 5% u dzieci. Reprezentuje on około 20% wszystkich pierwotnych nowotworów złośliwych kości. Po białaczce i chłoniaku jest to trzecia, najczęstsza pierwotna choroba nowotworowa u nastolatków (Damron T., i in., 2007; Ottaviani G. i Jaffe N., 2010). Częstość występowania kostniakomięsaka we wszystkich populacjach wynosi około 4 - 5 na 1 milion osób. Jest wyższa w okresie dojrzewania, w którym osiąga rocznie 8 - 11 na 1 milion osób w wieku 15 - 19 lat (Kamal A., i in., 2018; Ritter J. i Bielack S., 2010).

Kostniakomięsak rzadko jest diagnozowany przed ukończeniem piątego roku życia. Częstotliwość jego pojawiania się wzrasta wraz z wiekiem aż do okresu dojrzewania (Savage S. i Mirabello L., 2011). Około 60% przypadków tego raka diagnozuje się u pacjentów młodszych niż 25 lat. Drugi szczyt zachorowania na OS występuje po 60 roku życia (Agarwal M., 2012; Mirabello L., i in., 2009a; Durfee R., i in., 2016). Mimo, że OS występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet (stosunek zapadalności wynosi odpowiednio 1,5:1), jednak choroba ta występuje u kobiet w młodszym wieku w porównaniu z mężczyznami, prawdopodobnie z powodu wcześniejszego zrywu wzrostu u kobiet. Sugeruje to, że wzrost kości, zmiany hormonalne i/lub rozwój związany z dojrzewaniem mogą być związane z etiologią tego nowotworu. Ta zależność między występowaniem kostniakomięsaka, hormonami i wzrostem może również częściowo tłumaczyć nieco większą ogólną zapadalność mężczyzn na ten nowotwór w porównaniu z kobietami (Osasan S., i in., 2016; Mirabello L., i in., 2011; Savage S. i Mirabello L., 2011; Mirabello L., i in., 2009b).

OS najczęściej występuje w kościach długich kończyn dolnych. U młodych pacjentów zazwyczaj pojawia się w miejscach szybkiego wzrostu kości (Mirabello L., i in., 2009a). Nowotwór ten powstaje przeważnie w obszarze przynasadowym, sąsiadującym z płytką wzrostu kości długich, które są miejscami szczególnie szybkiego wzrostu w okresie dorastania młodzieży. Sugeruje to, że powstawanie kostniakomięsaka w dużej mierze jest związane z szybkim wzrostem kości. Badania wykazały, że OS występował częściej u osób wysokich. Pacjenci, u których zdiagnozowano kostniakomięsaka byli wyżsi niż ich rówieśnicy w tym samym wieku. Występowanie tego nowotworu w kościach kończyn zmniejsza się wraz

z wiekiem na rzecz guzów powstających w szkielecie osiowym, chociaż nadal najbardziej powszechnym miejscem jego występowania pozostają kości długie kończyn dolnych. U starszych pacjentów czynnikiem ryzyka związanym z rozwojem kostniakomięsaka jest choroba Pageta lub inna łagodna zmiana kości. Choroba Pageta jest stanem przedrakowym, ponieważ u około 1% pacjentów z tą chorobą rozwija się OS (Ottaviani G. i Jaffe N., 2009; Savage S. i Mirabello L., 2011; Clark J., i in., 2008). Innym, udowodnionym czynnikiem ryzyka wystąpienia OS jest promieniowanie jonizujące. Kostniakomięsak może rozwinąć się w wyniku promieniowania terapeutycznego albo przypadkowego. Jednak bardzo niskie dawki promieniowania otrzymywane przez pacjentów w czasie diagnostyki medycznej, takiej jak zdjęcia rentgenowskie lub tomograficzne, nie są związane z ryzykiem wystąpienia tego nowotworu (Savage S. i Mirabello L., 2011).

Dane epidemiologiczne wskazują, iż większy odsetek zachorowań na OS występuje u Afroamerykanów niż u ludzi innej rasy. Literatura podaje także, że u osób z dużą masą urodzeniową występuje nieznacznie większe ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu (Ottaviani G. i Jaffe N., 2009; Chen S., i in., 2015).

Wskaźniki przeżycia pacjentów z kostniakomięsakiem znacznie się poprawiły wraz z wprowadzeniem chemioterapii, chociaż od tego czasu stały się też bardziej stabilne. Obecnie 5-letnie przeżycie we wszystkich grupach pacjentów z OS o wysokim stopniu złośliwości wynosi 60 - 66%, ale zależy w dużym stopniu od stadium choroby w momencie rozpoznania. Stopień zaawansowania choroby jest ważnym czynnikiem rokowniczym u pacjentów z kostniakomięsakiem w każdym wieku. Pacjenci, u których występują przerzuty mają znacznie niższy 5-letni wskaźnik przeżycia niż pacjenci z chorobą umiejscowioną lub regionalną. Współczynnik 5-letniego przeżycia u osób z umiejscowionym OS wynosi nawet 60 -78%, ale drastycznie spada do 20 - 30% u pacjentów z chorobą przerzutową. U około 20% pacjentów rozwijają się przerzuty. Ponad 85% z nich występuje w płucach, podczas gdy kości są drugim pod względem częstości miejscem powstawania przerzutów (Isakoff M., i in., 2015; Friebele J., i in., 2015; Bacci G., i in., 2006; Haddox C., i in., 2014; Smith M., i in., 2010).

Statystyki wskazują, że przeżycie pacjentów z kostniakomięsakiem jest dłuższe, gdy występuje on w kościach krótkich, a najkrótsze, gdy jest zlokalizowany w okolicy miednicy i kręgosłupa (Savage S. i Mirabello L., 2011). Innymi źle rokującymi czynnikami są: wzrost rozmiarów guza, zwiększenie poziomu fosfatazy alkalicznej w surowicy, umiejscowienie nowotworu w szkielecie osiowym oraz wtórny OS (Bielack S, i in., 2002). Zaawansowany wiek wiąże się z jednej strony ze zwiększeniem częstotliwości występowania OS o wyższym stopniu złośliwości oraz umiejscowieniem go w szkielecie osiowym, z drugiej strony - ze zmniejszoną odpowiedzią na leczenie i gorszą tolerancją chemioterapii. W związku z tym osoby starsze mają gorsze rokowania (Grimer R, i in., 2003; Harting M., i in., 2010).

Pomimo agresywnej chemioterapii u osób Ζ umiejscowionym kostniakomięsakiem, około 30 - 40% z nich doświadcza nawrotu choroby (Federman N., i in., 2009; Otoukesh B., i in., 2018). U większości tych pacjentów nawrót choroby jest spowodowany przerzutem do płuca. Nawracająca choroba, zarówno miejscowa jak i odległa, zmniejsza wskaźnik 5-letniego przeżycia średnio do 20%. Wskaźnik ten może wynosić aż 45% w przypadku, gdy nawrót występuje więcej niż po dwóch latach od ustąpienia choroby, a zmiany nowotworowe można operacyjnie wyciąć. Kostniakomiesaki o niższym stopniu złośliwości, w tym przykostne i okostnowe, mają o wiele lepsze rokowanie niż typ konwencjonalny o wysokim stopniu złośliwości. Współczynnik 5-letniego przeżycia OS okostnowego wynosi około 83%, a przykostnego ok. 91%. Wynika to przede wszystkim z niskiego odsetka tworzenia przerzutów (Isakoff M., i in., 2015; Durfee R., i in., 2016; Otoukesh B., i in., 2018).

#### 2.5. Etiologia kostniakomięsaka

Etiologia kostniakomięsaka nie jest znana. Chociaż większość przypadków kostniakomięsaka jest wynikiem sporadycznych mutacji, uważa się, że kluczową zmianą w patogenezie OS jest utrata funkcji genów supresorowych nowotworu.

Stwierdzono, że występowanie pewnych chorób genetycznych predysponuje do rozwoju OS. Częstsze występowanie kostniakomięsaka obserwuje się u osób z rodzinnym zespołem Li-Fraumeni, dziedziczną retinoblastomą, zespołem Rothmunda-Thomsona, Blooma lub zespołem Wernera. Geny, związane z tymi wszystkimi rodzinnymi zespołami, kodują produkty białkowe niezbędne do stabilizacji genomu, a ich upośledzenie może objawiać się wadliwym utrzymywaniem DNA (Ottaviani G. i Jaffe N., 2009; Moore D. i Luu H., 2014; Rickel K., i in., 2017; Martin J., i in., 2012; Mohaghegh P. i Hickson I., 2001). Zespół Li-Fraumeni, dziedziczony w sposób autosomalnie dominujący, jest najczęstszym zespołem predysponującym do rozwoju mięsaków dziecięcych. Wiąże się z mutacją w genie *TP53*. Gen ten koduje główny czynnik transkrypcyjny p53, regulujący ekspresję genów związanych z naprawą DNA i inicjujący apoptozę komórki, gdy jej uszkodzenie jest nieodwracalne. Utrata funkcji genu supresorowego *TP53* predysponuje pacjentów z zespołem Li-Fraumeni do rozwoju różnych nowotworów, a u około 30% z nich rozwija się kostniakomięsak (Beckerman R. i Prives., 2010; Kansara M. i Thomas D., 2007; Zhang J., i in., 2015a; Bougeard G., i in., 2015).

Bezpośrednia inaktywacja genu *TP53* nie jest jednym mechanizmem, za pomocą którego szlak p53 może zostać zakłócony. Również na poziomie potranslacyjnym może dochodzić do inaktywacji p53 w wyniku działania białek regulujących jego funkcję. Znanym inhibitorem p53 jest białko MDM2, które ma zdolność zarówno promowania degradacji p53, jak i hamowania jego transkrypcji. Amplifikacja genu *MDM2* występuje stosunkowo rzadko w pierwotnym kostniakomięsaku, ale znacznie częściej pojawia się w przerzutach tego nowotworu oraz w zmianach nawrotowych (Martin J., i in., 2012).

Inną predyspozycją do rozwoju kostniakomięsaka jest brak białka retinoblastomy (pRb), spowodowany mutacjami w genie supresorowym nowotworu RB1. Gen RB1 koduje białko pRb, które zapobiega przejściu komórek z fazy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego do fazy S po uszkodzeniu DNA. Białko to wiaże czynniki transkrypcyjne z rodziny E2F, hamując w ten sposób ich funkcję. Czynniki E2F regulują ekspresję cyklin, które poprzez związanie z kinazami zależnymi od cyklin (CDK) ułatwiają wejście komórek w fazę S cyklu podziałowego. Brak białka retinoblastomy skutkuje więc niekontrolowanymi podziałami komórek. Utratę prawidłowej funkcji pRb obserwuje się w kilku sporadycznych ludzkich nowotworach, w tym w kostniakomięsaku. W wielu badaniach wykazano, że utrata funkcji RB1 jest skorelowana ze złym rokowaniem dla pacjentów z kostniakomięsakiem. Dodatkowo stwierdzono, że utrata funkcji RB1 wiąże się ze zwiększonym ryzykiem przerzutów OS i słabą odpowiedzią histologiczną na chemioterapie, w porównaniu z pacjentami bez zmian w funkcji RB1 (Manning A. i Dyson N., 2011; Kleinerman R., i in., 2012; Lohmann D., 2010; Yu C., i in., 2009; Ren W. i Gu G., 2017).

Zwiększona częstość pojawiania się kostniakomięsaka występuje również u osób z mutacjami w genach kodujących helikazy DNA, w tym w zespole Rothmunda-Thomsona, Wernera i Blooma. Zespół Rothmunda-Thomsona jest autosomalnie recesywnym zaburzeniem spowodowanym przez mutację w genie *RECQL4*, który koduje helikazę DNA z rodziny RECQ. Wykazano, że abberacje genu *RECQL4* są związane z rozwojem kostniakomięsaka. Dwa inne zaburzenia helikazy RECQ, to zespoły Blooma i Wernera, które również predysponują do rozwoju OS. Oba zespoły wynikają z niestabilności genomu spowodowanej dziedziczną mutacją w genie *BLM* i *WRN*, odpowiednio dla zespołu Blooma i zespołu Wernera (Lu L., i in., 2014; Larizza L., i in., 2010; Mohaghegh P. i Hickson I., 2001; Wang L. i in., 2003; Nishijo K., i in., 2004).

#### 2.6. Najczęstsze zaburzenia molekularne występujące w kostniakomięsaku

Oprócz zaburzeń genetycznych spowodowanych niestabilnością genomu i utratą genów supresorowych, w kostniakomięsaku występują również zaburzenia w głównych szlakach przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego, które sprzyjają proliferacji komórek OS i przerzutowaniu.

W rozwoju kostniakomiesaka zidentyfikowano zmiany w szlaku sygnałowym receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-RI) (Lamplot J., i in., 2013; Luther G., i in., 2013; Su Y., i in., 2011). Czynniki wzrostu, IGF-I/II, po związaniu z IGF-RI aktywują kolejne kaskady szlaków sygnałowych PI3K/Akt/mTOR i MAPK/ERK, promujących proliferację, migrację i przeżycie komórek. W większości pierwotnych i przerzutowych guzów OS stwierdzono zwiększoną ekspresję IGF-IR oraz IGF-I i IGF-II (Burrow S., i in., 1998). Zwiększona ekspresja IGF-I jest związana z bardziej agresywnymi fenotypami i jest negatywnym czynnikiem rokowniczym, jeśli zostanie zidentyfikowana w pierwotnych guzach (Jentzsch T., i in., 2014; MacEwen E., i in., 2004).

Przyżyciowy szlak sygnałowy PI3K/Akt/mTOR jest podstawowym mechanizmem uczestniczącym w progresji kostniakomięsaka oraz najczęstszym, zaburzonym szlakiem w tym nowotworze. Zaburzenie tego szlaku wywiera plejotropowy wpływ na właściwości komórek rakowych, regulując m.in. proliferację, cykl komórkowy, apoptozę, inwazyjność, przerzutowanie, angiogenezę oraz oporność na czynniki chemiczne. W guzach OS często występują przede

wszystkim mutacje w genie *PTEN*, który jest głównym negatywnym regulatorem szlaku PI3K/Akt. Utrata aktywności *PTEN* prowadzi do trwałej aktywacji tego szlaku (Zhang J., i in., 2015b; Perry J., i in., 2014; Moriarity B., i in., 2015).

W nowotworach ważną rolę odgrywa również transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- $\beta$ ). W zależności od rodzaju nowotworu i stadium rozwoju guza TGF- $\beta$  może działać zarówno jako supresor nowotworu, jak i promotor jego rozwoju (Lamora A., i in., 2016). Wykazano, że TGF- $\beta$  wspiera progresję mięsaków poprzez stymulację przerzutowania. Dzieje się to częściowo poprzez regulację migracji i inwazyjności komórek. W surowicy pacjentów z kostniakomięsakiem obserwowano zwiększony poziom TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 w porównaniu do zdrowych osób. Ponadto zwiększone wytwarzanie TGF- $\beta$  było skorelowane z OS o wysokim stopniu złośliwości i związane z obecnością przerzutów w płucach (Verrecchia F. i Rédini F., 2018; Lamora A., i in., 2014; Yang R., i in., 1998; Xu S., i in., 2014).

Wiazanie proangiogennego białka, czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) z jego receptorem (VEGFR) stymuluje ekspresję białek, takich jak metaloproteinazy i proteazy plazminowe, które degradują macierz zewnątrzkomórkową i umożliwiają tworzenie nowych naczyń krwionośnych. W kostniakomięsaku, u wielu pacjentów obserwuje się zwiększoną ekspresję VEGF oraz amplifikację genów szlaku VEGF. Amplifikacja genów, nadekspresja białka oraz wysokie poziomy VEGF i VEGFR w surowicy pacjentów z OS wiążą się z obecnością przerzutów do płuc oraz uznawane są za zły czynnik rokowniczy dla przeżycia. Pacjenci z wysokim poziomem ekspresji VEGF charakteryzują się krótszym całkowitym przeżyciem w porównaniu z osobami o niższej ekspresji tego czynnika, co sugeruje, że ekspresja VEGF może być biomarkerem rokowniczym u pacjentów z OS (Chen D., i in., 2013; Yang J., i in., 2011). Ponadto stwierdzono, że ekspresja VEGF jest dodatnio skorelowana ze stadiami nowotworowymi kostniakomięsaka, co wiąże się z większym prawdopodobieństwem nawrotu choroby i częstszymi przypadkami przerzutów odległych w grupie osób z wysokim poziomem VEGF w porównaniu z pacjentami o niskim poziomie VEGF. VEGF jest również skorelowany ze słabą odpowiedzią histologiczną na chemioterapię (Abdeen A., i in., 2009; Lammli J., i in., 2012).

Szlak sygnałowy Wnt pełni kluczową rolę w procesie różnicowania, proliferacji i przeżywalności komórek (Alfranca A., i in., 2015; Adamopoulos C., i in., 2016). Ligandy Wnt wiążąc się z receptorami Frizzled i LRP5/6 pobudzają kanoniczny szlak przekazywania sygnału Wnt/β-katenina, który zwiększa aktywność czynnika transkrypcyjnego TCF. Szlak ten pełni istotną rolę w morfogenezie kości w czasie embriogenezy, w regulacji masy kości oraz jej regeneracji (Cai Y., i in., 2014). Badania sugerują, że zwiększona aktywacja szlaku Wnt przyczynia się do rozwoju OS. Zwiększoną aktywność tego szlaku sygnałowego stwierdzono w pierwotnych guzach od pacjentów oraz liniach komórkowych kostniakomięsaka (Chen C., i in., 2015). Jest to prawdopodobnie związane z nadekspresją ligandów Wnt w komórkach OS, które w sposób autokrynny aktywują wspomniany szlak sygnałowy i wpływają na proliferację komórek poprzez zwiększenie ekspresji genu związanego z cyklem komórkowym *CDC25A* (Vijayakumar S., i in., 2011). Ponadto w tkankach OS stwierdza się zwiększoną ekspresję receptorów Wnt (Cai Y., i in., 2014). Aktywacja szlaku Wnt-β-katenina jest również zaangażowana w proces wczesnego przerzutowania OS oraz jego oporność na chemioterapię (Alfranca A., i in., 2015; Adamopoulos C., i in., 2016).

Innym szlakiem, zaangażowanym w rozwój kości jest zachowany ewolucyjnie szlak Notch, który reguluje istotne procesy komórkowe, takie jak proliferacja, różnicowanie czy angiogeneza. Aktywacja tego szlaku wydaje się odgrywać istotną rolę w transformacji nowotworowej komórek kostnych oraz progresji kostniakomięsaka. Zmiany w Notch wpływają zwłaszcza na inwazyjność komórek OS oraz przerzutowanie (Hughes D., 2009; Adamopoulos C., i in., 2016).

Odkrycia z ostatnich lat sugerują, że u podłoża powstawania i rozwoju wielu nowotworów hematologicznych oraz guzów litych leżą mutacje w genach kodujących dehydrogenazę izocytrynianową (*IDH*), przyczyniające się do rozregulowania komórkowej energetyki i metabolizmu (Dang L., i in., 2016). Dehydrogenazy izocytrynianowe są kluczowymi enzymami metabolicznymi, które w cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA) przekształcają izocytrynian do alfaketoglutaranu (AKG) w reakcji oksydacyjnej dekarboksylacji (Nakrutenko A., i in., 1998). Rodzina IDH składa się z trzech izoenzymów, IDH1, IDH2 oraz IDH3, przy czym IDH2 i 3 występują w mitochondriach, natomiast IDH1 – w cytoplazmie komórki. Zmutowane enzymy IDH1 i IDH2 przekształcają AKG do onkometabolitu, D-2-hydroksyglutaranu (2-HG), w wyniku czego w komórce obniża się poziom AKG. Ponadto, nagromadzony w komórce 2-HG blokuje różnicowanie komórki poprzez kompetycyjne hamowanie dioksygenaz zależnych od AKG, które uczestniczą w demetylacji histonów i DNA (Dang L., i in., 2016).



Ryc. 1. Rola prawidłowych enzymów IDH w komórce i znaczenie ich mutantów w rozwoju nowotworu [Dang L., i in., 2016 – zmodyfikowany]

Somatyczne mutacje IDH1/2 wykryto w chrzestniakomiesaku, natomiast nie zaobserwowano ich w chondroblastycznym kostniakomięsaku (Kerr D., i in., 2013). Jednak badania przeprowadzone ostatnio wykazały, że również w OS często zdarzaja się mutacje IDH2 (Liu X., i in., 2013). Ponadto zaobserwowano, że prawidłowe komórki kości charakteryzują się wyższą ekspresją IDH1 w porównaniu z komórkami OS (Hu X., i in., 2014). Niska ekspresja IDH1 korelowała z OS o wysokim stopniu złośliwości oraz podwyższonym potencjałem przerzutowym. Wyższy 5-letni wskaźnik przeżycia stwierdzono w grupie o wysokiej ekspresji IDH1 w porównaniu z grupą o niskiej ekspresji enzymu (Hu X., i in., 2010; Liu D., i in., 2017). Wykazano także, że ekspresja IDH2 była obniżona w kostniakomiesaku o wysokim stopniu złośliwości. Podobny trend dotyczył zwiększenia przerzutów u pacjentów z niska ekspresją IDH2 (Yi W., i in., 2016). Ponadto, obniżenie poziomu IDH1 lub IDH2 wpływało pozytywnie na wzrost komórek, zwiększało proliferację, przerzuty oraz inwazję komórek OS (Hu X., i in., 2014; Yi W., i in., 2016). Przypuszcza się, że IDH1 i IDH2 mogą być zarówno potencjalnymi biomarkerami do oceny progresji nowotworu, jak i przewidywania ryzyka przerzutów

w kostniakomięsaku (Hu X., i in., 2010; Hu X., i in., 2014; Yi W., i in., 2016; Liu D., i in., 2017).

#### 2.7. Objawy, diagnostyka i leczenie kostniakomięsaka

U osób chorujących na kostniakomięsaka często występują niespecyficzne dolegliwości. Zwykle pierwszą oznaką choroby jest okresowy ból wokół miejsca dotkniętego zmianą nowotworową z lub bez wyczuwalnej masy. W przypadku występowania OS wokół stawu kolanowego, ból nasilający się przy obciążeniu może objawiać się jako utykanie. Ból może być zaostrzony przez aktywność ruchową, ale jest również obecny w spoczynku lub podczas snu. Nasilenie bólu bez wyraźnych oznak infekcji lub urazu jest szczególnie niepokojącym objawem. Pacjenci mogą zgłaszać także ograniczony ruch stawów. Szacuje się, że około 5 - 10% pacjentów wykazuje patologiczne złamanie jako pierwszą oznakę choroby (Widhe B. i Widhe T., 2000; Pan K., i in., 2010; Scully S., i in., 2002). Tradycyjne objawy związane z nowotworem, takie jak utrata masy ciała, złe samopoczucie oraz gorączka zwykle występują tylko w zaawansowanej chorobie i nie są specyficznymi objawami u dzieci (Dadia S. i Grimer R., 2007).

W diagnozowaniu, śledzeniu postępów oraz nawrotów choroby biomarkerami w surowicy są: alkaliczna fosfataza (ALP) użytecznymi i dehydrogenaza mleczanowa (LDH). Wykazano, że markery te dodatnio korelują z objętością guza. Pierwszym krokiem w diagnostyce jest wykonanie zdjęć rentgenowskich zmienionej kości i sąsiadującego stawu. Jeśli na zwykłych zdjęciach radiologicznych istnieją wystarczające dowody wskazujące na kostniakomięsaka, w celu lepszej oceny samego guza i poszukiwania miejsc przerzutów stosowane są następnie zaawansowane techniki obrazowania jądrowego, takie jak rezonans magnetyczny (MRI) i tomografia komputerowa (CT). Scyntygrafia kości jest często stosowana w połączeniu z CT w celu identyfikacji przerzutów, a obecność lub brak Z choroby przerzutowej pozostaje jednym najważniejszych czynników predykcyjnych wyniku pacjenta. Istnieje także dodatkowa technika obrazowania, jaką jest skanowanie metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET). Jednak w celu potwierdzenia rozpoznania, zawsze wymagana jest biopsja (Geller D. i Gorlick R., 2010; Limmahakhun S., i in., 2011; Lindsey B., i in., 2017; Moore D. i Luu H., 2014).

W standardowym leczeniu kostniakomięsaka wykorzystuje się obecnie neoadiuwantową chemioterapię, chirurgię, a następnie pooperacyjną chemioterapię adiuwantowa. Istnieje wiele różnych schematów chemioterapii OS, zawierających od dwóch do siedmiu leków (Geller D. i Gorlick R., 2010; Lindsey B., i in., 2017). Cztery leki wykazujące stałą aktywność wobec OS to: cisplatyna, doksorubicyna, metotreksat w wysokiej dawce z dodatkiem leukoworyny oraz izofosfamid z etopozydem lub bez niego. Wielolekowa chemioterapia MAP (metotreksat, doksorubicyna, cisplatyna) jest obecnie leczeniem pierwszego rzutu, zaliczanym do standardowej terapii (Anninga J., i in., 2011). Przed pojawieniem się chemioterapii OS był niemal powszechnie śmiertelną chorobą. Po odkryciu nowych leków cytotoksycznych, zaczęto stosować w leczeniu kostniakomięsaka chemioterapie wielolekową, która zwiększyła przeżywalność pacjentów dotkniętych tą chorobą z 11 do 61% (Durfee R., i in., 2016). Niezależnie od schematu chemioterapii, chirurgiczne usunięcie wszystkich zmian chorobowych pozostaje kluczowe dla uzyskania remisji i poprawy przeżycia pacjenta. W zależności od rozległości zmiany, wykonywany jest zabieg resekcji guza oszczędzający kończynę lub przeprowadza się amputację kończyny. Jeśli jest to możliwe, usuwa się również ewentualne przerzuty. Resekcja obejmuje wycięcie guza z szerokim marginesem zdrowej tkanki, co ma kluczowe znaczenie w zapobieganiu nawrotom (Bacci G., i in., 2006). Gdy nie jest możliwe osiągnięcie odpowiednich marginesów, rozważana jest amputacja kończyny (Lindsey B., i in., 2017; Grimer R., 2005). Historycznie, amputacja była uważana za niezbędną do kontrolowania miejscowej choroby. W ostatnich dziesięcioleciach uległo to zmianie dzięki postępowi w technikach chirurgicznych, umożliwiających uratowanie chorej kończyny (Grimer R., 2005; Marulanda G., i in., 2008). W leczeniu kostniakomiesaka stosowana jest również radioterapia, zalecana w przypadku nieoperacyjnych lub niecałkowicie usuniętych guzów (Oertel S., i in., 2010).

Chociaż chemioterapia znacząco poprawia rokowanie u pacjentów z nieprzerzutowym OS, osoby te często są zmuszone do zaprzestania i modyfikacji schematów chemioterapii z powodu lekooporności, toksyczności i/lub działań niepożądanych, obejmujących na przykład kardiotoksyczność, uszkodzenie nerek, nieprawidłową czynność wątroby, zapalenie błony śluzowej jamy ustnej oraz reakcje żołądkowo-jelitowe, takie jak nudności i wymioty. Ponadto chemioterapia nie jest w stanie skutecznie kontrolować przerzuty i progresję guza. Dlatego konieczne jest opracowanie nowatorskich środków i alternatywnych strategii zwalczania tej choroby nowotworowej, aby poprawić rokowania u chorych z nawrotowym, przerzutowym lub opornym na leczenie kostniakomięsakiem (Zhang Y., i in., 2018). Obiecującymi strategiami w leczeniu kostniakomiesaka być może błonowych zastosowanie inhibitorów receptorów immunomodulacja, kinaz tyrozynowych, inhibitorów szlaków wewnątrzkomórkowych, bisfosfonianów czy mikroRNA (Botter S., i in., 2014; Gill J., i in., 2013).

#### 3. Alfa-ketoglutaran

#### 3.1. Powstawanie i rola AKG

Kwas alfa-ketoglutarowy jest organicznym związkiem chemicznym, zawierającym dwie grupy karboksylowe i jedną ketonową. Z tego powodu określa się go mianem kwasu dikarboksylowego. Grupa karboksylowa tego związku ma właściwości kwasowe, natomiast grupa ketonowa wpływa na jego reaktywność. Inne nazwy tej cząsteczki to kwas 2-ketoglutarowy, 2-oksoglutaran, kwas 2-oksoglutarowy lub kwas 2-oksopentanodiowy (Filip R. i Pierzynowski S., 2007; Krebs H. i Johnson W., 1980).

Anion kwasu alfa-ketoglutarowego, czyli alfa-ketoglutaran jest ważnym metabolitem pośrednim w cyklu Krebsa (Ryc. 2). Cykl kwasów trikarboksylowych (TCA) jest szeregiem reakcji zachodzących w macierzy mitochondrialnej, w których utleniane są związki pochodzące z glukozy, aminokwasów i kwasów tłuszczowych, prowadząc do wytworzenia dwutlenku węgla oraz zredukowanych koenzymów -NADH i FADH<sub>2</sub>. Następnie koenzymy te wykorzystywane są w dostarczaniu elektronów do łańcucha oddechowego w celu wytworzenia ATP. W cyklu Krebsa, AKG powstaje w wyniku oksydacyjnej dekarboksylacji izocytrynianu przy udziale IDH, a następnie ulega oksydacyjnej dekarboksylacji katalizowanej przez dehydrogenazę alfa-ketoglutaranową (Krebs H. i Johnson W., 1980).



Ryc. 2. Cykl kwasów trikarboksylowych [opracowanie własne]

AKG jest kluczową cząsteczką w metabolizmie białek i aminokwasów, szczególnie glutaminy i glutaminianu (Wernerman J. i Hammarqvist F., 1999). W komórkach, glutamina metabolizowana jest do alfa-ketoglutaranu dwiema ścieżkami. Pierwszy szlak to proces zwany glutaminolizą, który składa się z dwóch etapów deaminacji. Najpierw, glutamina przy udziale enzymu glutaminazy jest przekształcana w glutaminian i amoniak (Cooper A. i Kuhara T., 2014). Glutaminian jest następnie przekształcany w sposób odwracalny do AKG w wyniku działania dehydrogenazy glutaminianowej w mitochondriach lub przez transaminowanie w celu wytworzenia aminokwasów w cytozolu lub mitochondriach (DeBerardinis R., i in., 2007). Alfa-ketoglutaran działa jako główny akceptor grup aminowych w transaminowaniu aminokwasów. Glutaminian może zostać również odwracalnie przekształcony w glutaminę za pomocą syntetazy glutaminowej. W drugim szlaku metabolizowania glutaminy, dochodzi do jej transaminowania przez transaminazę glutaminy, co prowadzi do powstania odpowiedniego  $\alpha$ -ketokwasu, a mianowicie  $\alpha$ -ketoglutaramatu. Związek ten jest następnie hydrolizowany przez  $\omega$ -amidazę,

w wyniku czego powstaje AKG i amoniak. Dzięki temu całkowicie usuwana jest z organizmu grupa aminowa (Cooper A. i Kuhara T., 2014; Grzesiak P., i in., 2016; Rajendram R., i in., 2015).

W związku z tym, że AKG jest ważnym produktem pośrednim w cyklu Krebsa, występuje głównie w komórkach (w mitochondriach i cytoplazmie). Wykrywany jest także w małych ilościach (ok. 25  $\mu$ M/l) w krwi (Martin M., i in., 1989; Rocchiccioli F., i in., 1984; Wagner B., i in., 2010). U osób powyżej 40 roku życia jego poziom w krwi stopniowo się obniża (Harrison A. i Pierzynowski S., 2008). Natomiast zwiększenie ilości AKG w krwi obserwowano u osób aktywnych fizycznie (Brugnara L., i in., 2012), a przy intensywnym treningu wysiłkowym jego poziom osiągał nawet 800  $\mu$ M/l (Leibowitz A., i in., 2012).

#### 3.2. Właściwości egzogennego AKG

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale, AKG jest produktem pośrednim w biosyntezie glutaminianu i glutaminy, które są bardzo ważne dla metabolizmu energetycznego. Te dwa aminokwasy odgrywają kluczową rolę w wielu szlakach metabolicznych i determinują prawidłowe funkcjonowanie nerek, jelita, wątroby, neuronów, komórek układu odpornościowego, a także komórek  $\beta$  trzustki (Newsholme P., i in., 2003).

AKG nie jest obecny w codziennej diecie człowieka, natomiast od wielu lat znajduje zastosowanie jako składnik wielu suplementów, w których występuje w połączeniu z różnymi aminokwasami (np. z argininą, ornityną) lub jako sól sodowa, potasowa czy wapniowa. Alfa-ketoglutaran jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, nie wykazuje właściwości toksycznych, a jego wodne roztwory charakteryzują się wysoką stabilnością (Filip R. i Pierzynowski S., 2007). Wykazano, że po doustnym podaniu, najbardziej intensywne wchłanianie alfaketoglutaranu ma miejsce w jelicie cienkim, natomiast najwolniej jest on wchłaniany w okrężnicy. Niskie pH, obecność jonów Fe<sup>2+</sup> i/lub SO4<sup>2-</sup> może zwiększać absorpcję AKG, który następnie jest metabolizowany w enterocytach (Dąbek M., i in., 2005; Buddington R., i in., 2004). Tylko 40% AKG ulega degradacji do CO<sub>2</sub> w błonie śluzowej jelit (Junghans P., i in. 2006). Reszta AKG może być wykorzystywana w różnych szlakach metabolicznych, zarówno w enterocytach, jak i w tkankach obwodowych. Około 20% dostarczonego AKG pojawia się w krwioobiegu (Filip R. i Pierzynowski S., 2008). W enterocytach AKG ulega przekształceniu w prolinę, leucynę i inne aminokwasy (Lambert B., i in., 2006). Alfa-ketoglutaran ulega szybkiej degradacji, prawdopodobnie zależne jest to od szybkiego metabolizmu w enterocytach i wątrobie (Dąbek M., i in., 2005).

Podobnie jak glutamina, AKG poprawia wzrost, rozwój i funkcję jelit, działając jako główne źródło energii i składnik struktur zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych (Hou Y., i in., 2010, 2011; Wu G., i in., 2011; Dai Z., i in., 2013). Wykazano, że dieta z 1% suplementacją AKG zwiększyła syntezę białek w błonie śluzowej jelita prosiąt poddanych działaniu LPS, złagodziła uszkodzenie błony śluzowej oraz zwiększyła funkcję absorpcyjną jelita cienkiego (Hou Y., i in., 2010). Wykazano ponadto, że AKG może zwiększać podaż ATP i wspomóc funkcję komórek jelitowych poprzez stymulację fosforylacji kinazy białkowej aktywowanej monofosforanem adenozyny i utlenianie substratów energetycznych (np. glukozy, aminokwasów, kwasów tłuszczowych) w błonie śluzowej jelit (Blachier F., i in., 2009; Burrin D. i Stoll B., 2009; Hou Y., i in., 2011).

AKG może zapobiegać katabolizmowi białek mięśniowych po operacji lub urazie, poprawiając w ten sposób bilans azotowy (Xiao D., i in., 2016). W badaniach klinicznych u pacjentów septycznych, pourazowych lub chirurgicznych stwierdzono, że AKG poprawia przyrost masy ciała oraz bilans azotowy (Wirén M., i in., 2002; Le Boucher J., i in., 1998). Niektóre badania donoszą również, że AKG jest skutecznym wsparciem żywieniowym w sytuacjach traumatycznych, szczególnie po oparzeniach. Z tego względu suplementacja AKG może być pomocna w leczeniu starszych pacjentów po urazach i zabiegach chirurgicznych (Wu N., i in., 2016).

Ponadto, AKG może służyć jako środek neutralizujący amoniak poprzez włączenie go do glutaminianu w wyniku działania enzymu dehydrogenazy glutaminianowej lub/i poprzez zmniejszenie utleniania glutaminianu i glutaminy oraz zmniejszenie wytwarzania mocznika, powodując w ten sposób detoksykację amoniaku (Xiao D., i in., 2016).

Dostarczenie AKG przy braku glutaminy zwiększa proliferację komórek, co wskazuje na kluczową rolę tego związku w proliferacji komórek (Salabei J., i in., 2015).

Oprócz tego, alfa-ketoglutaran zaangażowany jest w regulację metabolizmu lipidów. Bierze udział w tworzeniu karnityny, działającej jako nośnik kwasów

tłuszczowych w mitochondriach, gdzie może zachodzić odpowiedni katabolizm tłuszczów (Cooper A. i Kristal B., 1997; Hwu W., i in., 2000; Roe D., i in., 2000). Obniżenie poziomu AKG może powodować wzrost poziomu acetylokoenzymu A, a zatem kumulację poziomów profilu lipidowego (wolnych kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli, cholesterolu i fosfolipidów). Jednak efekt ten może zostać odwrócony dzięki suplementacji AKG (Velvizhi S., i in., 2002). Badania wykazały, iż podawanie AKG szczurom z indukowaną hipercholesterolemią obniżyło w krwi poziom cholesterolu całkowitego, lipoprotein niskiej gęstości (LDL) i trójglicerydów oraz zwiększyło stężenie lipoprotein wysokiej gęstości (HDL). Wyniki te wskazują, że AKG zmniejsza ryzyko rozwoju hipercholesterolemii, może obniżyć masę ciała oraz wywiera korzystny wpływ na regulację zawartości LDL i HDL w osoczu (Radzki R., i in., 2009).

Alfa-ketoglutaran charakteryzuje się również działaniem immunomodulacyjnym. AKG jako homolog glutaminy ma właściwości wzmacniające odporność, może utrzymywać barierę jelitową, zwiększać ilość komórek odpornościowych oraz aktywność neutrofili i fagocytozy, zmniejszać translokację bakterii *in vivo* (Wu N., i in., 2016).

Ponadto, AKG jest substancją przeciwutleniającą, która wykazuje istotną rolę w zmiataniu reaktywnych form tlenu (ROS) w organizmie (Mailloux R., i in., 2009). Wiele badań wskazuje, że AKG działa jako źródło energii i środek przeciwutleniający poprawiający fizjologiczny metabolizm i zmiatający ROS w celu złagodzenia stresu oksydacyjnego poprzez nieenzymatyczne oksydatywne dekarboksylowanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Liu S., i in., 2018). Co ciekawe, AKG jest uważany za naturalnego antagonistę zatrucia cyjankami. Ze względu na strukturę chemiczną jest on zdolny do wiązania cyjanku, w wyniku czego powstaje nietoksyczna cyjanohydryna (Bhattacharya R., i in., 2009; Tulsawani R., i in., 2007). W badaniach *in vitro* oraz w szczurzych modelach *in vivo* wykazano, że AKG zmniejsza uszkodzenia DNA wywołane cyjankiem (Bhattacharya R., i in., 2002).

Dodatkowo, suplementacja AKG ma pozytywny wpływ na rozwój szkieletu i utrzymywanie homeostazy (Kowalik S., i in., 2005). Alfa-ketoglutaran wykazuje anaboliczne działanie na tkankę kostną. W wyniku działania AKG może zachodzić zwiększone wytwarzanie kolagenu spowodowane wyższą syntezą proliny i jej dalszą hydroksylacją do hydroksyproliny (głównego składnika kolagenu) (Harrison A., i in., 2004; Tatara M., i in., 2012; Kristensen N., i in., 2002).

#### 3.3. Przeciwnowotworowe działanie AKG

Według danych literaturowych, AKG uczestniczy w regulacji procesów związanych z transformacją nowotworową oraz progresją nowotworu poprzez wpływ na funkcjonowanie enzymów modulujących aktywność czynnika indukowanego hipoksją (HIF) oraz modyfikujących DNA i histony (Vatrinet R., i in., 2017).

AKG jest jednym z ko-substratów dużej grupy enzymów, tzw. dioksygenaz zależnych od alfa-ketoglutaranu (2-OGDDs), które katalizuja reakcje hydroksylowania różnych substratów, m.in. białek, kwasów nukleinowych, lipidów czy metabolitów pośrednich. W reakcjach tych, jako drugi ko-substrat wykorzystywany jest tlen. Wymagana jest też obecność Fe (II) jako kofaktora (McDonough M., i in., 2010). W czasie reakcji hydroksylacji jeden z atomów tlenu uczestniczy w oksydatywnej dekarboksylacji AKG do bursztynianu i CO<sub>2</sub>. Następuje również utlenienie Fe (II) do Fe (IV). Aby przywrócić katalityczna aktywność dioksygenazy potrzebny jest kwas askorbinowy, który dostarczając elektrony redukuje Fe (IV) do Fe (II) (Pan Y., i in., 2007; Flashman E., i in., 2010).

Ważnymi enzymami należącymi do 2-OGDDs są hydroksylazy prolinowe (PHDs), które katalizuja hydroksylacje reszt proliny. PHDs reguluja m.in. aktywność czynnika transkrypcyjnego HIF, który odgrywa główną rolę w promowaniu kancerogenezy poprzez przeprogramowanie metabolizmu komórek nowotworowych, umożliwiające im przeżycie i dostosowanie się do zmienionego, bardzo stresującego mikrośrodowiska. Zmiany metaboliczne w komórkach nowotworowych polegają m.in. na zintensyfikowaniu glikolizy, zwiększeniu syntezy glikogenu i wykorzystaniu glutaminy (a nie glukozy) jako głównego substratu do syntezy kwasów tłuszczowych. To metaboliczne przeprogramowanie jest koordynowane na poziomie transkrypcyjnym przez czynnik transkrypcyjny HIF-1, który również indukuje ekspresję genów regulujących proces angiogenezy i proliferacji komórek (Semenza G., 2013). W komórkach ssaczych istnieją dwa typy HIF (HIF-1 i HIF-2), które są heterodimerami składającymi się z labilnej podjednostki  $\alpha$ , wrażliwej na poziom O<sub>2</sub> oraz stabilnej podjednostki β. Obie podjednostki ulegają konstytutywnej ekspresji, ale w warunkach prawidłowego stężenia tlenu (normoksji) czas półtrwania HIFa wynosi ok. 5 minut, natomiast poziom HIFB jest stały. W warunkach normoksji, reszty proliny znajdujące się w zależnej od tlenu domenie degradacji (ODD) HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  są hydroksylowane przez PHDs. Jak dotychczas zidentyfikowano trzy różne PHDs: PHD1, PHD2 oraz PHD3. Chociaż wszystkie trzy izoformy hydroksylują HIF-1 $\alpha$  *in vitro*, jednak *in vivo* główną rolę w regulacji tej podjednostki w warunkach normoksji odgrywa PHD2. Po hydroksylacji, do HIF-1 $\alpha$  przyłącza się białko Von Hippel Lindau (pVHL), które rekrutuje kompleks ligazy ubikwityny E3. Po ubikwitylacji HIF-1 $\alpha$  ulega szybkiej degradacji w proteasomie. W warunkach niedoboru tlenu lub przy zmniejszonych poziomach/braku kofaktorów, czyli AKG lub Fe<sup>2+</sup>, reakcja hydroksylacji z udziałem PHDs spowalnia lub zatrzymuje się, co powoduje akumulację HIF-1 $\alpha$  w cytoplazmie. Po translokacji do jądra komórkowego, HIF-1 $\alpha$  ulega dimeryzacji ze stabilną podjednostką HIF-1 $\beta$ , a dimer rozpoznaje i wiąże się z elementami odpowiedzi na hipoksję (HRE) w genomie (Kaelin W. i Ratcliffe P., 2008; Kaelin W., 2005; Schofield C. i Ratcliffe P., 2005; Loboda A., i in., 2010; Vatrinet R., i in., 2017).

HIF-1 może być również aktywowany przy normalnym dostępie tlenu, a zjawisko to jest określane jako pseudohipoksja. Stabilizacja podjednostki HIF-1α występuje np. w przypadku, gdy w komórce dochodzi do mutacji w genach enzymów cyklu Krebsa, które uczestniczą w metabolizmie AKG. Są to: dehydrogenaza bursztynianowa (SDH), hydrataza fumaranowa (FH) oraz IDH (Zdzisińska B., i in., 2017). W wyniku braku lub zmienionej aktywności tych enzymów, w komórkach dochodzi do akumulacji ich substratów, tj. bursztynianu, fumaranu lub 2-HG, które określane są jako onkometabolity (Morin A., i in., 2014). Wymienione związki są strukturalnymi analogami AKG, w związku z czym konkurują z AKG o wiązanie z PHD2. Po związaniu z enzymem hamują jego aktywność, co z kolei przyczynia się do stabilizacji HIF-1a i aktywacji genów promujących kancerogenezę (Morin A., i in., 2014; Dang L., i in., 2009; Schaap F., i in., 2013; Zdzisińska B., i in., 2017). Według danych literaturowych zarówno zmniejszenie ilości AKG, jak i zwiększenie ilości 2-HG może zahamować aktywność PHD2 i aktywować HIF-1 (Xu W., i in., 2011; Zhao S., i in., 2009). Z drugiej strony akumulacja AKG może mieć odwrotny skutek i prowadzić raczej do konstytutywnej destabilizacji HIF-1α. Badania wykazały, że zwiększenie stężenia AKG w komórce może zahamować aktywację HIF-1α indukowaną nagromadzeniem bursztynianu, fumaranu czy hipoksją. Prowadzi to do odwrócenia wzmożonej glikolizy i śmierci komórki (Tennant D., i in., 2009; Vatrinet R., i in., 2017).

Jak już wspomniano AKG uczestniczy również w regulacji procesów epigenetycznych. Modyfikacje epigenetyczne, czyli zmiany bez modyfikowania sekwencji DNA, odgrywają istotną rolę w regulacji procesów takich jak transkrypcja, naprawa czy replikacja DNA. Modyfikacje potranslacyjne są ważne w organizacji struktury chromatyny. Utrzymują równowagę pomiędzy aktywną transkrypcyjnie chromatyną luźną (euchromatyną), a nieaktywną chromatyną skondensowaną (heterochromatyną). Do podstawowych procesów, które regulują strukturę i funkcję chromatyny należy metylacja DNA oraz potranslacyjna modyfikacja histonów, polegająca na dołączeniu określonych grup funkcyjnych do cząsteczki białka. Histony mogą m.in. ulegać acetylacji, metylacji, fosforylacji, ubikwitylacji, biotynylacji czy sumoilacji. Metylacja DNA jest jedną z najwcześniejszych modyfikacji epigenetycznych u ludzi. Jest to rodzaj modyfikacji po replikacji, która często występuje w cytozynach sekwencji dinukleotydowej CpG pomoca metylotransferaz DNA, które przenoszą grupe metylowa za z S-adenylometioniny do piątego węgla reszty cytozyny tworząc 5-metylocytozynę (5mC). Metylacja DNA jest kluczowa modyfikacją epigenetyczną genomu, która bierze udział w regulacji wielu procesów komórkowych. Obejmują one rozwój embrionalny, transkrypcję, strukturę chromatyny, inaktywację chromosomu X, imprinting genomowy i stabilność chromosomów. Wiele różnych enzymów, w tym metylotransferazy i demetylazy, katalizuje dołączanie lub odłączanie określonych reszt funkcyjnych do odpowiednich aminokwasów lub nukleotydów (Meng H., i in., 2015; Gräff J. i Mansuy I., 2008; Jin Z. i Liu Y., 2018; Robertson K., 2005). Zmiany epigenetyczne zarówno na poziomie DNA, jak i białek histonowych są coraz częściej uznawane za modyfikatory procesów nowotworzenia, ponieważ modyfikacje w poziomie ekspresji czynników regulujących procesy epigenetyczne lub zmiany genomiczne w tych czynnikach mogą przyczyniać się do indukcji lub podtrzymania rozwoju różnych nowotworów (Feinberg A., i in., 2016; Dawson M. i Kouzarides T., 2012). Wyspy CpG sa powszechnie hipermetylowane w wielu typach nowotworów i przeważnie jest to związane z gorszymi rokowaniami, zazwyczaj z powodu wyciszenia genów supresorowych guza (Christensen B., i in., 2009). AKG i jego strukturalne analogi (bursztynian, fumaran i 2-HG) mogą regulować poziom metylacji DNA i histonów, ponieważ dwie klasy enzymów zaangażowanych w reakcje demetylacji i hydroksylacji DNA i histonów należą do rodziny 2-OGDDs (Hoffmann I., i in., 2012). Hydroksylazy TET 1-3 katalizują demetylację DNA

poprzez hydroksylację 5-metylocytozyny (5mC) do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC), podczas gdy największa rodzina demetylaz histonów, demetylazy lizynowe zawierające domenę Jumonji C (KDM 2-7) usuwają grupy metylowe z prawie wszystkich znanych miejsc metylowania w histonach i mogą także katalizować demetylację trzech metylowanych lizyn i arginin (Ito S., i in., 2010; Adam J., i in., 2014; Loenarz C. i Schofield C., 2011; Kaelin W. i McKnight S., 2013; Hoffmann I., i in., 2012). Bursztynian, fumaran i 2-HG działają jako konkurencyjne inhibitory enzymów KDM oraz TET i mogą indukować zmiany w metylacji DNA i histonów, przyczyniając się w ten sposób do kancerogenezy (Schaap F., i in., 2013; Sciacovelli M., i in., 2016; Xiao M., i in., 2012; Xu W., i in., 2011; Vatrinet R., i in., 2017).

Wyniki badań (nielicznych jak dotychczas) przeprowadzonych nad przeciwnowotworową aktywnością AKG sugerują, że związek ten może być obiecującym czynnikiem chemioterapeutycznym lub/i chemoprewencyjnym. W jednym z najwcześniejszych doniesień literaturowych na ten temat wykazano, że sól ornitynowa AKG zwiększała aktywność cytostatyczna makrofagów i cytotoksyczność komórek NK u szczurów z indukowanym nowotworem (Robinson L., i in., 1999). Z kolei badania in vitro (w komórkowym modelu raka wątroby) oraz *in vivo* (w modelu raka płuca Lewisa), przeprowadzone przez badaczy japońskich wykazały, że egzogenny AKG wykazuje zdolność do hamowania angiogenezy w wyniku indukowania degradacji podjednostki HIF-1 $\alpha$  i zmniejszenia syntezy VEGF, co przyczynia się do zahamowania wzrostu nowotworu (Matsumoto K., i in., 2006; Matsumoto K., i in., 2009). Ponadto, wyniki badań przeprowadzonych przez Brière i in. (2005) oraz MacKenzie i in. (2007) sugerują, że AKG może być szczególnie przydatny w leczeniu nowotworów, w których występują mutacje w genach enzymów cyklu Krebsa. Wykazano np., że egzogenny AKG zapobiegał translokacji podjednostki HIF-1 $\alpha$  do jadra w fibroblastach, w których wystepowała mutacja genu dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) (Brière J., i in., 2005). Ponadto, AKG zastosowany w formie estrów przywracał aktywność PHDs w komórkach z defektem genu SDH, co skutkowało obniżeniem poziomu HIF-1a (MacKenzie E., i in., 2007). Wykazano również, że przywrócenie aktywności PHDs w komórkach nowotworowych, w warunkach hipoksji powoduje nie tylko destabilizację podjednostki HIF-1a, ale indukuje również zmiany funkcjonalne w tych komórkach w postaci zahamowania procesu glikolizy i śmierci komórek
(Tennant i in., 2009). Przeciwnowotworowe działanie AKG zaobserwowano również w warunkach prawidłowego poziomu tlenu. Rzeski i in. (2012) wykazali, że AKG hamuje progresję cyklu komórkowego i proliferację komórek w komórkowym modelu raka jelita grubego. Warto wspomnieć, że preparat nazwany KARAL® (podawany w postaci roztworu do infuzji dożylnej), zawierający AKG w połączeniu z 5-hydroksymetylofurfuralem, N-acetylo-selenometioniną oraz N-acteylo-metioniną jest obecnie w fazie badań klinicznych, w których wykorzystywany jest do leczenia pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, nieodpowiadających na żadną konwencjonalną terapię (Donnarumma F., i in., 2013).

## **III.** Cel pracy

Według danych literaturowych w kostniakomięsaku mogą występować mutacje w genach *IDH* oraz odnotowuje się zmniejszoną ekspresję enzymu IDH przekształcającego izocytrynian do AKG. Może to skutkować obniżonym poziomem mobilnego AKG w komórkach OS i rozregulowaniem ich metabolizmu. Wykazano, że zwiększenie ekspresji IDH w komórkach OS *in vitro* i *in vivo* wywierało efekt przeciwnowotworowy poprzez zahamowanie proliferacji, migracji i inwazyjności komórek kostniakomięsaka. W związku z powyższym w niniejszych badaniach założono, że dostarczenie komórkom egzogennego AKG może wywoływać podobny efekt. W celu potwierdzenia tej hipotezy w pracy oceniano aktywność przeciwnowotworową AKG *in vitro* w modelu komórkowym ludzkiego kostniakomięsaka. Doświadczenia wykonywano z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych ludzkiego kostniakomięsaka: Saos-2 i HOS.

W pracy analizowano następujące aspekty badawcze:

- wpływ szerokiego zakresu stężeń AKG na żywotność komórek prawidłowych (fibroblastów skóry ludzkiej oraz ludzkich osteoblastów) w celu wybrania do dalszych badań nietoksycznych stężeń związku,
- wpływ AKG na proliferację komórek nowotworowych,
- wpływ wybranych stężeń AKG na przebieg cyklu komórkowego oraz na poziom ekspresji białek związanych z cyklem komórkowym – cykliny D1 oraz inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 w komórkach kostniakomięsaka,
- zdolność AKG do indukcji apoptozy w komórkach kostniakomięsaka wpływ na aktywację kaspaz: -8, -9, -3 oraz ekspresję białek związanych z apoptozą: Bax i Bcl-2,
- zdolność AKG do modulowania poziomu fosforylacji kinaz MAP oraz kinazy białkowej Akt w komórkach linii Saos-2,
- wpływ wybranych stężeń AKG na poziom produkcji VEGF oraz TGF-β przez komórki kostniakomięsaka,
- wpływ wybranych stężeń AKG na migrację i inwazyjność komórek kostniakomięsaka.

## IV. Materiały

## 1. Alfa ketoglutaran

Jako źródło AKG, w badaniach używano dwuwodną sól disodową kwasu alfa-ketoglutarowego (Na<sub>2</sub>AKG x 2H<sub>2</sub>O), zakupioną w Sigma-Aldrich. Substancję rozpuszczano w odpowiednim dla danej linii komórkowej płynie hodowlanym, przygotowując wyjściowy roztwór o stężeniu 1 M, po czym jałowiono ją poprzez przesączenie przez sączek o średnicy porów 0,22 µm. Roztwór AKG przygotowywano do eksperymentów za każdym razem na świeżo, a pożądane stężenia związku otrzymywano poprzez rozcieńczenie wyjściowego roztworu AKG płynem hodowlanym.

## 2. Płyny odżywcze do hodowli komórkowej

- podłoże Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12), Sigma-Aldrich
- podłoże Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham bez czerwieni fenolowej (DMEM/F12 w/o PhR), Sigma-Aldrich
- podłoże Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Sigma-Aldrich
- podłoże McCoy's 5A Medium, Sigma-Aldrich
- płodowa surowica bydlęca (fetal bovine serum, FBS), inaktywowana termicznie, PAN-Biotech

## 3. Antybiotyki

- gentamycyna (G418, 50 mg/ml), Sigma-Aldrich
- roztwór antybiotyków (antibiotic/antimycotic, A/A) (10 mg streptomycyny, 10000 U penicyliny i 25 μg amfoterycyny B/ml), Sigma-Aldrich

## 4. Linie komórkowe

Saos-2 – linia komórkowa ciągła ludzkiego kostniakomięsaka, o numerze katalogowym HTB-85<sup>TM</sup>, pochodząca z amerykańskiej kolekcji linii komórkowych (ATCC; American Type Culture Collection Manassas, VA, USA). Komórki linii Saos-2 hodowano w temperaturze 37°C i atmosferze

z 5% przepływem CO<sub>2</sub>, w płynie hodowlanym McCoy's 5A, z dodatkiem 10% FBS oraz 1 ml/100 ml płynu roztworu A/A.

- HOS linia komórkowa ciągła ludzkiego kostniakomięsaka, o numerze katalogowym CRL-1543<sup>TM</sup>, pochodząca z ATCC. Hodowlę prowadzono w podłożu EMEM z dodatkiem 10% FBS oraz 1 ml/100 ml płynu roztworu A/A, w temperaturze 37°C i atmosferze z 5% CO<sub>2</sub>.
- hFOB 1.19 transformowana linia komórkowa prawidłowych osteoblastów człowieka, pochodząca z ATCC, o numerze katalogowym CRL-11372<sup>TM</sup>, hodowana w podłożu DMEM/F12 w/o PhR, w temperaturze 34°C i atmosferze z 5% CO<sub>2</sub>. Płyn wzrostowy uzupełniano dodatkiem 10% FBS, 0,3 mg/ml G418 oraz 2,5 mM L-glutaminy. Linia hFOB 1.19 jest transfekowana antygenem T wirusa SV40.
- HSF prawidłowe fibroblasty skóry ludzkiej, wyprowadzone w Zakładzie Wirusologii i Immunologii UMCS z fragmentów skóry ludzkiej. Komórki hodowano w temperaturze 37°C i atmosferze z 5% CO<sub>2</sub>, w płynie hodowlanym DMEM/F12 z dodatkiem 10% FBS oraz 1 ml/100 ml płynu roztworu A/A.

### 5. Odczynniki

- akrylamid/bisakrylamid, Sigma-Aldrich
- bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolylo)-2,5-difenylotetrazolowy (MTT), Sigma-Aldrich
- chlorek sodu (NaCl), POCH Gliwice
- dimetylosulfotlenek (DMSO), Sigma-Aldrich
- dwusiarczan amonu (APS), Fisher Scientific
- etanol, POCH Gliwice
- fluorek sodu (NaF), Sigma-Aldrich
- fluorek fenylometanosulfonylu (PMSF), Sigma-Aldrich
- glicyna, Sigma-Aldrich
- H<sub>2</sub>O redestylowana (MiliQ), Zakład Wirusologii i Immunologii UMCS w Lublinie
- jodek propidyny/RNAaza, BD Pharmingen
- kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), Sigma-Aldrich

- kwas solny (HCl), POCH Gliwice
- L-glutamina, Sigma-Aldrich
- marker białkowy do elektroforezy Precision Plus Protein<sup>™</sup> Dual Color Standards, Bio-Rad
- metanol, POCH
- mleko odtłuszczone, Rovema Gliwice
- N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), Sigma-Aldrich
- siarczan dodecylu sodu (SDS), Sigma-Aldrich
- trizma base (Tris-HCl), Sigma-Aldrich
- tween 20, ICN Biomedicals Inc.
- wanadan sodu (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), Sigma-Aldrich
- β-merkaptoetanol, MP Biomedicals
- 0,25% roztwór trypsyny w EDTA bez czerwieni fenolowej, PAN-Biotech
- 0,25% roztwór trypsyny w EDTA, Sigma-Aldrich

## 6. Bufory i żele

- bufor do cytometru BD FACS Flow, BD Biosciences
- bufor do czyszczenia cytometru BD FACS Clean, BD Biosciences
- bufor do elektroforezy pH 8,3 (5x stężony) (Tris-HCl 7,5 g; glicyna do elektroforezy 36 g; SDS 2,5 g; woda redestylowana do 0,5 l)
- bufor do elektrotransferu półsuchego pH 8,1 (25 mM Tris-HCl 5,8 g; 39 mM glicyna 2,93 g; 20% metanol 200 ml; woda redestylowana do 1 l)
- bufor lizujący RIPA, Sigma-Aldrich + 0,5% mieszaniny inhibitorów proteaz, Sigma-Aldrich
- bufor próbkowy do elektroforezy (4x stężony), BioRad + 10%
  β-merkaptoetanol
- bufor TBS pH 7,4 (10x stężony) (2 M Tris-HCl 25 ml; 0,75 mM NaCl 43,8 g; woda redestylowana do 0,5 l)
- bufor TBS-T pH 7,4 (bufor TBS 1x stężony; 0,1% Tween 20)
- bufory do żeli:
  - ✓ 1 M Tris-HCl pH 6,8
  - ✓ 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

- zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) z jonami wapnia i magnezu, BioMaxima, Lublin
- PBS bez jonów wapnia i magnezu, BioMaxima, Lublin
- żel separujący (10%): woda dejonizowana (9,9 ml); 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (6 ml); akrylamid/bisakrylamid 30% (7,95 ml); 10% APS (120 μl); 20% SDS (120 μl) TEMED (12 μl)
- żel zagęszczający: woda dejonizowana (5 ml); 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (2,5 ml); akrylamid/bisakrylamid 30% (1,5 ml); 10% APS (40 μl); 20% SDS (50 μl); TEMED (20 μl)

## 7. Przeciwciała

- królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko β-aktynie (I-rzędowe), Santa Cruz Biotechnology
- mysie przeciwciała poliklonalne przeciwko kaspazie-9 (I-rzędowe), Santa Cruz Biotechnology
- mysie przeciwciała poliklonalne przeciwko kaspazie-8 (I-rzędowe), Santa Cruz Biotechnology
- mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko białku Bcl-2 (I-rzędowe), Santa Cruz Biotechnology
- królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko białku Bax (I-rzędowe), Santa Cruz Biotechnology

## 8. Zestawy dostępne komercyjnie

- mieszanina inhibitorów proteaz: Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich
- mieszanina inhibitorów fosfataz 2: Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, Sigma-Aldrich
- mieszanina inhibitorów fosfataz 3: Phosphatase Inhibitor Cocktail 3, Sigma-Aldrich
- zestaw do oznaczania stężenia białka: Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific
- zestaw do oznaczania proliferacji komórek: Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric), Roche

- zestaw do oznaczania cytotoksyczności substancji: *In Vitro* Toxicology Assay Kit Lactate Dehydrogenase Based (LDH), Sigma-Aldrich
- zestaw do wizualizacji reakcji immunoblottingu: Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System, GE Healthcare
- zestaw do oznaczania apoptozy i nekrozy: FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II Part A, BD Pharmingen
- zestaw do oznaczania aktywnej kaspazy-3: PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit, BD Pharmingen
- zestaw do oznaczania aktywnej kaspazy-9: CaspaTag<sup>™</sup> Caspase-9 In Situ Assay Kit, Merck
- zestaw do oznaczania aktywnej kaspazy-8: CaspaTag<sup>™</sup> Caspase-8 In Situ Assay Kit, Merck
- zestaw do oznaczania inwazyjności: CultreCoat® 24 Well Low BME Cell Invasion Assay, Trevigen
- zestawy ELISA (Cell Signaling Technology, USA) do oznaczania: kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK) tj. ERK1/2, JNK, p38; kinazy białkowej Akt (PKB); cykliny D1 oraz inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 w lizatach komórkowych:
  - PathScan® Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Sandwich ELISA Kit
  - > PathScan® Total p44/42 MAPK (Erk1/2) Sandwich ELISA Kit
  - PathScan® Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Sandwich ELISA Kit
  - > PathScan® Total SAPK/JNK Sandwich ELISA Kit
  - PathScan® Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Sandwich ELISA Kit
  - PathScan® Phospho-Akt 1 (Ser473) Sandwich ELISA Kit
  - > PathScan® Phospho-Akt (Thr308) Sandwich ELISA Kit
  - > PathScan® Total Akt 1 Sandwich ELISA Kit
  - > PathScan® Total Cyclin D1 Sandwich ELISA Kit
  - > PathScan® Total p21 Waf1/Cip1 Sandwich ELISA Kit
  - > P38 MAPK (Total) Human ELISA Kit (Abcam, Cambridge, UK)

- Zestawy ELISA do oznaczania VEGF i TGF-β w płynach hodowlanych:
  - Human VEGF-A ELISA Kit, Diaclone SAS
  - > TGF- $\beta$ 1 ELISA, DRG International

## 9. Sprzęt laboratoryjny

- ampułki do zamrażania CryoTube Vials, Thermo Scientific
- aparat do elektroforezy Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad
- aparat do elektrotransferu półsuchego Trans-Blot® SD Cell, Bio-Rad
- bank komórek w ciekłym azocie 35VHC, Taylor-Wharton
- bibuła do transferu (filler blot paper), Bio-Rad
- butelki hodowlane 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, Nunc, Thermo Scientific
- cytometr przepływowy FASC Calibur, BD Bioscientific
- czytnik spektrofotometryczny EL800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments
- czytnik spektrofotometryczny VICTOR X4, BioAnalytic, PerkinElmer
- inkubator do hodowli komórkowych (z temperaturą 34°C i 5% przepływem CO<sub>2</sub>) Smart Cell, Heal Force
- inkubator do hodowli komórkowych (z temperaturą 37°C i 5% przepływem CO<sub>2</sub>) Hera Cell, Thermo Scientific
- kołyska laboratoryjna KL-942, JW Electronic
- komora laminarna HERA Safe, Thermo Scientific
- komora Thoma, Marienfeld
- końcówki do pipet automatycznych epT.I.P.S.® Standard, o pojemności: 0,1 -20 μl; 2 - 200 μl; 50 - 1000 μl, Eppendorf
- membrana do transferu Immobilon®-P, Merck Millipore Corporation
- mikroskopy świetlne odwróconego pola: Olympus CK30, Olympus CKX41 z kamerą Olympus SC30, Olympus Optical Co. LTD, Tokio, Japan
- pH-metr, Toledo AG, Mettler Toledo
- pipetor automatyczny accu-jet® pro, Brand
- pipety automatyczne Eppendorf Reference® 2: jednokanałowe o pojemności: 0,5 - 10 μl, 10 - 100 μl, 100 - 1000 μl oraz ośmiokanałowa o pojemności 30 -300 μl, Eppendorf
- pipety szklane 1, 2, 5, 10, 25 ml, Nunc, Roskilde, Denmark

- plastikowe płytki 6, 24 i 96-dołkowe płaskie, Nunc, Thermo Scientific
- plastikowe płytki Petriego (3,5 cm), Nunc
- plastikowe płytki Petriego (10 cm), Corning
- probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 i 2 ml, Eppendorf
- probówki do cytometru, polistyrenowe, 5 ml, Falcon
- probówki wirówkowe o pojemności: 15 ml, 50 ml, Falcon
- sączki strzykawkowe Millex-GV, 0,22 μm, PVDF, 33 mm, jałowe, Merck Millipore Corporation
- skrobaczka do komórek (Cell Scraper 3010), Corning Incorporated
- strzykawki jałowe jednorazowego użytku BD Discardit<sup>™</sup> II, 2 ml; 5ml, Becton Dickinson
- system do dokumentacji żeli ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad
- system do otrzymywania ultraczystej wody Mili-Q, Merck Millipore Corporation
- szkło laboratoryjne: kolby, kolumny, probówki, szalki Petriego, zlewki
- vortexer BR-2000, Bio-Rad
- waga laboratoryjna XA 220, RADWAG
- wirówka Centrifuge 5810 R, Eppendorf
- zamrażarka niskotemperaturowa 902 (-80°C), Thermo Scientific
- zasilacz do elektroforezy PowerPAC 2000, Bio-Rad

## V. Metody

### 1. Przygotowanie hodowli komórkowych

Przechowywane w banku tkanek, w ciekłym azocie, komórki linii hFOB 1.19, HSF, Saos-2 i HOS rozmrażano w temp. 34°C (linia hFOB 1.19) lub 37°C (pozostałe linie) i przenoszono do butelek plastikowych (25 cm<sup>2</sup>) z właściwym podłożem wzrostowym. Następnie naczynia hodowlane umieszczano w inkubatorze, w odpowiedniej dla danej linii komórkowej temperaturze. Po 24-godzinnej inkubacji oraz przyklejeniu się komórek do dna naczynia, usuwano podłoże znad hodowli i przepłukiwano ją roztworem PBS z jonami Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> w celu usunięcia resztek użytego do zamrażania DMSO. Po dodaniu świeżego podłoża odżywczego, hodowle umieszczano w inkubatorze i hodowano do momentu pokrycia przez komórki całego dna naczynia, po czym pasażowano je lub wykorzystywano do przygotowania eksperymentu. W tym celu, płyn hodowlany usuwano, komórki płukano PBS bez jonów  $Ca^{2+}$  i Mg<sup>2+</sup>, a następnie 0,25% roztworem trypsyny w 0,02% EDTA, po czym umieszczano hodowle w inkubatorze do momentu odklejenia się komórek od dna naczynia. Komórki zawieszano następnie we właściwym dla danej linii podłożu i określano ich gęstość wykorzystując do tego celu komorę Thoma. Zawiesinę komórek o odpowiedniej gestości sporządzano poprzez rozcieńczenie jej płynem wzrostowym.

### 2. Określanie toksyczności AKG – test LDH

Test LDH (ang. *Lactate Dehydrogenase*) polega na ilościowym pomiarze aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) – enzymu cytozolowego, który jest uwalniany do podłoża hodowlanego z komórek posiadających uszkodzoną błonę komórkową. Test przeprowadza się w nadsączu z hodowli adherentnej, do którego dodaje się mieszaninę reakcyjną, a reakcje enzymatyczne przebiegają w dwóch etapach. W pierwszym z nich, obecna w nadsączu LDH katalizuje przekształcenie mleczanu do pirogronianu, przenosząc H<sup>+</sup> z mleczanu na NAD<sup>+</sup>, w wyniku czego powstaje NADH/H<sup>+</sup>. W następnym etapie, dzięki działaniu diaforazy H<sup>+</sup> z NADH/H<sup>+</sup> przenoszony jest na sól tetrazolową, która ulega redukcji do purpurowego formazanu. Natężenie barwy nadsączu, odzwierciedlające ilość utworzonego

formazanu, jest wprost proporcjonalne do ilości uwolnionej z komórek LDH i wskazuje na ilość komórek z uszkodzoną błoną komórkową. Pomiar spektrofotometryczny absorbancji umożliwia ocenę wpływu badanej substancji na żywotność komórek.

Toksyczność AKG oceniano względem prawidłowych komórek dwóch linii, HSF i hFOB 1.19. Przygotowaną zawiesinę komórek danej linii (we właściwym podłożu wzrostowym, z dodatkiem 10 % FBS) o gestości 1 x 10<sup>5</sup> kom./ml rozlewano po 100 µl do 96-dołkowych płytek z płaskim dnem i inkubowano przez 24 godziny w standardowych dla każdej linii warunkach. Następnie podłoże wzrostowe usuwano, a do dołków dodawano kolejne rozcieńczenia AKG (2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 mM) w podłożu z dodatkiem 1% (w przypadku linii hFOB 1.19) lub 2% (HSF) FBS, w ilości 100 µl/dołek. Na płytce przygotowywano również kontrolę żywotności komórek, w postaci dołków z hodowla, do których dodawano sam płyn hodowlany z dodatkiem 2% lub 1% FBS. W ten sposób sporządzoną płytkę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze właściwej dla danej linii komórkowej, a następnie z każdego dołka zbierano płyn hodowlany i przenoszono go na świeżą płytkę 96-dołkową. Test przeprowadzano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu In Vitro Toxicology Assay Kit Lactate Dehydrogenase Based, według instrukcji producenta. Następnie w czytniku spektrofotometrycznym EL800 Universal Microplate Reader mierzono absorbancje przy długości fali  $\lambda = 450$  nm.

### 3. Określanie żywotności/proliferacji komórek

#### 3.1. Test MTT

Metoda ta często używana jest do oceny żywotności i proliferacji komórek poddanych działaniu różnych substancji. Jej zasada opiera się na redukcji rozpuszczalnej w wodzie, żółtej soli tetrazolowej (MTT; bromek-3[4,5dwumetylotiazylo-2-yl]-2,5-dwufenylotetrazolu) do purpurowego formazanu przez enzym mitochondrialny, dehydrogenazę bursztynianową, aktywną jedynie w komórkach metabolicznie czynnych (żywych). W wyniku reakcji, w komórkach gromadzą się nierozpuszczalne w wodzie kryształy formazanu, które następnie rozpuszcza się stosując detergenty (np. SDS) niszczące błonę komórkową i rozpuszczające barwnik. Intensywność zabarwienia uwolnionego formazanu mierzona jest spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 570$  nm i jest wprost proporcjonalna do ilości żywych, aktywnych metabolicznie komórek.

Zawiesinę komórek linii Saos-2 lub HOS (we właściwym podłożu wzrostowym, z dodatkiem 10 % FBS) o gęstości 4 x 10<sup>4</sup> kom./ml rozlewano po 100 µl do 96-dołkowych płytek z płaskim dnem i inkubowano przez 24 godziny w standardowych dla obydwu linii warunkach. Następnie podłoże znad hodowli usuwano, a do dołków dodawano po 100 µl roztworu AKG w podłożu wzrostowym (z 10% FBS) o stężeniu: 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 oraz 200 mM. Jeden szereg dołków w płytce, do którego nie rozlewano zawiesiny komórek, wypełniano jedynie płynem hodowlanym (po 100 µl/dołek), aby przygotować blank. Przygotowywano również rząd dołków stanowiących kontrolę proliferacji komórek, do których dodawano podłoże wzrostowe (z 10% FBS) bez dodatku AKG. W ten sposób sporządzoną płytkę inkubowano przez 96 godzin w temperaturze 37°C, po czym do każdego dołka dodawano po 20 µl roztworu MTT (o końcowym stężeniu 5 mg/ml w PBS z jonami  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ ) i ponownie wstawiano płytke do inkubatora. Po 3-godzinnej inkubacji, do każdego dołka dodawano po 100 µl 10% roztworu SDS w 0.01 N HCl o pH 7.5. Płytkę po raz kolejny umieszczono w inkubatorze i po 24 godzinach dokonywano pomiaru absorbancji w czytniku spektrofotometrycznym EL800 Universal Microplate Reader przy długości fali  $\lambda = 570$  nm.

#### 3.2. Test BrdU

Test ten służy do oceny proliferacji komórek przy pomocy analogu tyminy -5-bromo-2-deoksyurydyny (BrdU), dodawanej do podłoża hodowlanego. W czasie podziałów komórek, BrdU wbudowuje się do nowo syntetyzowanej nici DNA. Po utrwaleniu komórek i permeabilizacji błony komórkowej, BrdU wykrywa się przy użyciu przeciwciał monoklonalnych znakowanych aktywnym enzymem, np. peroksydazą chrzanową (HRP). Przeciwciała te przyłączają się do miejsc z wbudowaną BrdU, natomiast sprzężony z nimi enzym przekształca dodawany bezbarwny substrat (TMB-tetrametylbenzydynę) w produkt o niebieskiej barwie, który po zatrzymaniu reakcji (np. słabym roztworem kwasu siarkowego) przybiera barwę żółtą. Natężenie zabarwienia jest wprost proporcjonalne do poziomu syntezy DNA w dzielących się komórkach. Doświadczenie przygotowywano w analogiczny sposób do opisanego w metodzie MTT. Po 48 godzinach inkubacji komórek linii Saos-2 lub HOS z odpowiednimi rozcieńczeniami AKG, wykonywano oznaczenie przy pomocy zestawu Cell Proliferation ELISA BrdU, zgodnie z instrukcją producenta. Następnie mierzono absorbancję w czytniku spektrofotometrycznym EL800 Universal Microplate Reader przy długości fali  $\lambda = 450$  nm.

### 4. Analiza cyklu komórkowego

Aby zbadać wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego zastosowano barwienie (utrwalonych wcześniej) komórek jodkiem propidyny (PI) z RNAzą (PI/RNase Staining Buffer, Roche). W metodzie tej, PI wnika do komórki przez uszkodzone błony i ma zdolność wbudowywania się do dwuniciowego DNA dając sygnał fluorescencyjny przy odpowiednim wzbudzeniu. PI może również wbudowywać się do dwuniciowego RNA, dlatego komórki traktuje się RNAzą (strawienie RNA). Ilość przyłączonego w komórce PI koreluje z ilością DNA, a zatem pozwalała na ocenę ilościową komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

Do płytek 6-dołkowych rozlewano po 2 ml zawiesiny komórek linii Saos-2 lub HOS (w odpowiednim podłożu wzrostowym, z dodatkiem 10 % FBS) o gestości 5 x  $10^5$  kom./ml i inkubowano przez 24 godziny w standardowych warunkach. Po tym czasie, podłoże znad hodowli usuwano i zastępowano je kolejnymi rozcieńczeniami AKG (w podłożu z dodatkiem 10% FBS), w ilości 2 ml/dołek. W eksperymencie używano AKG w stężeniach: 10, 25 i 50 mM, które wybrano w oparciu o wyniki testu toksyczności dla komórek prawidłowych (nietoksyczne stężenia). Na płytce sporządzano również kontrolę komórek, do której dodawano podłoże (z dodatkiem 10% FBS) bez dodatku AKG. Następnie płytkę inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C. Po tym czasie płyn znad hodowli usuwano, komórki przemywano PBS bez jonów  $Ca^{2+}$  i Mg<sup>2+</sup> i do każdego dołka dodawano po 1 ml EDTA (5 mM w PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>), aby odkleić komórki od dna płytki. Zawiesinę komórek zbierano do probówek wirówkowych, odwirowywano (1500 obrotów/min., 5 min.), osad utrwalano w lodowatym 70% etanolu i umieszczano w temperaturze -20°C. Po 24 godzinach komórki odwirowywano, usuwano etanol i osad przepłukiwano stosując PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>.

Następnie do osadu komórek dodawano 750 µl mieszaniny PI z RNAzą i inkubowano przez 10 minut w ciemności, po czym wykonywano oznaczenia przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur (BD Biosciences).

### 5. Ocena apoptozy i nekrozy

W celu zbadania zdolności AKG do indukcji apoptozy i/lub nekrozy w komórkach kostniakomięsaka zastosowano barwienie aneksyną V znakowaną izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) oraz PI. Aneksyna V-FITC ma zdolność wiązania się z fosfatydyloseryną (składnikiem błony komórkowej), która we wczesnej fazie apoptozy przenoszona jest ze strony cytozolowej na zewnątrz komórki. Z kolei PI wnika przez poluźnioną błonę martwych komórek i barwi DNA. Dzięki jednoczesnemu barwieniu aneksyną V-FITC i PI możliwe jest rozróżnienie komórek żywych, wczesno- i późnoapoptotycznych oraz nekrotycznych w czasie analizy cytometrycznej. Komórki nekrotyczne wiążą jedynie PI. Z kolei komórki będące we wczesnym stadium apoptozy absorbują tylko aneksynę V, ponieważ ich błona komórkowa jest nieprzepuszczalna dla PI. W środkowej i późnej fazie apoptozy błona komórkowa jest rozszczelniona, a więc komórki wiążą zarówno aneksynę V jak i PI. Natomiast komórki żywe nie absorbują aneksyny V, jak również nie wnika do nich PI.

Do płytek 6-dołkowych rozlewano po 2 ml zawiesiny komórek danej linii kostniakomięsaka (w odpowiednim podłożu wzrostowym, z dodatkiem 10 % FBS) o gęstości 3,5 x  $10^5$  kom./ml i inkubowano przez 24 godziny w standardowych warunkach. Następnie podłoże znad hodowli usuwano i dodawano kolejne rozcieńczenia AKG (5, 10, 25 i 50 mM) w płynie hodowlanym z dodatkiem 2% FBS, w ilości 3 ml/dołek. Na płytce sporządzano również kontrolę komórek, do której dodawano jedynie podłoże z dodatkiem 2% FBS. W części eksperymentów, przed dodaniem AKG hodowle traktowano przez 1 godzinę specyficznym inhibitorem JNK (SP600125) w stężeniu 5  $\mu$ M. Płytkę inkubowano przez 72 godziny w standardowych warunkach. Po inkubacji, płyn znad hodowli zbierano do probówek wirówkowych, komórki w dołkach przemywano najpierw PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, a następnie 0,25% roztworem trypsyny w EDTA. Obydwa roztwory użyte do przemywania komórek (tj. PBS i trypsynę w EDTA), a także odklejone od dna naczynia komórki zbierano do probówek, odwirowywano (1500 obrotów/min., 5 min.), a otrzymany osad komórek przeznaczano do oznaczania apoptozy/nekrozy przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II Part A. Oznaczenie przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta, wykorzystując cytometr przepływowy FACS Calibur (BD Biosciences).

### 6. Ocena aktywacji kaspazy-3 przy użyciu cytometrii przepływowej

Kaspaza-3 jest kluczową proteazą aktywowaną we wczesnych etapach apoptozy i podobnie jak inne kaspazy jest syntetyzowana jako nieaktywny proenzym o masie 32 kDa. W czasie apoptozy nieaktywna kaspaza-3 ulega przetworzeniu (w wyniku autoproteolizy i/lub cięcia przez inne proteazy) do form składających się z dużych (17 – 22 kDa) i małych (10 - 12 kDa) podjednostek, które asocjują tworząc aktywny enzym. Aktywna kaspaza-3 (tzw. efektorowa), będąca markerem komórek apoptotycznych, stanowi heterodimer złożony z podjednostek o masie 17 i 12 kDa (Parrish A., i in., 2013; Degterev A., i in., 2003; Kang H., i in., 2008).

W celu określenia zdolności AKG do aktywacji kaspazy-3 użyto komercyjnie dostępny zestaw PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit, który zawiera królicze przeciwciała znakowane fluorochromem (fikoerytryną, PE), rozpoznające tylko aktywną postać kaspazy-3 w badanych komórkach.

Doświadczenie przygotowywano w sposób analogiczny do opisanego w metodzie oceny apoptozy barwieniem aneksyną V-FITC i PI. W eksperymencie używano następujące stężenia AKG: 10, 25 i 50 mM. Osad komórek przeznaczony do oznaczania aktywnej kaspazy-3 traktowano buforem permeabilizującym i utrwalającym komórki (wodny roztwór paraformaldehydu i saponin), dołączonym do zestawu PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit, a następnie dodawano przeciwciała, postępując według instrukcji producenta. Ilość komórek z aktywną kaspazą-3 oceniano wykorzystując cytometr przepływowy FACS Calibur (BD Biosciences).

# 7. Ocena aktywacji kaspazy-8 i -9 za pomocą cytometrii przepływowej

Kaspaza-8 (inicjatorowa) jest proteazą cysteinową, która ulega aktywacji w wyniku pobudzenia receptorów śmierci, w związku z czym odgrywa główną rolę w inicjowaniu apoptozy poprzez szlak zewnątrzkomórkowy (Parrish A., i in., 2013; Degterev A., i in., 2003). Natomiast kaspaza-9 (inicjatorowa) jest aktywowana w wyniku działania różnych bodźców (chemioterapeutyków, czynników stresowych, naświetlania) i pełni główną rolę w inicjowaniu apoptozy poprzez szlak wewnątrzpochodny/mitochondrialny (Parrish A., i in., 2013; Degterev A., i in., 2003).

Aby określić zdolność AKG do aktywacji kaspazy-8 i -9 wykorzystano komercyjnie dostępne zestawy: CaspaTag<sup>TM</sup> Caspase-8 *In Situ* Assay Kit oraz CaspaTag<sup>TM</sup> Caspase-9 *In Situ* Assay Kit, opierające się na zastosowaniu znakowanego karboksyfluoresceiną inhibitora peptydowego odpowiednio kaspazy-8 i -9, który wiąże się wyłącznie z aktywnym enzymem (FLICA). Inhibitory tych kaspaz są nietoksyczne i mają zdolność przenikania przez błonę komórkową. Po wniknięciu do komórek wiążą się z resztą cysteinową w dużej podjednostce aktywnej kaspazy i hamują aktywność całego enzymu. Związany inhibitor jest zatrzymywany wewnątrz komórki, natomiast niezwiązany reagent dyfunduje na zewnątrz komórki i jest odpłukiwany. Zielona fluorescencja pozwala bezpośrednio określić ilość komórek z aktywną kaspazą-8 lub -9.

Doświadczenie przygotowywano w sposób analogiczny do opisanego w metodzie oceny apoptozy barwieniem aneksyną V-FITC i PI. W eksperymencie używano stężenia: 10, 25 i 50 mM AKG. Po przygotowaniu osadu komórek, oznaczenie wykonano przy pomocy wyżej podanych komercyjnych zestawów, przestrzegając instrukcji producenta. Do pomiaru ilości komórek wykorzystano cytometr przepływowy FACS Calibur (BD Biosciences).

### 8. Metoda Western blotting

Metodę tę wykorzystano do oceny zdolności AKG do aktywacji kaspazy-8 i -9 oraz wpływu AKG na ekspresję białek Bax i Bcl-2, związanych z wewnątrzpochodnym szlakiem apoptozy.

Western blotting jest wieloetapową metodą, wykorzystującą przeciwciała monoklonalne do detekcji białek w lizatach komórkowych (immunodetekcja). Pierwszy etap to otrzymanie lizatów komórkowych, które następnie poddaje się rozdziałowi elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym. Po rozdzieleniu białek w żelu, w następnym etapie wykonywany jest ich transfer na membrany z polifluorku winylidenu (PVDF). Następnie membrany inkubowane są z przeciwciałami I-rzędowymi, skierowanymi przeciwko poszukiwanemu białku i II-rzędowymi, które sprzężone są z enzymem umożliwiającym wizualizację prążków metodą chemiluminescencji (np. peroksydazą chrzanową - HRP). W ten sposób określane są zmiany w poziomie białka pod wpływem substancji badanej, bądź też wykrywane jest konkretne białko w próbce.

W celu przygotowania lizatów, zawiesinę komórek w podłożu wzrostowym z 10% FBS, o gęstości 3 x  $10^5$  kom./ml rozlewano po 2 ml do płytek 6-dołkowych i inkubowano w standardowych warunkach. Po 24 godzinach podłoże znad hodowli usuwano i zastępowano je świeżym, z dodatkiem 2% FBS i bez dodatku AKG kontrola komórek lub dodawano AKG w stężeniach: 10, 25 i 50 mM. Hodowle inkubowano przez 72 godziny w standardowych warunkach, a następnie przeprowadzano lizę komórek. Po usunięciu podłoża, przepłukaniu hodowli roztworem PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> i odklejeniu komórek od dna naczynia za pomoca 0,25% roztworu trypsyny w EDTA, zawieszano je w roztworze PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, zbierano do probówek typu Eppendorf i odwirowywano (1500 obrotów/min., 5 min.). Do osadu dodawano po 100 µl buforu lizującego RIPA z dodatkiem 0,5% koktajlu inhibitorów proteaz, inkubowano przez 45 min. w lodzie i odwirowywano (14000 obrotów/min., 10 min., 4 °C). Supernatanty zbierano i oznaczano w nich stężenie białka stosując komercyjny zestaw Pierce BCA Protein Assay Kit. Następnie do supernatantów dodawano 4x stężony bufor próbkowy (w odpowiedniej ilości, tak by każda próbka zawierała równą ilość białka), ogrzewano je w temperaturze 98°C przez 5 min. i przechowywano w temperaturze - $20^{\circ}C$ 

We właściwej części doświadczenia przeprowadzano elekroforezę SDS-PAGE i transfer białek na membranę (immunobloting). W uprzednio przygotowanych żelach poliakrylamidowych o stężeniu akrylamidu/bisakrylamidu 10%, przeprowadzano elektroforezę w warunkach denaturujących (SDS i β-merkaptoetanol). Ilość białka w nanoszonym na żel lizacie wynosiła 40 µg. Zastosowano także barwiony marker białkowy w ilości 5 µl. Elektroforezę w żelu zagęszczającym prowadzono pod napięciem 90 V, następnie podwyższono je do 120 V po przejściu próbek z żelu zagęszczającego w separujący. Po elektroforetycznym rozdziale białek, żele płukano przez 15 min. w buforze do elektrotransferu półsuchego. Następnie aktywowano membrany PVDF poprzez zanurzenie w metanolu i przeprowadzano elektrotransfer półsuchy rozdzielonych białek pod napięciem 17 V przez 30 min. Po skończeniu transferu membrany umieszczano na 30 min. w 10% roztworze odtłuszczonego mleka w buforze TBS-T, aby zablokować miejsca mogące niespecyficznie wiązać białko. W kolejnym etapie, membrany inkubowano przez ok. 12 godzin w temperaturze 4°C z przeciwciałami I-rzędowymi skierowanymi przeciwko kaspazie-8, -9, białku Bax lub Bcl-2, stosując rozcieńczenia 1:500 w buforze TBS-T. Po inkubacji, membrany przepłukiwano trzykrotnie buforem TBS-T i inkubowano przez 60 min. w temperaturze pokojowej z przeciwciałami II-rzędowymi (rozcieńczonymi 1:2000 w buforze TBS-T), sprzężonymi z HRP. Po tym etapie również trzykrotnie przepłukiwano membrany w buforze TBS-T i za pomocą zestawu Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System przeprowadzano wizualizacje prażków, według instrukcji producenta. Zdjęcia oraz analizę gęstości optycznej prażków wykonywano w systemie do dokumentacji żeli ChemiDocTMXRS+ firmy Bio-Rad przy użyciu programu Image Lab. Jako kontrole równej ilości białka w próbkach wykorzystywano wizualizację poziomu  $\beta$ -aktyny (białka referencyjnego) z użyciem poliklonalnych przeciwciał I-rzędowych przeciwko temu białku (rozcieńczonych 1:2000 w buforze TBS-T). Dane densytometryczne prążków otrzymanych dla analizowanych białek poddawano normalizacji względem β-aktyny.

# 9. Metoda immunoenzymatyczna (ang. enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA)

ELISA jest metodą służącą do ilościowego identyfikowania różnego rodzaju antygenów w badanych próbkach. Zasada działania tej metody opiera się na wykorzystaniu nośników, które opłaszczone są I-rzędowymi przeciwciałami, skierowanymi przeciwko wykrywanemu białku. Po dodaniu próbki, białka unieruchamiane są na nośniku. W kolejnym etapie dodawane są II-rzędowe przeciwciała znakowane enzymem, np. HRP, które mają możliwość przekształcania bezbarwnego substratu w barwny produkt. W wyniku dodania substratu dla enzymu i Metodami inkubacji, następuje zmiana zabarwienia roztworu. spektrofotometrycznymi można zmierzyć jego gęstość optyczną. Stężenie produktu jest wprost proporcjonalne do ilości badanego białka w próbce.

Metodę ELISA wykorzystano do oceny zdolności AKG do aktywowania kinaz MAP oraz kinazy białkowej Akt, a także jego wpływu na ekspresję białek związanych z cyklem komórkowym – cykliny D1 i inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1. Ponadto metodę tę wykorzystano do określenia wpływu AKG na poziom produkcji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) i transformującego czynnika wzrostu (TGF-β) przez komórki kostniakomięsaka.

#### 9.1. Oznaczanie wewnątrzkomórkowego poziomu białek

Ilościowe oznaczenia wewnątrzkomórkowego poziomu: ERK1/2, JNK, p38, Akt (całkowitego i fosforylowanych kinaz), a także cykliny D1 i białka p21 Waf1/Cip1 w komórkach kostniakomięsaka wykonywano przy użyciu gotowych zestawów, wymienionych w rozdziale IV, podpunkt 8.

Zawiesinę komórek kostniakomięsaka o gestości 1 x 10<sup>6</sup> kom./ml w podłożu z dodatkiem 10% FBS rozlewano po 10 ml do plastikowych płytek o średnicy 10 cm. Po 24 godzinach inkubacji w standardowych warunkach, podłoże znad hodowli usuwano i zastępowano je kolejnymi rozcieńczeniami AKG (w podłożu z dodatkiem 2% FBS), w ilości 10 ml na płytkę. W eksperymentach używano stężenia: 10, 25 i 50 mM AKG. Sporządzano również płytki kontrolne, do których dodawano podłoże (z dodatkiem 2% FBS) bez dodatku AKG. W części eksperymentów, przed dodaniem AKG hodowle traktowano przez 1 godzinę specyficznym inhibitorem JNK (SP600125) w stężeniu 10 µM. Następnie płytki, w zależności od doświadczenia, inkubowano przez 6, 24 lub 48 godzin w standardowych warunkach. Po określonym czasie inkubacji, komórki poddawano lizie. W tym celu, po usunięciu podłoża komórki przepłukiwano zimnym roztworem PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, dodawano po 0,5 ml na płytkę wcześniej przygotowanego 1x stężonego buforu do lizy (woda dejonizowana, 10x stężony bufor do lizy, 100x stężony PMSF, 200x stężona mieszanina inhibitorów proteaz, 1000x stężona mieszanina inhibitorów fosfataz 2 i 1000x stężona mieszanina inhibitorów fosfataz 3) i trzymano płytki w lodzie przez ok. 5 minut. Następnie, za pomocą skrobaczki (Cell Scraper 3010) zeskrobywano komórki z powierzchni płytki, przenoszono je do probówek typu Eppendorf, trzymano w lodzie przez ok. 45 min. i odwirowywano (4°C, 14000 obrotów/minutę, 10 min). Supernatanty zbierano do nowych probówek typu Eppendorf, worteksowano, porcjowano i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu wykonywania oznaczeń. Bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia w każdej próbce mierzono stężenie białka stosując gotowy zestaw Pierce BCA Protein Assay Kit, a następnie próbki rozcieńczano buforem (dołączonym do zestawu) w taki sposób, aby w 100 µl była jednakowa ilość białka. Oznaczenia wykonywano za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów (rozdział IV, podpunkt 8), przestrzegając zaleceń producenta. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 450$  nm, w czytniku EL800 Universal Microplate Reader.

#### 9.2. Określanie ilości cytokin w płynie hodowlanym

Ilość VEGF oraz TGF-β oznaczano przy użyciu gotowych zestawów, wymienionych w rozdziale IV, podpunkt 8.

Zawiesinę komórek kostniakomięsaka (Saos-2 i HOS) o gęstości 3.3 x 10<sup>5</sup> kom./ml w podłożu z dodatkiem 10% FBS rozlewano po 1 ml/dołek w płytce 24-dołkowej. Po 24 godzinach inkubacji w standardowych warunkach, podłoże znad hodowli usuwano i do dołków dodawano kolejne rozcieńczenia AKG (5, 10, 25 i 50 mM) w podłożu z dodatkiem 2% FBS, w ilości 1 ml/dołek. Dołki kontrolne zawierały jedynie podłoże z dodatkiem 2% FBS. Płytkę inkubowano przez 72 godziny w standardowych warunkach. Po tym czasie, z każdego dołka zbierano podłoże znad hodowli, odwirowywano je przez 10 min. przy prędkości 1500 obrotów/minutę, supernatant porcjowano i do czasu wykonania testu ELISA przechowywano w temp. -80 °C. Oznaczanie ilości cytokin przeprowadzano przestrzegając producenta. zaleceń Absorbancja została zmierzona spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 450$  nm, w czytniku EL800 Universal Microplate Reader. Ilość VEGF i TGF-β w próbach odczytywano z przygotowanej dla każdego białka krzywej wzorcowej.

# 10. Określanie stopnia migracji komórek metodą rysy (scratch assay)

Test zarastania rysy wykorzystywany jest w celu oceny wpływu badanej substancji na migrację komórek adherentnych. Rysa wykonywana jest w monowarstwie komórek, które następnie inkubowane są w płynie hodowlanym z dodatkiem badanej substancji lub bez dodatku (kontrola). W trakcie inkubacji komórki migrują na obszar rysy i stopniowo ją zarastają, natomiast porównanie szerokości rysy w kontroli z szerokością rysy w hodowli traktowanej badaną substancją pozwala na ocenę stopnia zahamowania migracji komórek.

Zawiesinę komórek kostniakomiesaka o gestości 3 x 10<sup>5</sup> kom./ml (Saos-2) lub 2,5 x 10<sup>5</sup> kom./ml (HOS) w podłożu z dodatkiem 10% FBS rozlewano do plastikowych płytek Petriego o średnicy 3,5 cm, w ilości 2 ml/płytkę. Po 48godzinnej inkubacji w standardowych warunkach oraz utworzeniu przez komórki monowarstwy, podłoże usuwano, hodowlę przepłukiwano 2 ml roztworu PBS z jonami  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , a następnie w warstwie komórek robiono rysę przy pomocy plastikowej końcówki do pipety automatycznej (2 - 200 µl). W celu usunięcia oderwanych od powierzchni płytki komórek, przepłukiwano ją dwukrotnie roztworem PBS z jonami  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ . Następnie do płytek rozlewano po 2 ml podłoża hodowlanego z 2% FBS bez dodatku (kontrola) lub z dodatkiem AKG w stężeniu: 5, 10, 25 i 50 mM. Jedna hodowlę kontrolna (kontrola szerokości rysy), bezpośrednio po wykonaniu w niej rysy oglądano w mikroskopie kontrastowofazowym odwróconego pola Olympus CKX41 i przyżyciowo wykonywano dokumentację zdjęciowa (powiększenie 40x) za pomocą programu analySIS Image Processing. Pozostałe płytki inkubowano przez 24 godziny w standardowych warunkach, po czym również wykonywano dokumentację zdjęciową.

Zahamowanie migracji komórek kostniakomięsaka przez AKG określano mierząc szerokość rysy w hodowli kontrolnej oraz w hodowlach z dodatkiem określonych stężeń AKG, a następnie obliczając wielokrotność zahamowania migracji w porównaniu z kontrolą na podstawie wzoru:

wielokrotność zahamowania migracji = s/k

gdzie:

s - średnia szerokość rysy w hodowli z odpowiednim stężeniem AKG

k – średnia szerokość rysy w hodowli kontrolnej

### 11. Określanie inwazyjności komórek

Wpływ AKG na aktywność inwazyjną komórek kostniakomięsaka badano metodą wykorzystującą migrację komórek przez membranę pokrytą macierzą błony podstawnej (Matrigelem). W metodzie tej wykorzystuje się inserty o średnicy porów 8 µm pokryte Matrigelem, które umieszcza się w dołkach płytki 24-dołkowej w taki sposób, że rozdzielają dołek na dwie komory. Do górnej komory wprowadza się zawiesinę komórek z dodatkiem badanej substancji, natomiast do dolnej – płyn hodowlany z dodatkiem chemoatraktanta. Komórki, aby mogły przemieścić się na drugą stronę insertu, muszą najpierw strawić Matrigel. Po określonym czasie inkubacji, na podstawie ilości komórek, które zdołały strawić macierz i przemigrować w środowisku zawierającym badany związek można ocenić jego wpływ na inwazyjność.

Do określania inwazyjności wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw CultreCoat® 24 Well Low BME Cell Invasion Assay (rozdział IV, podpunkt 8). Zawiesinę komórek linii Saos-2 lub HOS o gęstości 1 x 10<sup>6</sup> kom./ml w odpowiednim płynie hodowlanym z dodatkiem 1% FBS oraz odpowiedniego stężenia AKG (5, 10, 25, 50 mM) wlewano do górnej komory dołka w płytce 24-dołkowej, zawierającego odpowiednio przygotowany insert. Do dolnej komory dodawano płyn hodowlany z dodatkiem 10% FBS jako chemoatraktanta. Po 24 godzinach inkubacji w standardowych warunkach, insert wyjmowano z dołka, usuwano z niego płyn hodowlany i przepłukiwano ciepłym buforem do płukania. Następnie umieszczano insert w nowym dołku płytki 24-dołkowej (przystosowanej do pomiaru fluorescencji), a do dolnej komory wlewano roztwór do dysocjacji komórek z dodatkiem barwnika fluorescencyjnego, kalceiny AM. Po 60 minutach inkubacji w standardowych warunkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), delikatnie potrząsano płytką, aby usunąć komórki z dolnej części membrany, insert wyjmowano z dołka i dokonywano pomiaru fluorescencji przy użyciu czytnika spektrofotometrycznego VICTOR X4, przy długości fali wzbudzenia 485 nm i emisji 520 nm. Ilość komórek, które przemieściły się przez membranę była proporcjonalna do intensywności fluorescencji.

### 12. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu programu GraphPadPrism 5.0. Wyniki badań zostały przedstawione jako wartości średnie z kilku (co najmniej trzech) niezależnych eksperymentów  $\pm$  SD (odchylenie standardowe). Istotność statystyczną między kontrolą a badanymi próbami wykazano za pomocą jednoczynnikowego testu ANOVA z testem post-hoc Dunnett'a lub testem post-hoc Tukey'a, uznając wartości p < 0,05 za istotne statystycznie.

IC<sub>50</sub>, tj. stężenie AKG powodujące zahamowanie proliferacji komórek o 50% w porównaniu z kontrolą, wyznaczono z wykorzystaniem analizy regresji nieliniowej przy użyciu programu GaphPadPrism 5.0.

## VI. Wyniki

### 1. Wpływ AKG na żywotność komórek prawidłowych

W pierwszym etapie badań oceniano toksyczność AKG (2,5 – 200 mM) względem komórek prawidłowych linii HSF i hFOB 1.19 przy pomocy testu LDH.

Po 24-godzinnej inkubacji zaobserwowano, że AKG w stężeniach od 2,5 do 100 mM nie wpływał na żywotność komórek linii HSF (Wykres 1A), natomiast w zakresie stężeń 2,5 – 50 mM nie był również toksyczny dla komórek linii hFOB 1.19 (Wykres 1B). Statystycznie istotny spadek żywotności, ujawniający się zwiększonym wypływem LDH, zaobserwowano w przypadku linii HSF przy stężeniu 200 mM AKG, a w przypadku linii hFOB 1.19 przy stężeniach 75, 100 i 200 mM. Wyniki te wskazały, że AKG cechuje się bardzo niską toksycznością w stosunku do fibroblastów skóry dorosłego człowieka (HSF), natomiast jest bardziej toksyczny wobec osteoblastów ludzkich (hFOB 1.19).



Wykres 1. Wpływ AKG na żywotność komórek linii HSF (A) i hFOB 1.19 (B) po 24 godzinach inkubacji. Żywotność komórek określano testem LDH. Wyniki przedstawiono jako % ilości uwolnionej LDH w stosunku do kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów, po 4 powtórzenia w każdym eksperymencie). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

### 2. AKG hamuje proliferację komórek kostniakomięsaka

Aby ocenić aktywność przeciwnowotworową AKG wobec komórek kostniakomięsaka, zbadano najpierw (przy użyciu testu MTT) jego wpływ na proliferację komórek linii Saos-2 i HOS w czasie 96-godzinnej inkubacji. Wyniki wykazały, że AKG dodany do podłoża wzrostowego hamował proliferację komórek obu linii kostniakomięsaka proporcjonalnie do zastosowanego stężenia. Najniższe stężenie AKG, które hamowało w sposób istotny statystycznie proliferację komórek Saos-2 wynosiło 2,5 mM (Wykres 2A), natomiast w przypadku linii HOS było to stężenie 5 mM (Wykres 2B). W stężeniu 100 mM AKG zhamował proliferację komórek linii Saos-2 o ok. 74%, zaś linii HOS o 83%, natomiast stężenie 200 mM prawie całkowicie zahamowało proliferację komórek obu linii kostniakomięsaka.



Wykres 2. Wpływ AKG na aktywność proliferacyjną komórek linii Saos-2 (A) i HOS (B) po 96godzinnej inkubacji. Stopień proliferacji komórek określono testem MTT. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów, po 8 powtórzeń w każdym eksperymencie). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

W celu potwierdzenia aktywności antyproliferacyjnej AKG wobec komórek kostniakomięsaka, przeprowadzono pomiar syntezy DNA przy zastosowaniu testu BrdU. Wykazano, że 48-godzinna inkubacja z AKG powodowała proporcjonalne do stężenia zmniejszenie wbudowywania BrdU do DNA dzielących się komórek obu linii kostniakomięsaka (Wykres 3A oraz Wykres 3B). W hodowli Saos-2 statystycznie istotne zahamowanie syntezy DNA występowało przy stężeniu 5 mM AKG (oraz wyższych) (Wykres 3A), natomiast w przypadku linii HOS, w obecności wyższego stężenia związku, tj. 10 mM (Wykres 3B). IC<sub>50</sub> dla obydwu linii było na takim samym poziomie, wynosiło  $35,41 \pm 0,17$  i  $35,37 \pm 0,19$  odpowiednio dla linii Saos-2 i HOS.



Wykres 3. Wpływ AKG na proliferację komórek linii Saos-2 (A) i HOS (B) po 48-godzinnej inkubacji. Stopień proliferacji komórek określono testem BrdU. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów, po 8 powtórzeń w każdym eksperymencie). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,05 (\*), p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

# **3. AKG hamuje cykl komórkowy w komórkach Saos-2 i HOS w fazie G**<sub>1</sub>

Zatrzymanie podziałów komórkowych może być wynikiem zaburzeń w przebiegu cyklu komórkowego lub/i indukcją apoptozy i nekrozy w komórkach (Pucci B., i in., 2000). Z tego względu w następnym etapie badań określono wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego w hodowlach komórek Saos-2 i HOS po 48 godzinach inkubacji. W badaniach użyto stężenia AKG, które były nietoksyczne dla komórek prawidłowych, tj. 10, 25 i 50 mM.

Analiza cytometryczna wykazała, że AKG we wszystkich badanych stężeniach powodował niewielkie, ale istotne statystycznie zwiększenie ilości komórek w fazie G<sub>1</sub>, przy jednoczesnym zmniejszeniu ilości komórek w fazie

S i G<sub>2</sub> cyklu komórkowego, zarówno w hodowli Saos-2 (Ryc. 3, Wykres 4) jak i HOS (Ryc. 4, Wykres 5).



AKG [mM]

Ryc. 3. Wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego w hodowli Saos-2. Po 48-godzinnej inkubacji z AKG, utrwalone komórki barwiono jodkiem propidyny i poddawano analizie cytometrycznej. Rycina przedstawia reprezentatywne histogramy DNA z cytometru przepływowego prezentujące rozmieszczenie komórek w poszczególnych fazach cyklu wraz z analizą ilościową.



Wykres 4. Wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego w hodowli Saos-2 po 48 godz. inkubacji – analiza statystyczna procentowej ilości komórek w poszczególnych fazach cyklu (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). \*\*\* - różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001, test one-way ANOVA, post test Tukey'a.



Ryc. 4. Wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego w hodowli HOS. Po 48-godzinnej inkubacji z AKG, utrwalone komórki barwiono jodkiem propidyny i poddawano analizie cytometrycznej. Rycina przedstawia reprezentatywne histogramy DNA z cytometru przepływowego prezentujące rozmieszczenie komórek w poszczególnych fazach cyklu wraz z analizą ilościową.



Wykres 5. Wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego w hodowli HOS po 48 godz. inkubacji – analiza statystyczna procentowej ilości komórek w poszczególnych fazach cyklu (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). \*\*\* - różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001, test one-way ANOVA, post test Tukey'a.

# 4. Wpływ AKG na ekspresję białek związanych z cyklem komórkowym

W związku z tym, iż AKG powodował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub>, postanowiono zbadać wpływ badanej substancji na ekspresję białek odpowiedzialnych za przejście z fazy G<sub>1</sub> do fazy S cyklu komórkowego, tj. cykliny D1 oraz inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 (Pucci B., i in., 2000; Alao J., 2007). W badaniach określono (metodą ELISA) wpływ AKG na ekspresję cykliny D1 (po 24 i 48 godzinach inkubacji) oraz białka p21 Waf1/Cip1 (po 6 i 24 godzinach inkubacji) w komórkach linii Saos-2 i HOS.

#### 4.1. Wpływ AKG na ekspresję cykliny D1 w komórkach linii Saos-2 i HOS

Badania wykazały, że komórki linii Saos-2 zawierają niewielkie, chociaż wykrywalne testem ELISA ilości cykliny D1 (przy ilości białka 60  $\mu$ g/100  $\mu$ l absorbancja w kontroli komórek wynosiła zaledwie 0,115 ± 0,01). Po 24 godzinach inkubacji nie zaobserwowano wpływu AKG na ekspresję badanej cykliny w komórkach Saos-2 (Wykres 6A). Istotne statystycznie obniżenie ekspresji cykliny D1 zaobserwowano po 48 godzinach inkubacji komórek tej linii z AKG w stężeniu 50 mM. Badany związek w stężeniu 50 mM obniżył ekspresję cykliny D1 o 9,1% w porównaniu z kontrolą (Wykres 6B).



Wykres 6. Wpływ AKG na ekspresję cykliny D1 w komórkach linii Saos-2 po 24 (A) i 48 (B) godz. inkubacji. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

W przeciwieństwie do Saos-2, linia HOS charakteryzowała się wysokim poziomem ekspresji cykliny D1. O ile absorbancja mierzona w kontroli komórek Saos-2 przy ilości białka 60  $\mu$ g/100  $\mu$ l wynosiła 0,115 ± 0,01, to w komórkach HOS przy dwukrotnie niższym poziomie białka, tj. 30  $\mu$ g/100  $\mu$ l wynosiła aż 2,191 ± 0,05.

AKG w stężeniu 10 mM nie wpływał na ekspresję badanej cykliny w komórkach HOS (Wykres 7A i B). Po 24 godz. inkubacji, AKG w stężeniu 25 mM obniżył ekspresję cykliny D1 o 9%, natomiast w stężeniu 50 mM – o około 33% (Wykres 7A). Po 48 godz. inkubacji, istotne statystycznie obniżenie ekspresji cykliny D1 w komórkach HOS (o ok. 18%) występowało jedynie przy stężeniu AKG równym 50 mM (Wykres 7B).



Wykres 7. Wpływ AKG na ekspresję cykliny D1 w komórkach linii HOS po 24 (A) i 48 (B) godz. inkubacji. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,05 (\*), p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

## 4.2. Wpływ AKG na ekspresję inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 w komórkach linii Saos-2 i HOS

Test ELISA wykazał, że w linii komórkowej Saos-2, AKG w sposób istotny statystycznie w porównaniu z kontrolą i proporcjonalnie do zastosowanego stężenia zwiększał ekspresję inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 zarówno po 6, jak i po 24 godzinach inkubacji (Wykres 8A i B). Ponadto zaobserwowano zależny od czasu inkubacji wzrost ekspresji białka p21 pod wpływem AKG. O ile

AKG w stężeniu 10 mM nie wpływał na ekspresję p21 po 6 godzinach (Wykres 8A), to 24-godzinna inkubacja z tym samym stężeniem związku skutkowała wzrostem ekspresji p21 o ok. 19% (Wykres 8B). AKG w stężeniu 25 mM zwiększył ekspresję p21 o 39% po 24 godz. inkubacji. W stężeniu 50 mM, AKG zwiększył ekspresję p21 o 42% oraz 57%, odpowiednio po 6 i 24 godzinach inkubacji.



Wykres 8. Wpływ AKG na ekpresję inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 w komórkach linii Saos-2 po 6 (A) i 24 (B) godz. inkubacji. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,05 (\*), p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

Również w linii komórkowej HOS, po 6 godzinach inkubacji komórek z AKG o stężeniu 25 i 50 mM zaobserwowano istotny statystycznie i proporcjonalny do stężenia wzrost ekspresji białka p21 Waf1/Cip10 odpowiednio o 17% i 57% w porównaniu z kontrolą (Wykres 9A). Jednak po dłuższym czasie inkubacji komórek tej linii z AKG, tj. po 24 godzinach, zaobserwowano istotne statystycznie porównaniu z kontrolą i proporcjonalne do stężenia związku obniżenie poziomu omawianego białka (Wykres 9B).



Wykres 9. Wpływ AKG na ekpresję inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 w komórkach linii HOS po 6 (A) i 24 (B) godz. inkubacji. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,05 (\*), p <0,01 (\*\*), p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

# 5. AKG indukuje śmierć komórek kostniakomięsaka poprzez apoptozę

Zdolność AKG do indukcji apoptozy lub/i nekrozy w komórkach kostniakomięsaka oceniono stosując barwienie komórek odpowiednio aneksyną V-FITC i jodkiem propidyny oraz analizę cytometryczną. W doświadczeniach zastosowano AKG w stężeniach: 5, 10, 25 i 50 mM.

Po 72 godzinach inkubacji, AKG proporcjonalnie do zastosowanego stężenia indukował apoptozę zarówno w komórkach linii Saos-2 (Ryc. 5, Wykres 10), jak i HOS (Ryc. 6, Wykres 11), przy czym praktycznie nie indukował procesu nekrozy. Statystycznie istotny wzrost apoptozy w komórkach kostniakomięsaka obu linii komórkowych obserwowano nawet przy najniższym stężeniu AKG, tj. 5 mM. W przypadku linii Saos-2 procentowa ilość komórek apoptotycznych w hodowli kontrolnej wynosiła 0,5 ± 0,01%, natomiast pod wpływem AKG w stężeniach 5, 10, 25 i 50 mM zwiększyła się odpowiednio do 7,5 ± 0,29%, 8,2 ± 0,28%, 9,6 ± 0,22% oraz 12,1 ± 0,22% (Wykres 10). Podobnie w hodowli HOS, AKG w stężeniach 5, 10, 25 i 50 mM spowodował wzrost ilości komórek apoptotycznych z 1 ± 0,16% w kontroli do odpowiednio: 5 ± 0,58%, 5,8 ± 0,16%, 8,3 ± 0,30% oraz 12 ± 0,28% (Wykres 11).



Ryc. 5. Wpływ AKG na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii Saos-2 - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (dot ploty). Po 72 godz. inkubacji z AKG komórki barwiono aneksyną V (An)-FITC/PI i wykonywano analizę cytometryczną. Kwadrat LL przedstawia żywe komórki (An<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), LR – komórki z wczesną apoptozą (An<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), UR – komórki z późną apoptozą (An<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), UL – komórki nekrotyczne (An<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>).



Wykres 10. Wpływ AKG na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji. Analiza ilościowa procentowej zawartości komórek apoptotycznych (wczesna apoptoza + późna apoptoza) i nekrotycznych w hodowlach komórkowych linii Saos-2 kontrolnych i poddanych działaniu wzrastających stężeń AKG. Wyniki przedstawiono jako % komórek w hodowli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Tukey'a.



Ryc. 6. Wpływ AKG na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii HOS - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (dot ploty). Po 72 godz. inkubacji z AKG komórki barwiono aneksyną V (An)-FITC/PI i wykonywano analizę cytometryczną. Kwadrat LL przedstawia żywe komórki (An'/PI'), LR – komórki z wczesną apoptozą (An<sup>+</sup>/PI'), UR – komórki z późną apoptozą (An<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), UL – komórki nekrotyczne (An<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>).



Wykres 11. Wpływ AKG na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii HOS po 72 godz. inkubacji. Analiza ilościowa procentowej zawartości komórek apoptotycznych (wczesna apoptoza + późna apoptoza) i nekrotycznych w hodowlach komórkowych linii HOS kontrolnych i poddanych działaniu wzrastających stężeń AKG. Wyniki przedstawiono jako % komórek w hodowli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Tukey'a.

### 6. Wpływ AKG na aktywację kaspaz

Aktywacja kaspaz jest kluczowym procesem w kaskadzie sygnału apoptotycznego, decydującym o przebiegu i egzekucji programowanej śmierci (McIlwain D., i in., 2013; Salvesen G., 2002). Markerem śmierci apoptotycznej komórek jest aktywacja m.in. efektorowej kaspazy-3. Dlatego w kolejnym etapie badań oceniono zdolność AKG do aktywacji tej kaspazy w komórkach obu linii kostniakomięsaka.

#### 6.1. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3

Analiza cytometryczna wykazała, że AKG proporcjonalnie do stężenia aktywował kaspazę-3 zarówno w komórkach linii Saos-2 (Ryc. 7, Wykres 12), jak i HOS (Ryc. 8, Wykres 13). Po 72 godzinach inkubacji komórek Saos-2 z AKG w stężeniu 10 mM, ilość komórek z aktywną kaspazą zwiększyła się prawie 5-krotnie w porównaniu z kontrolą (z  $3,5 \pm 0,51\%$  do  $17,4 \pm 0,87\%$ ), przy stężeniu 10 mM AKG – ponad 6,5-krotnie (z  $3,5 \pm 0,51\%$  do  $22,8 \pm 1,1\%$ ), natomiast przy stężeniu 50 mM – 9-krotnie (z  $3,5 \pm 0,51\%$  do  $31,5 \pm 0,78\%$ ) (Wykres 12). W przypadku linii HOS obserwowano nieco mniejszą zdolność AKG do aktywowania kaspazy-3. Po 72 godz. inkubacji komórek tej linii z AKG w stężeniu 10 mM, ilość komórek z aktywną kaspazą zwiększyła się 2,8-krotnie w porównaniu z kontrolą (z  $1,3 \pm 0,18\%$ . do  $3,7 \pm 0,25\%$ ), przy stężeniu 10 mM AKG – prawie 4,4-krotnie (z  $1,3 \pm 0,18\%$ . do  $8,2 \pm 0,17\%$ ) (Wykres 13).



AKG [mM]

Ryc. 7. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3 w komórkach linii Saos-2. Po 72 godz. inkubacji z AKG komórki traktowano przeciwciałami przeciwko aktywnej kaspazie-3 (znakowanymi PE) i poddawano analizie cytometrycznej. Rycina przedstawia reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (histogramy) prezentujące ilość komórek z aktywną kaspazą-3.



Wykres 12. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji – analiza statystyczna. Wyniki przedstawiono jako % komórek z aktywną kaspazą-3 (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.


| AKG [ml | <b>N</b> | I |
|---------|----------|---|
|---------|----------|---|

Ryc. 8. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3 w komórkach linii HOS. Po 72 godz. inkubacji z AKG, komórki traktowano przeciwciałami przeciwko aktywnej kaspazie-3 (znakowanymi PE) i poddawano analizie cytometrycznej. Rycina przedstawia reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (histogramy) prezentujące ilość komórek z aktywną kaspazą-3.



Wykres 13. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3 w komórkach linii HOS po 72 godz. inkubacji – analiza statystyczna. Wyniki przedstawiono jako % komórek z aktywną kaspazą-3 (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

## 6.2. Ocena zdolności AKG do aktywowania apoptozy drogą zewnątrzi wewnątrzpochodną

Aby określić, jakim szlakiem AKG indukuje apoptozę w komórkach kostniakomięsaka, zewnątrz- czy wewnątrzpochodnym, w kolejnym etapie badań oceniano zdolność AKG do aktywacji kaspazy-8 oraz -9.

Porównując wpływ AKG na poziom indukowanej w komórkach apoptozy, zahamowanie cyklu komórkowego oraz aktywację kaspazy-3 zaobserwowano, że linia Saos-2 była nieco bardziej wrażliwa na działanie AKG. W związku z tym, w dalszych badaniach mechanizmów działania AKG wykorzystywano linię Saos-2.

#### 6.2.1. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-8

Zdolność AKG do aktywacji kaspazy-8 oceniano po 72-godzinnej inkubacji hodowli Saos-2 z badaną substancją przy użyciu metody Western blotting oraz analizy cytometrycznej ilości komórek z aktywną kaspazą.

Analiza Western blotting wykazała, że AKG (10, 25 i 50 mM) aktywował kaspazę-8, chociaż nie zaobserwowano zależnego od stężenia zwiększenia ilości aktywnej formy kaspazy (Ryc. 9). Analiza cytometryczna potwierdziła zdolność AKG do aktywowania kaspazy-8, jednak w niewielkim zakresie. Zaobserwowano proporcjonalny do zastosowanego stężenia AKG, niewielki wzrost ilości komórek Saos-2 z aktywną kaspazą-8 (Wykres 14, Ryc. 10). Najwyższe stężenie AKG (50 mM) spowodowało zwiększenie ilości komórek z aktywną kaspazą-8 jedynie do 5,9  $\pm$  0,27%, podczas gdy w hodowli kontrolnej ilość ta wynosiła 1,4  $\pm$  0,20% (ok. 4-krotny wzrost w porównaniu z kontrolą) (Wykres 14).



Ryc. 9. Reprezentatywny immunoblot przedstawiający poziom kaspazy-8 w lizatach komórkowych z linii Saos-2 po 72 godzinach inkubacji z AKG. Wykres 14. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-8 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji – analiza statystyczna wyników z cytometru przepływowego.

Wyniki przedstawiono jako % komórek z aktywną kaspazą-8 (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,001 (\*\*\*) – test oneway ANOVA, post test Dunnett'a.





Ryc. 10. Wplyw AKG na aktywację kaspazy-8 w komórkach linii Saos-2. Po 72 godz. inkubacji z AKG, komórki traktowano znakowanym karboksyfluoresceiną inhibitorem enzymu i poddawano analizie cytometrycznej. Rycina przedstawia reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (histogramy) prezentujące ilość komórek z aktywną kaspazą-8.

### 6.2.2. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-9

Podobnie jak w przypadku kaspazy-8, zdolność AKG do aktywacji kaspazy-9 oceniano po 72-godzinnej inkubacji hodowli Saos-2 z badaną substancją przy użyciu metody Western blotting oraz analizy cytometrycznej ilości komórek z aktywną kaspazą.

Analiza Western blotting wykazała, że AKG (10, 25 i 50 mM) aktywował kaspazę-9 w sposób proporcjonalny do zastosowanego stężenia związku (Ryc. 11). Również analiza cytometryczna potwierdziła zdolność AKG do aktywowania kaspazy-9. Zaobserwowano proporcjonalny do zastosowanego stężenia AKG wzrost ilości komórek Saos-2 z aktywną kaspazą-9 (Wykres 15, Ryc. 12) w porównaniu z kontrolą. O ile w hodowli kontrolnej ilość komórek z aktywną kaspazą-9 wynosiła 4,5  $\pm$  0,47%, to w obecności AKG w stężeniu 10 mM zwiększyła się do 12,5  $\pm$  0,52% (ok. 2,7-krotny wzrost), przy stężeniu 25 mM – do 18,4  $\pm$  0,40% (4-krotny wzrost), zaś przy stężeniu 50 mM – do 29,5  $\pm$  1,0% (ponad 6,5-krotny wzrost) (Wykres 15).



Ryc. 11. Reprezentatywny immunoblot przedstawiający poziom kaspazy-9 w lizatach komórkowych z linii Saos-2 po 72 godzinach inkubacji z AKG.



Wykres 15. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-9 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji – analiza statystyczna wyników z cytometru przepływowego. Wyniki przedstawiono jako % komórek z aktywną kaspazą-9 (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna porównaniu w z kontrolą przy p < 0,001 (\*\*\*) – test one-ANOVA, way post test Dunnett'a.





Ryc. 12. Wpływ AKG na aktywację kaspazy-9 w komórkach linii Saos-2. Po 72 godz. inkubacji z AKG, komórki traktowano znakowanym karboksyfluoresceiną inhibitorem enzymu i poddawano analizie cytometrycznej. Rycina przedstawia reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (histogramy) prezentujące ilość komórek z aktywną kaspazą-9.

# 7. Wpływ AKG na ekspresję białek związanych z wewnątrzpochodnym szlakiem apoptozy

Istotnym mechanizmem regulującym apoptozę komórki jest proporcja między poziomem białek działających pro- i antyapoptotycznie (Opferman J. i Kothari A., 2018; Brunelle J. i Letai A., 2009). Wyniki badań opisane w rozdziale 6.2. wskazały, że AKG indukuje apoptozę w komórkach kostniakomięsaka głównie szlak wewnatrzpochodny. W szlaku tym przepuszczalność błon przez mitochondrialnych jest kontrolowana przez rodzinę białek Bcl-2, wśród których znajdują się zarówno białka o działaniu pro-, jak i antyapoptotycznym. Jednym z najważniejszych białek aktywujących apoptozę jest Bax, natomiast głównym białkiem hamującym ten proces jest Bcl-2 (Brunelle J. i Letai A., 2009). W związku z powyższym w kolejnym etapie badań określono wpływ AKG na ekspresję obu białek przy pomocy metody Western blott.

Analiza densytometryczna prążków wykazała, że AKG moduluje poziom Bax i Bcl-2 w komórkach Saos-2 (Ryc. 13, Wykres 16). Po 72 godzinach inkubacji komórek kostniakomięsaka z AKG w stężeniu 10 mM obserwowano niewielki wzrost poziomu Bax (o ok.  $6 \pm 0,72\%$ ), natomiast poziom Bcl-2 nie zmienił się. Potraktowanie komórek Saos-2 AKG w stężeniu 25 mM skutkowało zwiększeniem poziomu Bax o ok. 24 ± 0,90% oraz niewielkim obniżeniem poziomu Bcl-2 (o ok. 7 ± 2,65%). Natomiast po inkubacji komórek z AKG w stężeniu 50 mM poziom Bax zwiększył się o ok.  $35 \pm 1,0\%$ , a poziom Bcl-2 wyraźnie się obniżył (o ok.  $35 \pm 2,97\%$ ). Tym samym badanie to wykazało, że pod wpływem wzrastających stężeń AKG w komórkach Saos-2 dochodzi do zaburzenia proporcji między Bax a Bcl-2 i zaczyna przeważać sygnał promujący apoptozę.



Ryc. 13. Reprezentatywne immunobloty przedstawiające poziom białka Bax oraz Bcl-2 w lizatach komórkowych z linii Saos-2 po 72 godzinach inkubacji z AKG. Kontrolę endogenną stanowiła β-aktyna.



Wykres 16. Wpływ AKG na poziom białka Bax (A) oraz białka Bcl-2 (B) w komórkach linii Saos-2 po 72 godzinach inkubacji. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych powtórzeń). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,05 (\*), p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

# 8. Wpływ AKG na aktywację kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK)

Kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPK) odpowiadają za regulację wielu komórkowych procesów, w tym proliferację, różnicowanie, wzrost komórek czy zatrzymanie cyklu komórkowego. Mają one również zasadnicze znaczenie w regulacji procesu apoptozy (Cargnello M. i Roux P., 2011). W związku z powyższym następnym etapem badań była ocena działania AKG na poziom fosforylacji (aktywacji) kinaz MAP, tj. ERK1/2, JNK i p38 w komórkach kostniakomięsaka linii Saos-2 przy użyciu metody ELISA. Zbadano także całkowity poziom tych kinaz w komórkach kontrolnych i traktowanych AKG.

### 8.1. AKG obniża poziom fosforylacji kinazy ERK1/2

Inkubacja komórek Saos-2 z AKG (10, 25 i 50 mM) skutkowała obniżeniem poziomu fosforylacji ERK1/2, proporcjonalnie do zastosowanego stężenia związku. Efekt ten był widoczny zarówno po 6, jak i po 24 godzinach inkubacji (Wykres 17A i B). Po 6 godzinach inkubacji, AKG zastosowany w stężeniach: 10, 25 i 50 mM obniżył statystycznie istotnie aktywację kinazy ERK1/2 w porównaniu z kontrolą, odpowiednio o ok.  $23 \pm 4,04\%$ ,  $27 \pm 4,00\%$  i  $43 \pm 3,06\%$ , natomiast po 24 godzinach inkubacji odpowiednio o  $27 \pm 8,00\%$ ,  $35 \pm 4,50\%$  i  $41 \pm 2,00\%$ .



Wykres 17. Wpływ AKG na aktywację kinazy ERK1/2 w komórkach linii Saos-2 po 6 godzinach (A) i 24 godzinach (B) inkubacji. Stosunek ilości p-ERK1/2 do t-ERK1/2 w kontroli przyjęto jako 100%. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

### 8.2. AKG aktywuje kinazę JNK

Badania wykazały, że AKG zwiększał fosforylację kinazy JNK w komórkach linii Saos-2 proporcjonalnie do zastosowanego stężenia, zarówno po 6, jak i po 24 godzinach inkubacji (Wykres 18A i B). Po 6 godzinach inkubacji, AKG zastosowany w stężeniach 10, 25 i 50 mM, istotnie zwiększył poziom ufosforylowanej kinazy JNK w porównaniu z kontrolą, odpowiednio o ok. 18  $\pm$  0,75%, 40  $\pm$  3,05% i 70  $\pm$  1,52%, natomiast po 24 godzinach inkubacji odpowiednio o 28  $\pm$  2,00%, 43  $\pm$  6,26% i 113  $\pm$  2,00%.



Wykres 18. Wpływ AKG na aktywację kinazy JNK w komórkach linii Saos-2 po 6 godzinach (A) i 24 godzinach (B) inkubacji. Stosunek ilości p-JNK do t-JNK w kontroli przyjęto jako 100%. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

### 8.3. Wpływ AKG na fosforylację kinazy p-38

Eksperymenty ujawniły, iż AKG zastosowany w stężeniach 10, 25 i 50 mM nie wpływał na fosforylację kinazy p-38 w komórkach linii Saos-2, zarówno po 6, jak i po 24 godzinach inkubacji (Wykres 19A i B).



Wykres 19. Wpływ AKG na aktywację kinazy p-38 w komórkach linii Saos-2 po 6 godzinach (A) i 24 godzinach (B) inkubacji. Stosunek ilości p-p38 do t-p38 w kontroli przyjęto jako 100%. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

### 9. Wpływ AKG na aktywację kinazy białkowej Akt

Serynowo-treoninowa kinaza Akt (PKB) jest kluczową kinazą przyżyciową, odpowiadającą za fosforylację wielu białek regulujących podstawowe procesy komórkowe, takie jak proliferacja, apoptoza czy migracja (Porta C., i in., 2014). Kinaza ta do pełnej aktywacji wymaga fosforylacji przynajmniej dwóch reszt: treoniny w pozycji 308 oraz seryny 473 (Zhang J., i in., 2015b).

W kolejnym etapie badań określono wpływ 6-, 24- i 48-godzinnej inkubacji hodowli Saos-2 z AKG (10, 25 i 50 mM) na fosforylację reszty seryny 473 (Akt <sup>Ser473</sup>) oraz reszty treoniny 308 (Akt<sup>Thr308</sup>), przy użyciu testu ELISA. Zbadano także całkowity poziom tej kinazy w komórkach kontrolnych i traktowanych AKG.

Wykazano, że AKG obniżał poziom aktywacji kinazy Akt w komórkach kostniakomiesaka poprzez zahamowanie głównie fosforylacji reszty seryny 473 (Wykres 20 A, B i C) i w mniejszym stopniu przez zahamowanie fosforylacji reszty treoniny 308 (Wykres 21 A, B i C). Inkubacja komórek Saos-2 z AKG w stężeniu 10 mM spowodowała statystycznie istotne zahamowanie fosforylacji Akt<sup>Ser473</sup> o 8,5  $\pm$  4,34%, 5  $\pm$  1,62% oraz 7  $\pm$  2,03%, odpowiednio po 6, 24 i 48 godzinach. AKG zastosowany w stężeniu 25 mM obniżył poziom fosforylacji Akt<sup>Ser473</sup> o  $22 \pm 4,80\%$ ,  $24 \pm 2,89\%$  i  $17 \pm 2,78\%$ , natomiast w stężeniu 50 mM – o  $34 \pm 3,01\%$ ,  $42 \pm 2,66\%$ oraz 41,5 ± 1,17%, odpowiednio po 6, 24 i 48 godzinach. W przypadku Akt<sup>Thr308</sup>, niewielkie, chociaż statystycznie istotne zahamowanie fosforylacji pod wpływem AKG zastosowanym we wszystkich badanych stężeniach obserwowano jedynie po 6 i 24 godzinach inkubacji (Wykres 21 A i B), natomiast po 48 godzinach, jedynie najwyższe stężenie AKG, tj. 50 mM, spowodowało niewielkie obniżenie fosforylacji tej kinazy (Wykres 21C). Najbardziej efektywnie działające stężenie AKG, tj. 50 mM, obniżyło fosforylacje Akt<sup>Thr308</sup> o  $17 \pm 0.90\%$  oraz 23.5  $\pm 0.92\%$ , odpowiednio po 6 i 24 godzinach.



Wykres 20. Wpływ AKG na fosforylację reszty seryny 473 kinazy Akt w komórkach linii Saos-2 po 6 (A), 24 (B) i 48 (C) godzinach inkubacji. Stosunek ilości p-Akt<sup>Ser473</sup> do t-Akt w kontroli przyjęto jako 100%. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.



Wykres 21. Wpływ AKG na fosforylację reszty treoniny 308 kinazy Akt w komórkach linii Saos-2 po 6 (A), 24 (B) i 48 (C) godzinach inkubacji. Stosunek ilości p-Akt<sup>Thr308</sup> do t-Akt w kontroli przyjęto jako 100%. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,05 (\*), p < 0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

# 10. AKG indukuje apoptozę w komórkach linii Saos-2 poprzez aktywację JNK

JNK jest kinazą aktywowaną czynnikami stresowymi, a szlak sygnalizacyjny z udziałem tej kinazy reguluje m.in. apoptozę (Dhanasekaran D. i Reddy E., 2008).

Ze względu na to, że AKG aktywował JNK w komórkach linii Saos-2, w kolejnym etapie badań użyto selektywny inhibitor tej kinazy (SP600125), aby zbadać czy JNK była zaangażowana w indukowanie apoptozy przez AKG. W eksperymentach tych hodowlę komórek Saos-2 preinkubowano przez 1 godzinę z SP600125, po czym dodawano AKG w stężeniu 50 mM i inkubowano przez kolejne 24 godziny (w przypadku oznaczania poziomu fosforylacji JNK) lub przez 72 godziny (w przypadku określania apoptozy).

Zaobserwowano, że zastosowanie selektywnego inhibitora JNK przed dodaniem AKG całkowicie zahamowało aktywację kinazy JNK indukowaną przez ten związek (Wykres 22) oraz częściowo obniżyło poziom indukowanej przez AKG apoptozy w komórkach Saos-2 (Ryc. 14, Wykres 23). W hodowli Saos-2 traktowanej AKG stwierdzono występowanie ok.  $22 \pm 0,31\%$  komórek apoptotycznych, natomiast dodanie inhibitora JNK zmniejszyło ich ilość do  $13 \pm 0,65\%$ . Wyniki tych eksperymentów wykazały, że kinaza JNK była zaangażowana w indukowanie apoptozy przez AKG.



Wykres 22. Wpływ selektywnego inhibitora JNK (SP600125, 10  $\mu$ M) na poziom indukowanej przez AKG (50 mM) aktywacji kinazy w komórkach Saos-2 po 24 godzinach inkubacji. Stosunek ilości p-JNK do t-JNK w kontroli przyjęto jako 100%. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Tukey'a.



Ryc. 14. Wpływ selektywnego inhibitora JNK (SP600125, 5  $\mu$ M) na poziom indukowanej przez AKG (50 mM) apoptozy w hodowli komórkowej Saos-2 - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (dot ploty). Po 72 godz. inkubacji, komórki barwiono aneksyną V (An)-FITC/PI i wykonywano analizę cytometryczną. Kwadrat LL przedstawia żywe komórki (An<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), LR – komórki z wczesną apoptozą (An<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), UR – komórki z późną apoptozą (An<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), UL – komórki nekrotyczne (An<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>).



Wykres 23. Wpływ selektywnego inhibitora JNK (SP600125, 5 μM) na poziom indukowanej przez AKG (50 mM) apoptozy w hodowli komórkowej Saos-2 po 72 godzinach inkubacji. Wyniki przedstawiono jako % komórek apoptotycznych (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Tukey'a.

# 11. Wpływ AKG na wytwarzanie TGF-β przez komórki kostniakomięsaka linii Saos-2 i HOS

TGF- $\beta$  (transformujący czynnik wzrostu beta) jest parakrynnym oraz autokrynnym czynnikiem mitogennym dla komórek kostniakomięsaka (Verrecchia F. i Rédini F., 2018; Navid F., i in., 2000). Aby ocenić zdolność AKG do modulowania wytwarzania tego czynnika, metodą ELISA określano poziom TGF- $\beta$ w płynie znad hodowli Saos-2 oraz HOS po 72 godzinach inkubacji z AKG (5, 10, 25, 50 mM).

Zaobserwowano, że komórki kostniakomięsaka wytwarzają spontanicznie znaczną ilość tej cytokiny, przy czym komórki Saos-2 wytwarzały prawie dwukrotnie więcej TGF- $\beta$  niż komórki HOS. Poziom TGF- $\beta$  wytwarzanego przez hodowlę kontrolną Saos-2 wynosił 5570 ± 27,85 pg/ml, natomiast komórki kontrolne HOS produkowały 2851 ± 55,70 pg/ml cytokiny. AKG w stężeniu 10, 25 oraz 50 mM obniżył wytwarzanie TGF- $\beta$  zarówno przez komórki Saos-2, jak i HOS, proporcjonalnie do zastosowanego stężenia (Wykres 24 A i B). Na przykład, w przypadku hodowli Saos-2, AKG w stężeniu 50 mM zmniejszył ilość cytokiny w porównaniu z kontrolą o  $28,8 \pm 1,87\%$  (do 3966 pg/ml) (Wykres 24A), natomiast w komórkach HOS o  $42,8 \pm 2,9\%$  (do 1632 pg/ml) (Wykres 24B).



Wykres 24. Wpływ AKG na wytwarzanie TGF- $\beta$  przez komórki kostniakomięsaka linii Saos-2 (A) i HOS (B) po 72 godz. inkubacji. Wyniki przedstawiono jako poziom TGF- $\beta$  w pg/ml. (średnia ± SD z czterech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,05 (\*), p < 0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

# 12. Wpływ AKG na wytwarzanie VEGF przez komórki kostniakomięsaka linii Saos-2 i HOS

Szlak sygnałowy aktywowany przez czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) jest jednym z kluczowych regulatorów angiogenezy, procesu niezbędnego do wzrostu i przerzutowania nowotworu. W komórkach kostniakomięsaka stwierdza się zwiększoną ekspresję tej cytokiny, która koreluje dodatnio ze złym rokowaniem (Bajpai J., i in., 2009; Ohba T., i in., 2014).

Stąd też w następnym etapie określono wpływ AKG (5, 10, 25, 50 mM) na poziom VEGF wytwarzanego przez komórki linii Saos-2 i HOS po 72 godzinach inkubacji.

Wyniki badań wykazały, że komórki obu linii kostniakomięsaka wytwarzają spontanicznie znaczną ilość VEGF, przy czym komórki Saos-2 wytwarzały 15 razy więcej tej cytokiny niż komórki HOS (Wykres 25A i B). Poziom VEGF wytwarzanego przez hodowlę kontrolną Saos-2 wynosił 29670 ± 0,35 pg/ml,

natomiast komórki kontrolne HOS produkowały 1985 ± 14,40 pg/ml cytokiny. AKG obniżył poziom VEGF w komórkach linii Saos-2 i HOS proporcjonalnie do użytego stężenia. W przypadku linii Saos-2, istotne statystycznie obniżenie produkcji VEGF w porównaniu z kontrolą obserwowano po dodaniu AKG w stężeniu 10, 25 i 50 mM; jego poziom zmniejszył się z 29670 ± 0,35 pg/ml w kontroli do odpowiednio: 27038 ± 257,3 pg/ml, 24656 ± 912,1 pg/ml oraz 18231 ± 942,5 pg/ml (Wykres 25A). Natomiast w przypadku linii HOS, wszystkie stężenia AKG, tj. 5, 10, 25 i 50 mM zahamowały w sposób istotny statystycznie w porównaniu z kontrolą wytwarzanie VEGF. Poziom cytokiny obniżył się z 1985 ± 14,40 pg/ml w kontroli do 1578 ± 22,05 pg/ml, 1327 ± 18,04 pg/ml, 524,6 ± 46,28 pg/ml oraz 12,26 ± 1,25 pg/ml, pod wpływem odpowiednio 5, 10, 25 oraz 50 mM AKG (Wykres 25B).



Wykres 25. Wpływ AKG na wytwarzanie VEGF przez komórki kostniakomięsaka linii Saos-2 (A) i HOS (B) po 72 godz. inkubacji. Wyniki przedstawiono jako poziom VEGF w pg/ml (średnia  $\pm$  SD z czterech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

# 13. Wpływ AKG na zdolności migracyjne komórek kostniakomięsaka

Z racji tego, że kostniakomięsak zaliczany jest do nowotworów silnie przerzutujących, w kolejnym etapie badań oceniono wpływ AKG (5, 10, 25, 50 mM) na zdolności migracyjne komórek linii Saos-2 i HOS metodą zarastania rysy. Po 24 godzinach inkubacji wykonano przyżyciowo dokumentację zdjęciową hodowli komórkowych linii Saos-2 (Ryc. 15 A-F) i HOS (Ryc. 16 A-F), zmierzono szerokości rysy i obliczono wielokrotność zahamowania migracji (Wykres 26).

Zaobserwowano, że AKG w całym zastosowanym zakresie stężeń, w sposób istotny statystycznie w porównaniu z kontrolą znacznie zahamował migrację komórek kostniakomięsaka obydwu linii (Wykres 26 A i B).

W najniższym badanym stężeniu, tj. 5 mM zahamował migrację komórek Saos-2 i HOS ok. 1,3-krotnie w porównaniu z kontrolą. Przy stężeniu 10 mM AKG obserwowano prawie 1,7-krotne zahamowanie migracji komórek Saos-2 i 1,6-krotne – komórek HOS. Zdolności migracyjne komórek Saos-2 oraz HOS zostały zahamowane ponad dwukrotnie w czasie inkubacji tych komórek z AKG w stężeniu 25 mM. Natomiast w stężeniu 50 mM, AKG zahamował migrację komórek Saos-2 2,3-krotnie, zaś komórek HOS – 2,5-krotnie (Wykres 26 A i B).



Ryc. 15. Wpływ AKG na zdolności migracyjne komórek linii Saos-2 po 24 godz. inkubacji. Test zarastania rysy (*scratch assay*) – reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe hodowli (powiększenie 40x). A – kontrola rysy (bezpośrednio po wykonaniu rysy), B - kontrola migracji komórek (0 mM AKG), C – 5 mM AKG, D – 10 mM AKG, E – 25 mM AKG, F – 50 mM AKG



Ryc. 16. Wpływ AKG na zdolności migracyjne komórek linii HOS po 24 godz. inkubacji. Test zarastania rysy (*scratch assay*) – reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe hodowli (powiększenie 40x). A – kontrola rysy (bezpośrednio po wykonaniu rysy), B - kontrola migracji komórek (0 mM AKG), C – 5 mM AKG, D – 10 mM AKG, E – 25 mM AKG, F – 50 mM AKG.



Wykres 26. Wpływ AKG na zdolności migracyjne komórek kostniakomięsaka linii Saos-2 (A) i HOS (B) po 24 godzinach inkubacji. Wyniki przedstawiono jako wielokrotność zahamowania migracji w stosunku do kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów, po cztery pomiary w każdym eksperymencie). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

### 14. Wpływ AKG na inwazyjność komórek kostniakomięsaka

Wysoka zdolność do przerzutowania kostniakomięsaka jest związana z dużą inwazyjnością jego komórek (Ando K., i in., 2012). W związku z powyższym, w ostatnim etapie badań określono wpływ AKG (5, 10, 25, 50 mM) na zdolności inwazyjne komórek linii Saos-2 i HOS w ciągu 24 godzin inkubacji.

Zaobserwowano, że AKG proporcjonalnie do użytego stężenia hamował inwazyjność komórek linii Saos-2 i HOS w sposób istotny statystycznie w porównaniu z kontrolą (Wykres 27 A i B). W przypadku linii Saos-2, AKG w stężeniu 5 mM zahamował inwazyjność komórek o ok.  $14 \pm 0.87\%$  w porównaniu z kontrolą, przy 10 mM – o  $23 \pm 1.97\%$ , przy 25 mM o  $36.5 \pm 1.28\%$ , natomiast przy 50 mM – o  $43 \pm 1.37\%$  (Wykres 27A). Nieco silniejszy anty-inwazyjny wpływ AKG zaobserwowano wobec komórek linii HOS. Kolejne stężenia AKG, tj. 5, 10, 25 i 50 mM zmniejszyły liczbę migrujących komórek w porównaniu z kontrolą odpowiednio o  $17 \pm 2.71\%$ ,  $29.5 \pm 2.19\%$ ,  $45 \pm 2.31\%$  oraz  $60.5 \pm 3.53\%$  (Wykres 27B).



Wykres 27. Wpływ AKG na inwazyjność komórek linii Saos-2 (A) i HOS (B) po 24 godz. inkubacji. Ilość komórek w kontroli, które migrowały przez membranę określono jako 100%. Wyniki przedstawiono jako % migrujących komórek w stosunku do kontroli (średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów). Różnica istotnie statystyczna w porównaniu z kontrolą przy p <0,001 (\*\*\*) – test one-way ANOVA, post test Dunnett'a.

### VII. Omówienie wyników i dyskusja

Kostniakomięsak jest najczęstszym pierwotnym nowotworem układu kostnego o wysokim stopniu złośliwości. OS stanowi mniej niż 1% wszystkich nowo zdiagnozowanych nowotworów u osób dorosłych i 3-5% u dzieci. Po białaczkach i chłoniakach, jest to najczęstsza pierwotna choroba nowotworowa u nastolatków. Około 60% przypadków tego raka występuje u pacjentów młodszych niż 25 lat (wstęp, rozdział 2.1. i 2.4.). Częstość występowania OS we wszystkich populacjach wynosi około 4 - 5 na 1 milion osób. Jest wyższa w okresie dojrzewania, bowiem u młodzieży w wieku 15 – 19 lat nowotwór ten stwierdza się u 8 - 11 na milion osób rocznie (Kamal A., i in., 2018; Ritter J. i Bielack S., 2010).

Obecnie 5-letnie przeżycie we wszystkich grupach pacjentów z OS o wysokim stopniu złośliwości wynosi 60 - 66%, ale zależy w dużym stopniu od stadium choroby w momencie rozpoznania. Współczynnik 5-letniego przeżycia u osób z umiejscowionym OS wynosi nawet 60 - 78%, ale drastycznie spada do 20 - 30% u pacjentów z chorobą przerzutową. U około 20% pacjentów rozwijają się przerzuty (wstęp, rozdział 2.4.). W związku z tym poszukuje się wciąż nowych środków, które mogłyby zwiększyć szanse przeżycia pacjentów z tym nowotworem.

W kostniakomięsaku zidentyfikowano wiele zaburzeń genetycznych (np. mutacje w genach TP53 i RB1) oraz nieprawidłowości molekularnych w głównych szlakach przekazywania sygnału (szlak IGF-RI, PI3K/Akt/mTOR, Wnt, Notch). Jedną z ostatnio odkrytych nieprawidłowości, która wydaje się być istotna w progresji tego nowotworu, są zaburzenia w ekspresji IDH1 i IDH2, tj. enzymów, które przekształcają izocytrynian do AKG. IDH uważa się za nowy supresor rozwoju nowotworu w różnych rodzajach raka, m.in. w glejaku, czerniaku czy raku pecherza moczowego (Memon A., i in., 2005; Cancer Genome Atlas Research Network, 2015; Ikota H., i in., 2015; Lian C., i in., 2012). Oprócz mutacji w genach IDH2, które wykryto w wielu przypadkach OS, w zmianach nowotworowych pobranych od pacjentów z OS stwierdza się często zmniejszoną ekspresję IDH1 dzikiego typu (Hu X., i in., 2010; Liu D., i in., 2017). Jak wykazano, tego typu zaburzenia w IDH mogą skutkować zmniejszeniem wewnątrzkomórkowego poziomu AKG oraz/lub powstawaniem onkometabolitu, 2-HG, co obniża lub hamuje aktywność enzymów zależnych od AKG (OGDDs). Wśród tych enzymów znajdują się m.in. PHDs, które regulują aktywność czynnika transkrypcyjnego HIF-1, będącego kluczowym czynnikiem związanym z promowaniem procesu nowotworzenia oraz enzymy uczestniczące w epigenetycznej modyfikacji chromatyny (KDM i TET) (Morin A., i in., 2014; Dang L., i in., 2009; Schaap F., i in., 2013).

W ostatnio przeprowadzonych badaniach wykazano, że zwiększenie ekspresji IDH1 w komórkach OS in vitro wywierało efekt przeciwnowotworowy (Hu X., i in., 2014). Ponadto, w badaniach na mysim modelu raka piersi oraz ludzkich liniach raka piersi wykazano, że zastosowanie farmakologicznego inhibitora (AA6) dehydrogenazy alfa-ketoglutaranowej, tj. enzymu przekształcającego AKG do bursztynylo-CoA, skutkowało akumulacją wewnątrzkomórkowego AKG i wywierało działanie przeciwnowotworowe (Atlante S., i in., 2018). Wyniki powyższych badań sugerują, że zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowego AKG może mieć efekt przeciwnowotworowy. Poziom AKG w komórkach można również zwiększyć poprzez suplementację egzogennym AKG, ponieważ wykazuje on zdolność swobodnej dyfuzji do komórek, chociaż ze względu na hydrofilowy charakter jego przenikalność przez błonę komórkowa jest stosunkowo słaba (Aussel C., i in., 1996; Tennant D., i in., 2009). Aktywność przeciwnowotworową egzogennego AKG potwierdzono zarówno w badaniach in vitro, jak i in vivo wobec raka płaskonabłonkowego, nerki, okrężnicy, wątroby, płuca, jelita grubego oraz czerniaka (Matsumoto K., i in., 2006; Matsumoto K., i in., 2009; MacKenzie E., i in., 2007; Tennant D., i in., 2009; Rzeski W., i in., 2012). Jednak jak dotychczas, nie badano jego działania wobec OS.

W niniejszej pracy, oceniano potencjał przeciwnowotworowy AKG wobec komórek ludzkiego kostniakomięsaka wykorzystując w tym celu dwie linie ciągłe tego nowotworu – Saos-2 i HOS. Zakres badań obejmował określenie wpływu AKG na proliferację komórek oraz przebieg cyklu komórkowego. Ponadto oceniano zdolność AKG do indukcji apoptozy i nekrozy w komórkach OS, a także jego wpływ na migrację i inwazyjność komórek kostniakomięsaka. Badano także mechanizmy molekularne związane z regulacją przez AKG cyklu komórkowego oraz jego proapoptotyczną aktywnością. Dodatkowo oceniono jego wpływ na poziom produkcji czynnika wzrostowego dla komórek OS, tj. TGF-β oraz proangiogennej cytokiny - VEGF.

Wstępny etap badań obejmował określenie wpływu szerokiego zakresu stężeń AKG na żywotność prawidłowych komórek ludzkich - fibroblastów skóry ludzkiej (linii HSF) oraz ludzkich osteoblastów (linii hFOB 1.19), w celu wybrania

do kolejnych etapów badań nietoksycznych stężeń związku dla komórek prawidłowych. Cytotoksyczność AKG oceniano na podstawie ilości uwalnianej z komórek do płynu hodowlanego dehydrogenazy mleczanowej (metoda LDH). AKG wykazywał niewielką toksyczność wobec komórek prawidłowych. Obniżał żywotność osteoblastów w stężeniach  $\geq$  75 mM, natomiast fibroblastów skóry – w stężeniu 200 mM. Zaobserwowana w powyższych badanich niewielka toksyczność AKG wobec komórek prawidłowych jest korzystną właściwością związku z punktu widzenia ewentualnego jej wykorzystania w leczeniu OS, ponieważ pozwala na zastosowanie dużych dawek związku bez dodatkowego, niekorzystnego wpływu na prawidłowe komórki kościotwórcze czy inne zdrowe komórki otaczające zmienioną tkankę. Ponadto, dane literaturowe potwierdzają bezpieczeństwo stosowania AKG *in vivo* u ludzi. Wykazano, że AKG stosowany u pacjentów z różnymi schorzeniami jako suplement żywieniowy, w dawkach 6 - 10 g/dzień nie wywoływał skutków ubocznych (Filip R., i in., 2007; Karsegard V., i in., 2004).

Jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych jest ich wysoka zdolność do proliferacji (Hanahan D. i Weinberg R., 2011). Z tego względu, w pierwszym etapie oceny działania AKG wobec OS określono jego wpływ na proliferację komórek obu linii kostniakomięsaka wykorzystując dwie metody: MTT (badającą aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w mitochondriach komórek) i BrdU (oceniającą poziom syntezy DNA w dzielących się komórkach). Zaobserwowano, że AKG proporcjonalnie do zastosowanego stężenia hamował proliferację komórek obu linii OS. W teście MTT, AKG już w stężeniu 2,5 mM zahamował w sposób istotny statystycznie proliferację komórek Saos-2, natomiast do wywołania analogicznego efektu w komórkach HOS potrzebne było dwukrotnie większe stężenie badanego związku, tj. 5 mM. Antyproliferacyjne działanie AKG potwierdzono dodatkowo metodą BrdU, a porównanie wartości IC<sub>50</sub> wyliczonych dla obydwu linii (IC<sub>50</sub> =  $35,41 \pm 0,17$  dla linii Saos-2 oraz IC<sub>50</sub> =  $35,37 \pm 0,19$  dla linii HOS) wykazało, że związek ten w porównywalnym stopniu hamuje podziały komórek obu linii kostniakomięsaka. Wyniki niniejszych badań są zgodne z badaniami zespołu Rzeskiego i in. (2012), którzy wykazali antyproliferacyjną aktywność AKG w stosunku do komórek trzech linii raka jelita grubego (Caco-2, HT-29 oraz LS180). Również w przypadku tego nowotworu, najniższe stężenie AKG, które zahamowało podziały komórek wynosiło 5 mM, natomiast IC<sub>50</sub> oznaczone w teście BrdU wynosiło od 55,3 mM do 67.8 mM, w zależności od rodzaju linii komórkowej raka jelita grubego (Rzeski., i in., 2012).

Rozwój nowotworu jest związany z zaburzeniami w regulacji cyklu komórkowego (Meeran S. i Katiyar S., 2008), stąd też zahamowanie przebiegu cyklu komórkowego jest często uważane za kluczowy mechanizm przeciwnowotworowego działania badanych substancji. Cykl komórkowy składa się z interfazy, którą stanowią fazy G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub> oraz mitozy. W fazie G<sub>1</sub> komórka przygotowuje się do podziału poprzez wzrost, ale może przejść również w fazę G<sub>0</sub> - fazę spoczynku. Podczas fazy S zachodzi replikacja DNA i każdy chromosom jest duplikowany, natomiast w fazie G<sub>2</sub> syntetyzowane są materiały potrzebne do mitozy, takie jak RNA i białka (Wenzel E. i Singh A., 2018). Aby określić, czy antyproliferacyjne działanie AKG wobec komórek OS było spowodowane jego zdolnością do regulowania przebiegu cyklu komórkowego, w kolejnym etapie badań określono wpływ związku (wybranych stężeń) na wspomniany proces biologiczny metodą cytometrii przepływowej. Wykazano, że AKG zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G<sub>1</sub> w obu liniach komórkowych OS. Otrzymane wyniki stały się podstawą do zanalizowania wpływu AKG na poziom ekspresji białek związanych z cyklem komórkowym – cykliny D1 oraz inhibitora kinaz zależnych od cyklin (CDK), białka p21 Waf1/Cip1.

Cyklina D1 jest ważnym regulatorem postępu cyklu komórkowego, tj. jego przejścia z fazy G<sub>1</sub> do S, a jej nadekspresja związana jest z rozwojem i progresją różnych rodzajów nowotworów, m.in. raka piersi, płuca czy pęcherza moczowego (Alao J., 2007). Poziom cykliny D1 w komórkach prawidłowych zaczyna zwiększać się we wczesnym etapie fazy G<sub>1</sub> i utrzymuje się aż do granicy fazy G<sub>1</sub>/S, po czym gwałownie spada. Cyklina ta aktywuje kinazy cyklinozależne, CDK4 oraz CDK6. Aktywne kompleksy cykliny D1 z CDK4 oraz CDK6 fosforylują białko RB, co umożliwia dysocjację czynników transkrypcyjnych E2F z kompleksu z pRB. Dzięki temu możliwe jest przejście do fazy S cyklu komórkowego (Qie S. i Diehl J., 2016). Nadekspresja cykliny D1 prowadzi do zaburzenia aktywności CDKs, szybkiego wzrostu komórek w warunkach ograniczonej sygnalizacji mitogennej, omijania kluczowych punktów kontrolnych podziałów komórek i ostatecznie do wzrostu nowotworu (Qie S. i Diehl J., 2016). Z kolei białko p21 Waf1/Cip1 jest negatywnym regulatorem przebiegu cyklu komórkowego, zatrzymującym cykl komórkowy w fazie G<sub>1</sub>. Białko to wiążąc się z kompleksem cyklina D/CDK4/6 hamuje aktywność CDKs i fosforylację pRB, co prowadzi do zahamowania replikacji DNA. Ponadto, p21 może bezpośrednio hamować replikację DNA poprzez odziaływanie z PCNA (jądrowym antygenem komórek proliferujących) i hamowanie jego interakcji z polimerazą DNA  $\delta$  oraz innymi białkami zaangażowanymi w syntezę DNA (Abbas T. i Dutta A., 2009; Cayrol C., i in., 1998). Ten hamujący efekt p21 Waf1/Cip1 działa w komórce jako mechanizm nadzoru w celu utrzymania integralności genomu (Meeran S. i Katiyar S., 2008).

W niniejszych badaniach zaobserwowano zdolność AKG do modulowania ekspresji zarówno cykliny D1, jak i p21 w komórkach OS. W komórkach linii Saos-2 odnotowano niską ekspresję cykliny D1 i tylko niewielkie obniżenie jej poziomu pod wpływem AKG. Natomiast AKG efektywnie zwiększył poziom p21 Waf1/Cip1 w komórkach tej linii. Głównym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję p21 jest białko p53, chociaż p21 może ulegać ekspresji niezależnie od p53 (Macleod K., i in., 1995). W linii komórkowej Saos-2 występuje mutacja genu kodującego białko p53 i nie wykrywa się tego białka w komórkach (Masuda H., i in., 1987). Z tego względu możemy przypuszczać, że AKG indukował zwiększenie ekspresji p21 Waf1/Cip1 w sposób niezależny od p53. Wyniki niniejsze są zgodne z badaniami Rzeskiego i in. (2012), w których AKG indukował ekspresję p21 Waf1/Cip1 w komórkach raka jelita grubego linii HT29 w sposób niezależny od p53 (Rzeski i in., 2012). Ponadto, uzyskane wyniki sugerują, że głównym mechanizmem, odpowiedzialnym za zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 w komórkach Saos-2 pod wpływem AKG było zwiększenie ekspresji białka p21 Waf1/Cip1, chociaż nie można wykluczyć jego wpływu na inne białka regulatorowe fazy G<sub>1</sub>.

Z kolei w komórkach linii HOS obserwowano wysoki poziom ekspresji cykliny D1 i znaczne obniżenie poziomu tego białka pod wpływem AKG. Natomiast AKG znacznie słabiej wpływał na poziom p21 Waf1/Cip1 w komórkach tej linii. Zwiększenie ekspresji p21 pod wpływem AKG w komórkach linii HOS występowało tylko po krótkim czasie inkubacji (6 godzin), natomiast po dłuższym czasie (24 i 48 godzin) jego poziom w komórkach obniżył się. Uzyskane wyniki sugerują, że zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub> w komórkach HOS było spowodowane głównie obniżeniem przez AKG poziomu cykliny D1. Również badania innych autorów przeprowadzone w modelu komórkowym raka jelita grubego wykazały, że AKG hamuje cykl komórkowy w fazie G<sub>1</sub> poprzez obniżenie poziomu cykliny D1 (Rzeski., i in., 2012). Powyższe dane sugerują, że AKG może powodować zatrzymanie podziałów komórek kostniakomięsaka w fazie  $G_1$  cyklu komórkowego poprzez wpływ na różne białka regulatorowe cyklu, w zależności od rodzaju komórek OS.

Komórki nowotworowe cechuja się znaczna opornościa na apoptozę ze względu na zaburzenia mechanizmów regulujących ten proces. Zatem indukowanie tego typu śmierci w komórkach nowotworowych uważane jest za ważny cel w terapii przeciwnowotworowej (Wong R., 2011). Głównym mechanizmem indukowania apoptozy w komórkach jest aktywacja kaskady kaspaz. Kaspazy inicjatorowe, takie jak kaspaza-8 lub -9, aktywowane w odpowiedzi na czynniki proapoptotyczne, są odpowiedzialne za aktywację efektorowej kaspazy-3, która jest niezbędna do propagacji sygnału apoptotycznego. Aktywacja kaspazy-8 zachodzi poprzez transbłonowe receptory śmierci (zewnętrzny szlak apoptozy), podczas gdy aktywacja kaspazy-9 jest wynikiem depolaryzacji błony mitochondrialnej (wewnętrzny szlak apoptozy) (Nuñez G., i in., 1998). W kolejnym etapie niniejszych badań analizowano zdolność AKG, do indukcji apoptozy lub/i nekrozy w komórkach kostniakomiesaka. Wykazano, że AKG proporcjonalnie do zastosowanego stężenia indukował apoptozę zarówno w komórkach linii Saos-2, jak i HOS, co prowadziło do aktywacji kaspazy-3 w tych komórkach. Co ciekawe, nawet najwyższe badane stężenie związku (50 mM) nie powodowało nekrozy komórek OS. Wykazano ponadto, że mechanizm indukowania apoptozy przez AKG w komórkach kostniakomięsaka był związany głównie z aktywacją kaspazy-9, natomiast w mniejszym stopniu związek ten aktywował kaspazę-8.

Znanymi regulatorami potencjału błony mitochondrialnej i tym samym wewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy są białka z rodziny Bcl-2 (Martinou J. i Green D., 2001). Spośród wielu białek tej rodziny, ważną rolę w depolaryzacji błony mitochondrialnej pełnią dwa białka – działające anty-apoptotycznie Bcl-2 i pro-apoptotyczne białko Bax. Pod wpływem sygnałów proapoptotycznych, występujące w cytoplazmie monomeryczne białko Bax tworzy oligomer, który wbudowuje się w zewnętrzną błonę mitochondrialną powodując zwiększenie jej przepuszczalności i uwalnianie różnych białek apoptotycznych z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium, m.in. cytochromu c. Cytochrom c wraz z białkiem Apaf tworzą apoptosom, tj. komleks aktywujący kaspazę-9 (Wei M., i in., 2001). Natomiast białko Bcl-2, zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondrialnej hamuje apoptozę (Yang J., i in., 1997). Wyniki niniejszych badań wykazały, że AKG

indukował zwiększenie ekspresji białka Bax, natomiast w mniejszym stopniu wpływał na ekspresję białka Bcl-2, obniżając jego poziom dopiero w najwyższym badanym stężeniu, tj. 50 mM. Uzyskane wyniki sugerują, że proapoptotyczne działanie AKG było związane z jego zdolnością do zaburzenia równowagi w proporcji sygnałów pro- i anty-apoptotycznych w komórkach kostniakomięsaka, co skutkowało aktywacją kaspazy-9 oraz -3 i indukowaniem apoptotycznej śmieci komórek OS. Jak dotychczas wyniki tylko kilku prac sugerowały, że zwiększenie poziomu AKG w komórkach może indukować apoptozę w komórkach nowotworowych. Tennant i in. (2009 i 2010) wykazali, że pod wpływem AKG suplementowanego w postaci estrów, następowało zwiększenie degradacji podjednostki HIF-1α i przywrócenie aktywności PHDs, co skutkowało indukowaniem apoptozy w komórkach nowotworowych zarówno in vitro, jak i in vivo (Tennant D., i in., 2009; Tennant D. i Gottlieb E., 2010). Ponadto, w innych badaniach wykazano, że zwiększenie ekspresji IDH1 (przekształcającej izocytrynian do AKG) w komórkach dwóch linii kostniakomięsaka (MG63 i 143B) skutkowało znacznym zwiększeniem ilości białka Bax w komórkach, obniżeniem poziomu Bcl-2 oraz aktywacja kaspazy-9 i -3. W efekcie, zwiększenie ekspresji IDH1 w komórkach MG63 i 143B indukowało apoptozę oraz hamowało proliferację komórek kostniakomięsaka (Hu X., i in., 2014). Przypuszcza się, że zaobserwowane efekty mogły być związane z przywróceniem prawidłowej ilości AKG w komórce (Hu X., i in., 2014).

Aby określić molekularne mechanizmy działania AKG w komórkach linii Saos-2, w kolejnym etapie niniejszych badań zbadano wpływ AKG na poziom fosforylacji (aktywacji) kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPKs). MAPKs są kluczowymi elementami szlaków sygnałowych przekazujących sygnały mitogenne do jądra w odpowiedzi na różne bodźce zewnątrzkomórkowe (Boutros T., i in., 2008). Do MAPKs zalicza się trzy grupy kinaz: ERK1/2 oraz JNK i p38 (Zhang W. i Liu H., 2002; Boldt S., i in., 2002). Kaskada ERK reaguje głównie na stymulację czynnikami wzrostu i zwykle jest identyfikowana jako kluczowy mediator proliferacji i przeżycia komórek (Chambard J., i in., 2007). Ponadto, sygnalizacja ERK może, w zależności od rodzaju komórki, regulować różnicowanie, migrację, angiogenezę czy remodelację chromatyny (Dhillon A., i in., 2007). Dwie inne cząsteczki sygnałowe, p38 i JNK, aktywowane w wyniku działania różnych czynników stresogennych (takich jak UV, stres genotoksyczny, szok osmotyczny, toksyny, infekcja, jak również cytokiny) wywierają w komórkach głównie efekt proapoptotyczny (Boutros T., i in., 2008; Dhillon A., i in., 2007).

Wyniki niniejszych badań wykazały, że AKG hamował fosforylację ERK1/2 w komórkach Saos-2 proporcjonalnie do zastosowanego stężenia, natomiast zwiększał aktywację kinazy JNK. Ponadto, selektywny inhibitor kinazy JNK (SP600125) zastosowany przed dodaniem AKG częściowo obniżył poziom apoptozy w komórkach Saos-2 oraz całkowicie zahamował aktywację kinazy indukowaną przez AKG. Tym samym potwierdzono, że istotnym mechanizmem indukowania przez AKG apoptozy w komórkach OS była jego zdolność do aktywacji JNK.

JNK może promować apoptozę poprzez dwa różne mechanizmy, tzw. jądrowy i mitochondrialny. W pierwszym z nich, aktywowana kinaza JNK ulega translokacji do jądra i fosforyluje (aktywuje) białko c-Jun, które wraz z białkiem c-Fos tworzy następnie czynnik transkrypcyjny AP-1. AP-1 reguluje transkrypcję wielu różnych białek, m.in. białek działających pro-apoptotycznie (TNF-α, Fas-L, Bak). JNK może również fosforylować inne czynniki transkrypcyjne, m.in. działające pro-apoptotycznie p53 i p73 (Dhanasekaran D. i Reddy E., 2008). drugim mechanizmie, aktywowana JNK może przemieszczać się do W mitochondriów i modulować aktywność białek pro- i anty-apoptotycznych. JNK poprzez fosforylację pro-apoptotycznych białek Bim i Bad antagonizuje przeciwapoptotyczną aktywność białka Bcl-2 lub Bcl-xl. Ponadto, JNK może stymulować uwalnianie cytochromu c i aktywację kaspazy-9 poprzez aktywację proapoptotycznych białek Bax, Bid i Bim. Jak wykazano, JNK zwiększa również ekspresję pro-apoptotycznego białka Bax (Dhanasekaran D. i Reddy E., 2008; Papadakis E., i in., 2006).

Jak wspomniano, szlak sygnałowy kinazy ERK1/2 jest kluczowym czynnikiem zaangażowanym w proliferację komórek nowotworowych i odpowiada również za występowanie lekooporności u chorych na raka (McCubrey J., i in., 2007). Aktywowana ERK1/2 przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie fosforyluje różne białka i czynniki transkrypcyjne (m.in. CREB, c-Myc, AP-1, NF-κB), powodując zaburzenia w ekspresji wielu genów. Wykazano, że aktywacja ERK1/2 odpowiada m.in. za zwiększenie ekspresji cyklin (A, D1, E) i czynników wzrostu, aktywację CDKs oraz zmniejszenie ekspresji białek hamujących cykl komórkowy (p27, p16, p53), hamując tym samym przebieg cyklu komórkowego (Chang F., i in., 2003a; McCubrey J., i in., 2007). Ponadto, aktywacja ERK1/2

w większości przypadków hamuje apoptozę poprzez zwiększenie ekspresji Bcl-2 oraz zmniejszenie poziomu pro-apoptotycznego białka Bad (Lu Z. i Xu S., 2006). W kostniakomięsaku aktywacja szlaku sygnałowego ERK jest zaangażowana m.in. w przerzutowanie tego nowotworu do płuc (Yu Y., i in., 2011). W wielu badaniach wykazano, że zahamowanie aktywacji ERK1/2 indukowało apoptozę w komórkach OS i hamowało przerzutowanie (Noh K., i in., 2011; Sasaki K., i in., 2011; Yu Y., i in. 2011). Ponadto, w badaniach *in vivo* na modelach zwierzęcych stwierdzono, że specyficzne inhibitory szlaku sygnałowego ERK1/2 (PD98059, Sorafenib) wykazują działanie przeciwnowotworowe w kostniakomięsaku, powodując m.in. wolniejszy wzrost guza, zahamowanie przerzutowania oraz przedłużenie życia zwierząt (Chandhanayingyong C., i in., 2012).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki sugerują, że AKG indukował apoptozę w komórkach OS *in vitro* poprzez aktywację JNK oraz obniżenie aktywności ERK1/2. Ponadto, zmniejszenie aktywności ERK1/2 przez AKG mogło przyczynić się do zahamowania cyklu komórkowego w komórkach kostniakomięsaka.

W kolejnym etapie pracy oceniono wpływ AKG na aktywację kinazy białkowej Akt. Badany związek obniżał poziom aktywacji Akt, hamując fosforylację dwóch reszt aminkwasowych (Ser473 oraz Thr308), kluczowych dla aktywacji tej kinazy.

Uważa się, że szlak sygnałowy PI3K/Akt jest jednym z najważniejszych szlaków zaangażowanych w rozwój nowotworów. Kinaza Akt, aktywowana przez różne sygnały przyżyciowe, może hamować apoptozę poprzez fosforylację i inaktywację pro-apoptotycznych mediatorów, takich jak Bad, kaspaza-9 czy czynnik transkrypcyjny FOXO3a (forkhead box-O3a), który uczestniczy w apoptozie indukowanej przez białko Bim. Ponadto, Akt może hamować aktywację białka Bax oraz zwiększać ekspresję cykliny D1 (Chang F. i in. 2003b; Altomare D. i Testa J., 2005). Z drugiej strony, aktywacja Akt powoduje zwiększenie w komórce poziomu białek anty-apoptotycznych, takich jak Bcl-2 oraz Bcl-xl (Atif F., i in., 2015). Szlak PI3K/Akt jest często hiperaktywowany w OS i przyczynia się do inicjacji i rozwoju choroby, w tym do zapoczątkowania nowotworzenia, stymulowania proliferacji, inwazyjności, progresji cyklu komórkowego, hamowania apoptozy, indukowania angiogenezy, przerzutowania i oporności na chemioterapię (Zhang J., i in., 2015b). W kilku badaniach *in vitro* wykazano, że aktywacja szlaku PI3K/Akt jest w stanie zwiększyć ekspresję cykliny D1, a następnie zahamować apoptozę komórek OS

i promować wzrost komórek (Zhang Y., i in., 2013; Zhou R., i in., 2011). Z tego względu, zahamowanie szlaku PI3K/Akt przez różne związki stanowi atrakcyjny cel terapeutyczny w OS (Zhang J., i in., 2015b). Wykazano np., że allosteryczny inhibitor Akt indukował apoptozę i hamował wzrost komórek ludzkiego kostniakomięsaka *in vitro* poprzez blokowanie szlaku Akt/mTORC1 oraz aktywację JNK, p53 oraz kaspazy-3 (Yao C., i in., 2013). Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach sugerują, że hamowanie aktywacji Akt stanowiło istotny element przeciwnowotworowej aktywności AKG wobec komórek ludzkiego kostniakomięsaka *in vitro* i mogło być zaangażowane zarówno w indukowanie apoptozy przez ten związek, jak i zatrzymanie przebiegu cyklu komórkowego.

Jak wspomniano powyżej, sygnalizacja ERK może również stymulować migrację komórek nowotworowych oraz angiogenezę (Dhillon A., i in., 2007). Podobnie szlak sygnałowy PI3K/Akt pełni istotną rolę w indukowaniu angiogenezy i przerzutowaniu komórek nowotworowych (Zhang J., i in., 2015b). W niniejszych badaniach wykazano, że AKG hamował aktywację zarówno kinazy ERK1/2, jak i Akt, dlatego w kolejnych etapach badań oceniono wpływ AKG na migrację i inwazyjność komórek obu linii kostniakomięsaka oraz wytwarzanie przez komórki OS czynników wzrostu istotnych w promowaniu przerzutowania oraz angiogenezy, tj. TGF-β oraz VEGF.

TGF-β jest czynnikiem promującym rozwój nowotworu w późniejszych stadiach jego rozwoju. Kaskada sygnałowa z udziałem TGF-β stymuluje przejście epitelialno-mezenchymalne, inwazyjność komórek oraz ich przerzutowanie, a także ucieczkę nowotworu spod nadzoru układu immunologicznego (Katsuno Y., i in., 2013; Meulmeester E. i Ten Dijke P., 2011). Udowodniono, że szlak sygnałowy TGFβ/Smad jest aktywowany w zmianach nowotworowych pacjentów z OS oraz odgrywa kluczową rolę w progresji przerzutów kostniakomięsaka (Lamora A., i in., 2014). Ponadto wykazano, że zablokowanie szlaku sygnałowego TGFβ/Smad w mysim modelu kostniakomięsaka spowalnia wzrost guza kości głównie poprzez wpływ na mikrośrodowisko nowotworowe, a także hamuje tworzenie przerzutów do płuc w wyniku zmniejszania ekspresji i aktywacji MMP-2 oraz hamowania migracji i inwazyjności komórek (Lamora A., i in., 2014). W innych badaniach wykazano z kolei, że zablokowanie szlaków sygnałowych ERK i PI3K/Akt redukuje ekspresję

TGF-β, a także czynników pro-angiogennych, takich jak bFGF oraz HGF w mysiej linii kostniakomięsaka (Tsubaki M., i in., 2011).

Z kolei VEGF jest jednym z najważniejszych czynników promujących proces angiogenezy (Chandolu V. i Dass C., 2012). Powstawanie nowych naczyń krwionośnych jest fundamentalnym zdarzeniem w procesie wzrostu guza i jego przerzutowaniu, a szlak sygnałowy VEGF jest jednym z kluczowych regulatorów tego procesu. Związanie VEGF z jego receptorem na komórkach śródbłonka uruchamia sygnały, które promują wzrost komórek śródbłonka z istniejącego układu naczyniowego, ich migrację, przeżycie i różnicowanie. Ponadto, VEGF pośredniczy zwiększeniu przepuszczalności naczyń, co ułatwia wnikanie komórek W nowotworowych do światła naczynia. VEGF uczestniczy również w mobilizowaniu komórek progenitorowych śródbłonka ze szpiku kostnego do odległych miejsc neowaskularyzacji (Lee S., i in., 2015). Ze względu na swoją główną rolę w neoangiogenezie nowotworowej, szlak sygnałowy VEGF jest istotnym celem terapii przeciwnowotworowej (Rajabi M. i Mousa S., 2017). Aktywacja szlaku VEGF pełni również ważną rolę w patogenezie kostniakomięsaka (Chen D., i in., 2013; Yang J., i in., 2011). Jak wykazano ostatnio, wyciszenie ekspresji VEGF w komórkach ludzkiego kostniakomięsaka skutkowało zahamowaniem proliferacji komórek i indukowaniem w nich apoptozy in vitro oraz zahamowaniem wzrostu guza i angiogenezy in vivo poprzez inaktywację szlaku sygnałowego PI3K/Akt (Zhao J., i in., 2015).

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wykazały, że AKG zmniejszył wytwarzanie zarówno TGF-β, jak i VEGF przez komórki Saos-2 i HOS. Ponadto, związek ten w całym zastosowanym zakresie stężeń znacznie zahamował migracje i inwazyjność komórek kostniakomięsaka obu linii. Wyniki te są zgodne z badaniami Matsumoto i in., w których AKG obniżał wytwarzanie VEGF oraz hamował ekspresje HIF-1 $\alpha$  w komórkowym modelu raka watrobowokomórkowego (Hep3B) oraz w modelu raka płuca Lewisa (LLC). Badacze ci wykazali ponadto, że AKG zmniejszał ekspresję genu Vegf w komórkach LLC oraz hamował wzrost guza i angiogenezę in vivo. Dodatkowo, AKG wzmacniał działanie 5-fluorouracylu (Matsumoto K., i in., 2006; Matsumoto K., i in., 2009). Z kolei Hu i in. w swoich badaniach zaobserwowali, iż zwiększenie poziomu IDH1 skutkowało zahamowaniem proliferacji, migracji i inwazyjności komórek oraz indukowaniem w nich apoptozy. Również w badaniu in vivo zwiększenie ekspresji IDH1 zahamowało wzrost guza oraz proces przerzutowania (Hu X i in., 2014). Ponadto, Atlante i in. (2018) wykazali, że zastosowanie inhibitora dehydrogenazy alfaketoglutaranowej prowadziło do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu AKG i zwiększenia aktywności enzymów epigenetycznych zależnych od AKG. Wynikiem zależnego od enzymów epigenetycznych przeprogramowania metabolicznego w komórkach nowotworowych było zahamowanie procesu przejścia mezenchymalno-epitelialnego (EMT), tj. wstępnego etapu inwazyjności komórek, zmniejszenie ekspresji MMP-3 i w konsekwencji zahamowanie przerzutowania (Atlante S., i in., 2018). Możemy zatem przypuszczać, iż zaopatrzenie komórek kostniakomięsaka w egzogenny AKG w niniejszych badaniach mogło mieć efekt podobny do zwiększenia poziomu IDH1 w komórkach lub zastosowania inhibitora dehydrogenazy alfa-ketoglutaranowej i skutkować zahamowaniem migracji i inwazyjności komórek OS. Wyniki uzykane w niniejszych badaniach sugerują, że AKG może być obiecującym środkiem terapeutycznym w hamowaniu angiogenezy oraz przerzutowania kostniakomięsaka.

Podsumowując, w badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy zaobserwowano, że AKG wywierał działanie egzogenny przeciwnowotworowe wobec komórek kostniakomięsaka in vitro. Zdolność AKG do zaburzania ekspresji białek związanych z cyklem komórkowym (cyklina D1, p21 Waf1/Cip1) oraz białek związanych z apoptozą (Bax, Bcl-2, kaspaza-8, -9, -3) prowadziła do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub>, indukowania apoptozy i zahamowania proliferacji komórek kostniakomięsaka. AKG wykazywał proapoptotyczne działanie poprzez aktywację JNK oraz prawdopodobnie poprzez zmniejszenie aktywacji kinaz ERK1/2 i Akt. Ponadto, AKG obniżał wytwarzanie TGF-β i VEGF przez komórki kostniakomięsaka oraz hamował ich migrację i inwazyjność.

Uzyskane wyniki potwierdzają zaobserwowany w nielicznych badaniach przeciwnowotworowy potencjał alfa-ketoglutaranu i sugerują, że AKG może hamować zarówno wzrost jak i przerzutowanie kostniakomięsaka. AKG jest związkiem bezpiecznym dla organizmu człowieka, wykazującym wiele właściwości biologicznych, jednakże słabo przebadanym pod względem aktywności przeciwnowotworowej. Na podstawie dostępnej literatury, jak i wyników powyższych badań można stwierdzić, iż słuszne byłoby prowadzenie dalszych prac nad przeciwnowotworową aktywnością AKG, zwłaszcza w modelach zwierzęcych kostniakomięsaka. Dokładne określenie aktywności przeciwnowotworowej AKG mogłoby się przyczynić do zastosowania tego związku jako środka wspomagającego leczenie kostniakomięsaka. Wyniki badań otrzymane w ramach niniejszej rozprawy jednoznacznie świadczą o aktywności przeciwnowotworowej alfa-ketoglutaranu wobec komórek ludzkiego kostniakomięsaka.

## VIII. Wnioski

- 1. AKG wykazuje aktywność przeciwnowotworową wobec kostniakomięsaka *in vitro*.
- AKG może hamować wzrost OS ze względu na zdolność do zatrzymywania cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub>, indukowania apoptozy i hamowania proliferacji komórek tego nowotworu.
- AKG zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G<sub>1</sub> w komórkach OS poprzez zaburzanie ekspresji białek związanych z tą fazą cyklu, tj. cykliny D1 i inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1.
- AKG indukuje apoptozę w komórkach OS poprzez aktywację kinazy JNK, podwyższenie poziomu proapoptotycznego białka Bax, obniżenie poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz aktywację kaspazy-9, -8 i -3.
- 5. Ze względu na zdolność do obniżania aktywacji kinaz ERK1/2 i Akt w komórkach kostniakomięsaka AKG może zaburzać szlak sygnałowy ERK oraz PI3K/Akt i wywierać działanie proapoptotyczne, antyproliferacyjne, hamować migrację i inwazyjność komórek OS oraz angiogenezę.
- AKG wykazuje potencjał do hamowania przerzutowania OS, ponieważ obniża poziom produkcji TGF-β i VEGF oraz hamuje migrację i zmniejsza inwazyjność komórek tego nowotworu.
### IX. Streszczenie

Kostniakomięsak (OS) jest najczęstszym pierwotnym nowotworem układu kostnego o wysokim stopniu złośliwości. OS stanowi mniej niż 1% wszystkich nowo zdiagnozowanych nowotworów u osób dorosłych i 3-5% u dzieci. Po białaczkach i chłoniakach, jest to najczęstsza pierwotna choroba nowotworowa u nastolatków. Fenotypowe czynniki ryzyka powstania OS związane są z rozwojem fizjologicznym i są to zarówno wysoki wzrost, jak i duża masa urodzeniowa. Z kolei zaburzenia genetyczne (mutacje) występujące powszechnie w przypadkach OS dotyczą głównie genów supresorowych nowotworów, takich jak: *TP53*, *RB1*, *PTEN* oraz *IDH*. W ok. 60% przypadków OS leczenie przynosi korzystne efekty, jednak u ok. 40% pacjentów jest to nowotwór silnie przerzutujący, oporny na chemioterapię, dający gorsze rokowanie. Dlatego poszukuje się wciąż nowych środków terapeutycznych, które mogłyby zwiększyć rokowania pacjentów z tym nowotworem.

Obiecującym związkiem wydaje się być alfa-ketoglutaran (AKG). AKG jest metabolitem pośrednim w cyklu Krebsa. Jako donor energii pełni kluczową rolę metabolizmie energetycznym komórek zwierzęcych. Oprócz funkcji w metabolicznych, AKG pełni w organizmie funkcje niemetaboliczne, związane z regulacją procesów epigenetycznych i sygnalingu komórkowego. AKG ma zdolność regulowania aktywności czynnika transkrypcyjnego HIF, odpowiedzialnego za rozwój i progresję nowotworów. Ponadto, AKG wpływa na aktywność enzymów uczestniczących w epigenetycznej modyfikacji chromatyny. Badania sugerują, że wzrost ilości wewnątrzkomórkowego AKG może mieć działanie przeciwnowotworowe.

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności przeciwnowotworowej egzogennego AKG wobec ludzkiego kostniakomięsaka z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych tego nowotworu: Saos-2 i HOS.

W badaniach określono wpływ AKG na żywotność komórek prawidłowych (ludzkich fibroblastów skóry linii HSF i ludzkich osteoblastów linii hFOB 1.19) testem LDH oraz na proliferację komórek Saos-2 i HOS testem MTT i BrdU. Za pomocą cytometrii przepływowej oraz barwienia PI/RNAzą zbadano wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego oraz oceniono jego zdolność do indukcji apoptozy lub/i nekrozy (barwieniem aneksyną V-FITC i PI) w komórkach obu linii OS. Wpływ AKG na poziom białek związanych z cyklem komórkowym (cykliny D1 oraz p21 Waf1/Cip1) określono metodą ELISA. Zbadano również jego zdolność do aktywacji kaspazy-3 (metodą cytometrii przepływowej), kaspazy -8 i -9 (metodą Western blott oraz cytometrii przepływowej) oraz wpływ na ekspresję białek związanych z wewnętrznym szlakiem apoptozy, tj. Bax i Bcl-2 (metodą Western blott). W celu zbadania mechanizmu działania AKG w komórkach OS, w kolejnym etapie oceniono (metodą ELISA) jego zdolność do modulowania poziomu fosforylacji kinaz MAP (JNK, ERK1/2, p38) oraz kinazy białkowej Akt w komórkach linii Saos-2. Określono również (metodą ELISA) wpływ AKG na poziom produkcji TGF-β, tj. czynnika wzrostu dla komórek OS i cytokiny stymulującej migrację, inwazyjność i przerzutowanie tego nowotworu. Ponadto, zbadano (metodą ELISA) wpływ AKG na wytwarzanie pro-angiogennej cytokiny, tj. VEGF, przez komórki OS. Wpływ AKG na migrację komórek kostniakomięsaka oceniono testem zarastania rysy, natomiast inwazyjność - metodą wykorzystującą migrację komórek przez membranę pokrytą macierzą błony podstawnej.

Uzyskane wyniki wykazały, że AKG jest związkiem mało toksycznym dla komórek prawidłowych. AKG hamował proliferację komórek Saos-2 i HOS proporcjonalnie do zastosowanego stężenia. Związek ten zatrzymywał cykl komórkowy w fazie G<sub>1</sub> w obu liniach OS, obniżał poziom ekspresji cykliny D1 w komórkach linii HOS, natomiast zwiększał poziom ekspresji inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 w komórkach Saos-2. Ponadto, AKG indukował apoptozę w komórkach kostniakomięsaka poprzez aktywację kaspazy-9, -8, -3, zwiększenie ekspresji białka proapoptotycznego Bax i obniżenie poziomu białka antyapoptotycznego Bcl-2. AKG aktywował kinazę JNK, natomiast hamował aktywację ERK1/2 i Akt w komórkach linii Saos-2. Wykazano również, że AKG indukował apoptozę w komórkach Saos-2 poprzez aktywację kinazy JNK, ponieważ specyficzny inhibitor tej kinazy (SP600125) całkowicie zahamował aktywację kinazy indukowaną przez AKG oraz częściowo obniżył poziom apoptozy indukowanej przez AKG w komórkach Saos-2. Ponadto, AKG obniżył poziom produkcji TGF-β i VEGF oraz hamował migrację i inwazyjność komórek obu linii kostniakomięsaka.

Otrzymane w niniejszej rozprawie wyniki badań *in vitro* wskazują na potencjał przeciwnowotworowy AKG wobec komórek kostniakomięsaka. AKG aktywuje JNK i może w ten sposób indukować apoptozę w komórkach OS. Ponadto, obniżenie aktywności ERK1/2 przez AKG może hamować progresję cyklu

komórkowego i proliferację komórek tego nowotworu. Dodatkowo, obniżenie aktywności ERK1/2 oraz Akt pod wpływem AKG może przyczyniać się zarówno do indukowania apoptozy, jak też hamowania migracji i inwazyjności komórek OS oraz zahamowania angiogenezy. Uzyskane wyniki sugerują, że AKG może hamować zarówno wzrost kostniakomięsaka, jak też proces jego przerzutowania.

### X. Abstract

Osteosarcoma (OS) is the most common primary malignancy of the skeletal system with a high grade of malignancy. OS represents less than 1% of all newly diagnosed cancers in adults and 3-5% in children. After leukemias and lymphomas, it is the most common primary cancer in adolescents. The phenotypic risk factors for developing OS are associated with physiological development and are both tall stature and high birth weight. In turn, genetic disorders (mutations) that are common in OS mainly involve tumor suppressor genes, such as *TP53*, *RB1*, *PTEN*, and *IDH*. In about 60% of OS cases, treatment has beneficial effects, whereas in about 40% of patients the cancer is highly metastatic, resistant to chemotherapy, and poses a worse prognosis. Therefore, new therapeutic agents that could improve the prognosis of patients with this cancer are still being sought.

Alpha-ketoglutarate (AKG) appears to be a promising compound. It is an intermediate metabolite in the Krebs cycle. This energy donor plays a key role in the energy metabolism in animal cells. AKG has both metabolic and non-metabolic functions in the organism. Its non-metabolic functions are related to the regulation of epigenetic processes and cellular signaling. AKG has the ability to regulate the activity of the HIF transcription factor, which is responsible for the development and progression of tumors. In addition, AKG affects the activity of enzymes involved in the epigenetic modification of chromatin. It is suggested that the increase in the amount of intracellular AKG may have an anticancer effect.

The aim of this study was to assess the anticancer activity of exogenous AKG against human osteosarcoma using two cell lines of this tumor: Saos-2 and HOS.

The effect of AKG on the viability of normal cells (human fibroblast cell line HSF and human osteoblast cell line hFOB 1.19) was evaluated with the LDH assay. Anti-proliferative activity of AKG against Saos-2 and HOS cells was assessed with the MTT and BrdU methods. The effect of AKG on progression of the cell cycle was examined by means of flow cytometry and PI/RNAase staining. Its ability to induce apoptosis or/and necrosis in both OS cell lines was evaluated by annexin V-FITC/PI double labelling and cytometric analysis. The effect of AKG on the level of cell cycle-associated proteins (cyclin D1 and p21 Waf1/Cip1) was determined by ELISA. Moreover, the AKG ability to activate caspase-3 (evaluated by flow cytometry), and caspases -8 and -9 (by Western blot and flow cytometry) as well as the effect on the expression of proteins associated with the intrinsic pathway of apoptosis, i.e. Bax and Bcl-2 (Western blot), were investigated. To examine the mechanism of AKG activity in OS cells, the AKG ability to modulate the phosphorylation level of MAP kinases (JNK, ERK1/2, p38) and Akt kinase (by ELISA assay) in Saos-2 cells was investigated. The influence of AKG on production of TGF- $\beta$  (growth factor for OS cells and cytokine stimulating cell migration, invasiveness, and metastasis) was also determined by ELISA. Moreover, the effect of AKG on production of pro-angiogenic cytokine VEGF by OS cells was investigated (by ELISA). The effect of AKG on osteosarcoma cell migration was assessed by a scratch wound healing assay, whereas invasiveness was evaluated by a basement membrane extract (BME) cell invasion assay.

The results showed that AKG exhibited low toxicity against normal cells. AKG inhibited proliferation of Saos-2 and HOS cells in a concentration dependent manner. This compound blocked the cell cycle progression at the G<sub>1</sub> stage in both OS lines, decreased the expression of cyclin D1 in HOS cells, and increased the level of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 Waf1/Cip1 in Saos-2 cells. In addition, AKG induced apoptosis in osteosarcoma cells by activation of caspase-9, -8, and -3, increasing the expression of the pro-apoptotic protein Bax, and decreasing the level of the anti-apoptotic Bcl-2 protein. AKG increased JNK phosphorylation and inhibited ERK1/2 and Akt activation in the Saos-2 cells. AKG has also been shown to induce apoptosis in Saos-2 cells by activating JNK kinase, as a specific inhibitor of this kinase (SP600125) completely inhibited AKG-induced kinase activation and partially reduced AKG-induced apoptosis in Saos-2 cells. In addition, AKG decreased production of TGF- $\beta$  and VEGF and inhibited cell migration and invasiveness of both osteosarcoma lines.

The *in vitro* results obtained in this study indicate the anticancer potential of AKG against osteosarcoma cells. AKG activates JNK and can thus induce apoptosis in OS cells. Moreover, the reduction of ERK1/2 activity by AKG may inhibit the progression of the cell cycle and cancer cell proliferation. In addition, the AKG-induced reduction of ERK1/2 and Akt activity may contribute to induction of apoptosis, inhibition of OS cell migration and invasion, and inhibition of angiogenesis. The study results suggest that AKG can inhibit both osteosarcoma growth and metastasis.

## XI. Piśmiennictwo

- 1. Abbas T, Dutta A. (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.*, 9(6): 400-14.
- 2. Abdeen A, Chou AJ, Healey JH, Khanna C, Osborne TS, Hewitt SM, Kim M, Wang D, Moody K, Gorlick R. (2009) Correlation between clinical outcome and growth factor pathway expression in osteogenic sarcoma. *Cancer.*, 115(22): 5243-50.
- 3. Adam J, Yang M, Soga T, Pollard PJ. (2014) Rare insights into cancer biology. *Oncogene.*, 33(20): 2547-56.
- 4. Adamopoulos C, Gargalionis AN, Basdra EK, Papavassiliou AG. (2016) Deciphering signaling networks in osteosarcoma pathobiology. *Exp Biol Med (Maywood)*., 241(12): 1296-305.
- 5. Agarwal M. (red.) (2012) Osteosarcoma, rozdział 1: Trihia H, Valavanis C. Histopathology and molecular pathology of bone and extraskeletal osteosacomas. InTech, Rijeka, 3-40.
- 6. Alao JP. (2007) The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer.*, 6: 24.
- Alfranca A, Martinez-Cruzado L, Tornin J, Abarrategi A, Amaral T, de Alava E, Menendez P, Garcia-Castro J, Rodriguez R. (2015) Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell Mol Life Sci.*, 72(16): 3097-113.
- 8. Altomare DA, Testa JR. (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene.*, 24(50): 7455-64.
- 9. American Joint Committee on Cancer (2010) AJCC cancer staging manual, 7<sup>th</sup> edn. Spinger, New York, 281-87.
- 10. Ando K, Mori K, Verrecchia F, Marc B, Rédini F, Heymann D. (2012) Molecular alterations associated with osteosarcoma development. *Sarcoma*., 2012: 523432.
- 11. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, Kroep JR, Taminiau AH, Hogendoorn PC, Egeler RM. (2011) Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur J Cancer.*, 47(16): 2431-45.
- 12. Aoki M, Nishio J, Iwasaki H, Masaki M, Kawakami Y, Nishino T, Ohjimi H, Tamura H, Nabeshima K, Naito M. (2014) Osteosarcoma of the patella mimicking giant cell tumor: Imaging features with histopathological correlation. *Anticancer Res.*, 34: 2541-2545.
- 13. Atif F, Yousuf S, Stein DG. (2015) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 146: 62-73.
- 14. Atlante S, Visintin A, Marini E, i in. (2018) α-ketoglutarate dehydrogenase inhibition counteracts breast cancer-associated lung metastasis. *Cell Death Dis.*, 9(7): 756.
- 15. Aussel C, Coudray-Lucas C, Lasnier E, Cynober L, Ekindjian OG. (1996) Alpha-ketoglutarate uptake in human fibroblasts. *Cell Biol Int.*, 20(5): 359-63.
- 16. Bacci G, Longhi A, Versari M, Mercuri M, Briccoli A, Picci P. (2006) Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer.*, 106(5): 1154-61.
- 17. Bajpai J, Sharma M, Sreenivas V, Kumar R, Gamnagatti S, Khan SA, Rastogi S, Malhotra A, Bakhshi S. (2009) VEGF expression as a prognostic marker in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.*, 53(6): 1035-9.
- Beckerman R, Prives C. (2010) Transcriptional regulation by p53. Cold Spring Harb Perspect Biol., 2(8): a000935.
- 19. Bhattacharya R, Satpute RM, Hariharakrishnan J, Tripathi H, Saxena PB. (2009) Acute toxicity of some synthetic cyanogens in rats and their response to oral treatment with alpha-ketoglutarate. *Food Chem Toxicol.*, 47(9): 2314-20.
- 20. Bhattacharya R, Rao PV, Vijayaraghavan R. (2002) In vitro and in vivo attenuation of experimental cyanide poisoning by alpha-ketoglutarate. *Toxicol Lett.*, 128(1-3): 185-95.

- 21. Bielack S, Kempf-Bielack B, Delling G, i in. (2002) Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1702 patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol.*, 20: 776-90.
- 22. Bielack S, Jürgens H, Jundt G, Kevric M, Kühne T, Reichardt P, Zoubek A, Werner M, Winkelmann W, Kotz R. (2009) Osteosarcoma: the COSS experience. *Cancer Treat Res.*, 152: 289-308.
- 23. Blachier F, Boutry C, Bos C, Tomé D. (2009) Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *Am J Clin Nutr.*, 90(3): 814S-821S.
- 24. Boldt S, Weidle UH, Kolch W. (2002) The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs. *Carcinogenesis.*, 23(11): 1831-8.
- 25. Botter SM, Neri D, Fuchs B. (2014) Recent advances in osteosarcoma. *Curr Opin Pharmacol.*, 16: 15-23.
- 26. Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, i in. (2015) Revisiting Li-Fraumeni syndrome from TP53 mutation carriers. *J Clin Oncol.*, 33(21): 2345-52.
- 27. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. (2008) Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev.*, 60(3): 261-310.
- 28. Brière JJ, Favier J, Bénit P, El Ghouzzi V, Lorenzato A, Rabier D, Di Renzo MF, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P. (2005) Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1alpha nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum Mol Genet.*, 14(21): 3263-9.
- 29. Brugnara L, Vinaixa M, Murillo S, Samino S, Rodriguez MA, Beltran A, Lerin C, Davison G, Correig X, Novials A. (2012) Metabolomics approach for analyzing the effects of exercise in subjects with type 1 diabetes mellitus. *PLoS One.*, 7(7): e40600.
- 30. Brunelle JK, Letai A. (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.*, 122(4): 437-41.
- Buddington RK, Pajor A, Buddington KK, Pierzynowski S. (2004) Absorption of alphaketoglutarate by the gastrointestinal tract of pigs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, 138(2): 215-20.
- 32. Burrin DG, Stoll B. (2009) Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am J Clin Nutr.*, 90(3): 850S-856S.
- 33. Burrow S, Andrulis IL, Pollak M, Bell RS. (1998) Expression of insulin-like growth factor receptor, IGF-1, and IGF-2 in primary and metastatic osteosarcoma. *J Surg Oncol.*, 69(1): 21-7.
- 34. Cai Y, Cai T, Chen Y. (2014) Wnt pathway in osteosarcoma, from oncogenic to therapeutic. *J Cell Biochem.*, 115(4): 625-31.
- 35. Campanacci M. (2013) Bone and soft tissue tumors: clinical features, imaging, pathology and treatment. Spinger, Berlin, 463-515.
- 36. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, i in. (2015) Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med.*, 372(26): 2481-98.
- 37. Cargnello M, Roux PP. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 75(1): 50-83.
- 38. Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. (1998) p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene.*, 16(3): 311-20.
- 39. Chambard JC, Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta.*, 1773(8): 1299-310.
- 40. Chandhanayingyong C, Kim Y, Staples JR, Hahn C, Lee FY. (2012) MAPK/ERK signaling in osteosarcomas, Ewing sarcomas and chondrosarcomas: therapeutic implications and future directions. *Sarcoma.*, 2012: 404810.
- 41. Chandolu V, Dass CR. (2012) Cell and molecular biology underpinning the effects of PEDF on cancers in general and osteosarcoma in particular. *J Biomed Biotechnol.*, 2012: 740295.

- 42. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. (2003a) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.*, 17(7): 1263-93.
- 43. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. (2003b) Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia.*, 17(3): 590-603.
- 44. Chen D, Zhang YJ, Zhu KW, Wang WC. (2013) A systematic review of vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol.*, 34(3): 1895-9.
- 45. Chen S, Yang L, Pu F, Lin H, Wang B, Liu J, Shao Z. (2015) High birth weight increases the risk for bone tumor: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Public Health.*, 12(9): 11178-95.
- 46. Chen C, Zhao M, Tian A, Zhang X, Yao Z, Ma X. (2015) Aberrant activation of Wnt/β-catenin signaling drives proliferation of bone sarcoma cells. *Oncotarget.*, 6(19): 17570-83.
- 47. Christensen BC, Marsit CJ, Houseman EA, i in. (2009) Differentiation of lung adenocarcinoma, pleural mesothelioma, and nonmalignant pulmonary tissues using DNA methylation profiles. *Cancer Res.*, 69(15): 6315-21.
- 48. Clark JC, Dass CR, Choong PF. (2008) A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 134(3): 281-97.
- 49. Cooper AJ, Kristal BS. (1997) Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem.*, 378(8): 793-802.
- 50. Cooper AJ, Kuhara T. (2014)  $\alpha$ -Ketoglutaramate: an overlooked metabolite of glutamine and a biomarker for hepatic encephalopathy and inborn errors of the urea cycle. *Metab Brain Dis.*, 29(4): 991-1006.
- 51. Dadia S, Grimer R. (2007) Characteristics, diagnosis and treatment of bone and soft tissue sarcomas. *Br J Hosp Med (Lond).*, 68(11): 589-93.
- 52. Dai ZL, Li XL, Xi PB, Zhang J, Wu G, Zhu WY. (2013) L-Glutamine regulates amino acid utilization by intestinal bacteria. *Amino Acids.*, 45(3): 501-12.
- 53. Damron TA, Ward WG, Stewart A. (2007) Osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma: National Cancer Data Base Report. *Clin Orthop Relat Res.*, 459: 40-7.
- 54. Dang L, White DW, Gross S, i in. (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.*, 462(7274): 739-44.
- 55. Dang L, Yen K, Attar EC. (2016) IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann Oncol.*, 27(4): 599-608.
- 56. Dawson MA, Kouzarides T. (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell.*, 150(1): 12-27.
- 57. Dąbek M, Kruszewska D, Filip R, Hotowy A, Pierzynowski Ł, Wojtasz-Pajak A, Szymanczyk S, Valverde Piedra JL, Werpachowska E, Pierzynowski SG. (2005) alpha-Ketoglutarate (AKG) absorption from pig intestine and plasma pharmacokinetics. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*., 89(11-12): 419-26.
- 58. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*., 104(49): 19345-50.
- 59. Degterev A, Boyce M, Yuan J. (2003) A decade of caspases. Oncogene., 22(53): 8543-67.
- 60. Dhanasekaran DN, Reddy EP. (2008) JNK signaling in apoptosis. Oncogene., 27(48): 6245-51.
- 61. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.*, 26(22): 3279-90.

- 62. Donnarumma F, Wintersteiger R, Schober M, Greilberger J, Matzi V, Maier A, Schwarz M, Ortner A. (2013) Simultaneous quantitation of alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural in plasma by HPLC with UV and fluorescence detection. *Anal Sci.*, 29(12): 1177-82.
- 63. Durfee RA, Mohammed M, Luu HH. (2016) Review of osteosarcoma and current management. *Rheumatol Ther.*, 3: 221-243.
- 64. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. (1980) A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res.*, 153: 106-120.
- 65. Federman N, Bernthal N, Eilber FC, Tap WD. (2009) The multidisciplinary management of osteosarcoma. *Curr Treat Options Oncol.*, 10(1-2): 82-93.
- 66. Feinberg AP, Koldobskiy MA, Göndör A. (2016) Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet.*, 17(5): 284-99.
- 67. Filip RS, Pierzynowski SG, Lindegard B, Wernerman J, Haratym-Maj A, Podgurniak M. (2007) Alpha-ketoglutarate decreases serum levels of C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX) in postmenopausal women with osteopenia: six-month study. *Int J Vitam Nutr Res.*, 77(2): 89-97.
- 68. Filip R, Pierzynowski S. (2007) The role of glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate in gut metabolism and the potential application in medicine and nutrition. *J Pre Clin Res.*, 1(1): 9-15.
- 69. Filip R, Pierzynowski SG. (2008) The absorption, tissue distribution and excretion of enteraly administered alpha-ketoglutarate in rats. *J Anim Physiol Anim Nurt (Berl).*, 92(2): 182-9.
- 70. Flashman E, Hoffart LM, Hamed RB, Bollinger JM Jr, Krebs C, Schofield CJ. (2010) Evidence for the slow reaction of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 with oxygen. *FEBS J.*, 277(19): 4089-99.
- Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Martens F, (red.) (2013) WHO classification of tumours of soft tissue and bone, rozdział: Rosenberg AE, Cleton-Jansen AM, de Pinieux G. Conventional OS. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 282-8.
- 72. Fox MG, Trotta BM. (2013) Osteosarcoma: review of the various types with emphasis on recent advancements in imaging. *Semin Musculoskelet Radiol.*, 17: 123-36.
- 73. Friebele JC, Peck J, Pan X, Abdel-Rasoul M, Mayerson JL. (2015) Osteosarcoma: a metaanalysis and review of the literature. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*., 44(12): 547-53.
- 74. Geller DS, Gorlick R. (2010) Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin Adv Hematol Oncol.*, 8(10): 705-18.
- 75. Gill J, Ahluwalia MK, Geller D, Gorlick R. (2013) New targets and approaches in osteosarcoma. *Pharmacol Ther.*, 137(1): 89-99.
- 76. Gorlick R. (2009) Current concepts on the molecular biology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res.*, 152: 467-78.
- 77. Gräff J, Mansuy IM. (2008) Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res.*, 192(1): 70-87.
- 78. Grimer RJ. (2005) Surgical options for children with osteosarcoma. Lancet Oncol., 6(2): 85-92.
- 79. Grimer RJ, Cannon SR, Taminiau AM, i in. (2003) Osteosarcoma over the age of forty. *Eur J Cancer.*, 39(2): 157-63.
- 80. Grzesiak P, Słupecka-Ziemilska M, Woliński J. (2016) The biological role of a-ketoglutaric acid in physiological processes and its therapeutic potential. *Dev Period Med.*, 20(1): 61-7.
- 81. Haddox CL, Han G, Anijar L, Binitie O, Letson GD, Bui MM, Reed DR. (2014) Osteosarcoma in pediatric patients and young adults: a single institution retrospective review of presentation, therapy, and outcome. *Sarcoma.*, 2014: 402509.
- 82. Hameed O, Wei S, Siegal GP. (2011) Frozen Section Library: Bone. Frozen Section Library, Springer, Nowy Jork, 5-23.

- 83. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*, 144(5): 646-74.
- 84. Harrison AP, Pierzynowski SG. (2008) Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art review article. *J Physiol Pharmacol.*, 59 Suppl 1: 91-106.
- 85. Harrison AP, Tygesen MP, Sawa-Wojtanowicz B, Husted S, Tatara MR. (2004) Alphaketoglutarate treatment early in postnatal life improves bone density in lambs at slaughter. *Bone.*, 35(1): 204-9.
- Harting MT, Lally KP, Andrassy RJ, Vaporciyan AA, Cox CS Jr, Hayes-Jordan A, Blakely ML. (2010) Age as a prognostic factor for patients with osteosarcoma: an analysis of 438 patients. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 136(4): 561-70.
- 87. Hoffmann I, Roatsch M, Schmitt ML, Carlino L, Pippel M, Sippl W, Jung M. (2012) The role of histone demethylases in cancer therapy. *Mol Oncol.*, 6(6): 683-703.
- 88. Hou Y, Wang L, Ding B, Liu Y, Zhu H, Liu J, Li Y, Wu X, Yin Y, Wu G. (2010) Dietary alphaketoglutarate supplementation ameliorates intestinal injury in lipopolysaccharide-challenged piglets. *Amino Acids.*, 39(2): 555-64.
- 89. Hou Y, Wang L, Ding B, Liu Y, Zhu H, Liu J, Li Y, Kang P, Yin Y, Wu G. (2011) Alphaketoglutarate and intestinal function. *Front Biosci (Landmark Ed).*, 16: 1186-96.
- 90. Hu X, Yu AX, Qi BW, Fu T, Wu G, Zhou M, Luo J, Xu JH. (2010) The expression and significance of IDH1 and p53 in osteosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res.*, 29: 43.
- 91. Hu X, Liu Y, Qin C, Pan Z, Luo J, Yu A, Chengb Z. (2014) Up-regulated isocitrate dehydrogenase 1 suppresses proliferation, migration and invasion in osteosarcoma: In vitro and in vivo. *Cancer Lett.*, 346(1): 114-21.
- 92. Hughes DP. (2009) How the NOTCH pathway contributes to the ability of osteosarcoma cells to metastasize. *Cancer Treat Res.*, 152: 479-96.
- 93. Hwu WL, Chiang SC, Chang MH, Wang TR. (2000) Carnitine transport defect presenting with hyperammonemia: report of one case. *Acta Paediatr Taiwan.*, 41(1): 36-8.
- 94. Ikota H, Nobusawa S, Arai H, Kato Y, Ishizawa K, Hirose T, Yokoo H. (2015) Evaluation of IDH1 status in diffusely infiltrating gliomas by immunohistochemistry using anti-mutant and wild type IDH1 antibodies. *Brain Tumor Pathol.*, 32(4): 237-44.
- 95. Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick G. (2015) Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success. *J Clin Oncol.*, 33(27): 3029-35.
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.*, 466(7310): 1129-33.
- 97. Jentzsch T, Robl B, Husmann M, Bode-Lesniewska B, Fuchs B. (2014) Worse prognosis of osteosarcoma patients expressing IGF-1 on a tissue microarray. *Anticancer Res.*, 34(8): 3881-9.
- 98. Jin Z, Liu Y. (2018) DNA methylation in human diseases. Genes Dis., 5(1): 1-8.
- 99. Junghans P, Derno M, Pierzynowski S, Hennig U, Eberhard Rudolph P, Souffrant WB. (2006) Intraduodenal infusion of alpha-ketoglutarate decreases whole body energy expenditure in growing pigs. *Clin Nutr.*, 25(3): 489-96.
- 100. Kaelin WG Jr, McKnight SL. (2013) Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell.*, 153(1): 56-69.
- 101. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.*, 30(4): 393-402.
- 102. Kaelin WG Jr. (2005) The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun.*, 338(1): 627-38.

- 103. Kamal AF, Pranatha DY, Sugito W, Rahman F, Susanto E, Mariya S, Chen WM. (2018) Isolation, culture and characterization of cancer stem cells from primary osteosarcoma. *Open Stem Cell J.*, 5: 1-13.
- 104. Kang HJ, Lee YM, Jeong YJ, Park K, Jang M, Park SG, Bae KH, Kim M, Chung SJ. (2008) Large-scale preparation of active caspase-3 in E. coli by designing its thrombin-activatable precursors. *BMC Biotechnol.*, 8: 92.
- Kansara M, Thomas DM. (2007) Molecular pathogenesis of osteosarcoma. DNA Cell Biol., 26(1): 1-18.
- 106. Karsegard VL, Raguso CA, Genton L, Hirschel B, Pichard C. (2004) L-ornithine alphaketoglutarate in HIV infection: effects on muscle, gastrointestinal, and immune functions. *Nutrition.*, 20(6): 515-20.
- 107. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. (2013) TGF-β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol.*, 25(1): 76-84.
- Kerr DA, Lopez HU, Deshpande V, Hornicek FJ, Duan Z, Zhang Y, Rosenberg AE, Borger DR, Nielsen GP. (2013) Molecular distinction of chondrosarcoma from chondroblastic osteosarcoma through IDH1/2 mutations. *Am J Surg Pathol.*, 37(6): 787-95.
- Klein MJ, Siegal GP. (2006) Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. Am J Clin Pathol., 125: 555-581.
- 110. Kleinerman RA, Schonfeld SJ, Tucker MA. (2012) Sarcomas in hereditary retinoblastoma. *Clin Sarcoma Res.*, 2(1): 15.
- 111. Kowalik S, Śliwa E, Tatara MR, Krupski W, Majcher P, Studziński T. (2005) Influence of alphaketoglutarate on mineral density and geometrical and mechanical parameters of femora during postnatal life in piglets. *B Vet I Pulawy.*, 49: 107-11.
- 112. Krebs HA, Johnson WA. (1980) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *FEBS Lett.*, 117: K1-10.
- 113. Kristensen NB, Jungvid H, Fernández JA, Pierzynowski SG. (2002) Absorption and metabolism of alpha-ketoglutarate in growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).*, 86(7-8): 239-45.
- 114. Lambert BD, Filip R, Stoll B, Junghans P, Derno M, Hennig U, Souffrant WB, Pierzynowski S, Burrin DG. (2006) First-pass metabolism limits the intestinal absorption of enteral alphaketoglutarate in young pigs. *J Nutr.*, 136(11): 2779-84.
- 115. Lammli J, Fan M, Rosenthal HG, Patni M, Rinehart E, Vergara G, Ablah E, Wooley PH, Lucas G, Yang SY. (2012) Expression of vascular endothelial growth factor correlates with the advance of clinical osteosarcoma. *Int Orthop.*, 36(11): 2307-13.
- 116. Lamora A, Talbot J, Mullard M, Brounais-Le Royer B, Redini F, Verrecchia F. (2016) TGF-β signaling in bone remodeling and osteosarcoma progression. *J Clin Med.*, 5(11): E96.
- 117. Lamora A, Talbot J, Bougras G, i in. (2014) Overexpression of smad7 blocks primary tumor growth and lung metastasis development in osteosarcoma. *Clin Cancer Res.*, 20(19): 5097-112.
- 118. Lamplot J, Denduluri S, Qin J, i in. (2013) The current and future therapies for human osteosarcoma. *Curr Cancer Ther Rev.*, 9(1): 55-77.
- 119. Larizza L, Roversi G, Volpi L. (2010) Rothmund-Thomson syndrome. Orphanet J Rare Dis., 5: 2.
- 120. Le Boucher J, Eureng, Cynober LA. (1998) Ornithine alpha-ketoglutarate: the puzzle. *Nutrition.*, 14(11-12): 870-3.
- 121. Lee SH, Jeong D, Han YS, Baek MJ. (2015) Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Ann Surg Treat Res.*, 89(1): 1-8.
- 122. Leibowitz A, Klin Y, Gruenbaum BF, i in. (2012) Effects of strong physical exercise on blood glutamate and its metabolite 2-ketoglutarate levels in healthy volunteers. *Acta Neurobiol Exp* (*Wars*)., 72(4): 385-96.
- 123. Lian CG, Xu Y, Ceol C, i in. (2012) Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell.*, 150(6): 1135-46.

- 124. Limmahakhun S, Pothacharoen P, Theera-Umpon N, Arpornchayanon O, Leerapun T, Luevitoonvechkij S, Pruksakorn D. (2011) Relationships between serum biomarker levels and clinical presentation of human osteosarcomas. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 12(7): 1717-22.
- 125. Lindsey BA, Markel JE, Kleinerman ES. (2017) Osteosarcoma overview. *Rheumatol Ther.*, 4(1): 25-43.
- 126. Liu DC, Zheng X, Zho Y, Yi WR, Li ZH, Hu X, Yu AX. (2017) HIF-1α inhibits IDH-1 expression in osteosarcoma. *Oncol Rep.*, 38(1): 336-42.
- 127. Liu S, He L, Yao K. (2018) The antioxidative function of alpha-ketoglutarate and its applications. *Biomed Res Int.*, 2018: 3408467.
- 128. Liu X, Kato Y, Kaneko MK, Sugawara M, Ogasawara S, Tsujimoto Y, Naganuma Y, Yamakawa M, Tsuchiya T, Takagi M. (2013) Isocitrate dehydrogenase 2 mutation is a frequent event in osteosarcoma detected by a multi-specific monoclonal antibody MsMab-1. *Cancer Med.*, 2(6): 803-14.
- 129. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. (2010) HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells.*, 29(5): 435-42.
- Loenarz C, Schofield CJ. (2011) Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends Biochem Sci.*, 36(1): 7-18.
- 131. Lohmann D. (2010) Retinoblastoma. Adv Exp Med Biol., 685: 220-7.
- 132. Lu L, Jin W, Liu H, Wang LL. (2014) RECQ DNA helicases and osteosarcoma. Avd Exp Med Biol., 804: 129-45.
- 133. Lu Z, Xu S. (2006) ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life.*, 58(11): 621-31.
- 134. Luther GA, Lamplot J, Chen X, i in. (2013) IGFBP5 domains exert distinct inhibitory effects on the tumorigenicity and metastasis of human osteosarcoma. *Cancer Lett.*, 336(1): 222-30.
- 135. MacEwen EG, Pastor J, Kutzke J, Tsan R, Kurzman ID, Thamm DH, Wilson M, Radinsky R. (2004) IGF-1 receptor contributes to the malignant phenotype in human and canine osteosarcoma. *J Cell Biochem.*, 92(1): 77-91.
- MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, Watson DG, Gottlieb E. (2007) Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol.*, 27(9): 3282-9.
- Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.*, 9(8): 935-44.
- 138. Mailloux RJ, Singh R, Brewer G, Auger C, Lemire J, Appanna VD. (2009) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant alpha-ketoglutarate during oxidative stress in Pseudomonas fluorescens. *J Bacteriol.*, 191(12): 3804-10.
- 139. Manning AL, Dyson NJ. (2011) pRB, a tumor suppressor with a stabilizing presence. *Trends Cell Biol.*, 21(8): 433-41.
- 140. Martin JW, Squire JA, Zielenska M. (2012) The genetics of osteosarcoma. Sarcoma., 2012: 627254.
- 141. Martin M, Ferrier B, Baverel G. (1989) Transport and utilization of alpha-ketoglutarate by the rat kidney in vivo. *Pflugers Arch.*, 413(3): 217-24.
- 142. Martinou JC, Green DR. (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2(1): 63-7.
- 143. Marulanda GA, Henderson ER, Johnson DA, Letson GD, Cheong D. (2008) Orthopedic surgery options for the treatment of primary osteosarcoma. *Cancer Control.*, 15(1): 13-20.
- 144. Masuda H, Miller C, Koeffler HP, Battifora H, Cline MJ. (1987) Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA*., 84(21): 7716-9.

- 145. Matsumoto K, Imagawa S, Obara N, Suzuki N, Takahashi S, Nagasawa T, Yamamoto M. (2006) 2-Oxoglutarate downregulates expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin through decreasing hypoxia-inducible factor-1alpha and inhibits angiogenesis. J Cell Physiol., 209(2): 333-40.
- 146. Matsumoto K, Obara N, Ema M, Horie M, Naka A, Takahashi S, Imagawa S. (2009) Antitumor effects of 2-oxoglutarate through inhibition of angiogenesis in a murine tumor model. *Cancer Sci.*, 100(9): 1639-47.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, i in. (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.*, 1773(8): 1263-84.
- 148. McDonough MA, Loenarz C, Chowdhury R, Clifton IJ, Schofield CJ. (2010) Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Curr Opin Struct Biol.*, 20(6): 659-72.
- 149. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 5(4): a008656.
- 150. Meeran SM, Katiyar SK. (2008) Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci.*, 13: 2191-202.
- 151. Memon AA, Chang JW, Oh BR, Yoo YJ. (2005) Identification of differentially expressed proteins during human urinary bladder cancer progression. *Cancer Detect Prev.*, 29(3): 249-55.
- 152. Meng H, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, Shi Y, Cao L. (2015) DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci.*, 11(5): 604-17.
- 153. Meulmeester E, Ten Dijke P. (2011) The dynamic roles of TGF-β in cancer. *J Pathol.*, 223(2): 205-18.
- 154. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. (2009a) Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer.*, 115: 1531-43.
- 155. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. (2009b) International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer.*, 125(1): 229-34.
- 156. Mirabello L, Pfeiffer R, Murphy G, i in. (2011) Height and diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma. *Cancer Causes Control.*, 22: 899-908.
- 157. Mohaghegh P, Hickson I. (2001) DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Hum Mol Genet.*, 10(7): 741-6.
- 158. Moore DD, Luu HH. (2014) Osteosarcoma. Cancer Treat Res., 162: 65-92.
- 159. Morello E, Martano M, Buracco P. (2011) Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. *Vet J.*, 189: 268-77.
- Moriarity BS, Otto GM, Rahrmann EP, i in. (2015) A Sleeping Beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis. *Nat Genet.*, 47(6): 615-24.
- 161. Morin A, Letouzé E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. (2014) Oncometabolites-driven tumorigenesis: from genetics to targeted therapy. *Int J Cancer.*, 135(10): 2237-48.
- 162. Navid F, Letterio JJ, Yeung CL, Pegtel M, Helman LJ. (2000) Autocrine transforming growth factor-beta growth pathway in murine osteosarcoma cell lines associated with inability to affect phosphorylation of retinoblastoma protein. *Sarcoma.*, 4(3): 93-102.
- 163. Nekrutenko A, Hillis DM, Patton JC, Bradley RD, Baker RJ. (1998) Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family. *Mol Biol Evol.*, 15(12): 1674-84.
- 164. Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R. (2003) Glutamine and glutamate their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.*, 21(1): 1-9.
- 165. Nishijo K, Nakayama T, Aoyama T, i in. (2004) Mutation analysis of the RECQL4 gene in sporadic osteosarcomas. *Int J Cancer.*, 111(3): 367-72.

- 166. Noh K, Kim KO, Patel NR, Staples JR, Minematsu H, Nair K, Lee FY. (2011) Targeting inflammatory kinase as an adjuvant treatment for osteosarcomas. *J Bone Joint Surg Am.*, 93(8): 723-32.
- 167. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.*, 17(25): 3237-45.
- Oertel S, Blattmann C, Rieken S, Jensen A, Combs SE, Huber PE, Bischof M, Kulozik A, Debus J, Schulz-Ertner D. (2010) Radiotherapy in the treatment of primary osteosarcoma a single center experience. *Tumori.*, 96(4): 582-8.
- 169. Ohba T, Cates JM, Cole HA, Slosky DA, Haro H, Ando T, Schwartz HS, Schoenecker JG. (2014) Autocrine VEGF/VEGFR1 signaling in a subpopulation of cells associates with aggressive osteosarcoma. *Mol Cancer Res.*, 12(8): 1100-11.
- 170. Opferman JT, Kothari A. (2018) Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ.*, 25(1): 37-45.
- 171. Osasan S, Zhang M, Shen F, Paul PJ, Persad S, Sergi C. (2016) Osteogenic sarcoma: a 21st century review. *Anticancer Res.*, 36: 4391-4398.
- 172. Otoukesh B, Boddouhi B, Moghtadaei M, Kaghazian P, Kaghazian M. (2018) Novel molecular insights and new therapeutic strategies in osteosarcoma. *Cancer Cell Int.*, 18: 158.
- 173. Ottaviani G, Jaffe N. (2010) The epidemiology of osteosarcoma. Cancer Treat Res., 152: 3-13.
- 174. Ottaviani G, Jaffe N. (2009) The etiology of osteosarcoma. Cancer Treat Res., 152: 15-32.
- 175. Pan KL, Chan WH, Chia YY. (2010) Initial symptoms and delayed diagnosis of osteosarcoma around the knee joint. *J Orthop Surg (Hong Kong).*, 18(1): 55-7.
- 176. Pan Y, Mansfield KD, Bertozzi CC, Rudenko V, Chan DA, Giaccia AJ, Simon MC. (2007) Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxiainducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol.*, 27(3): 912-25.
- 177. Papadakis ES, Finegan KG, Wang X, Robinson AC, Guo C, Kayahara M, Tournier C. (2006) The regulation of Bax by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) is a prerequisite to the mitochondrial-induced apoptotic pathway. *FEBS Lett.*, 580(5): 1320-6.
- 178. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. (2013) Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 5(6). pii: a008672.
- 179. Perry JA, Kiezun A, Tonzi P, i in. (2014) Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*., 111(51): E5564-73.
- 180. Porta C, Paglino C, Mosca A. (2014) Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. Front Oncol., 4: 64.
- 181. Pucci B, Kasten M, Giordano A. (2000) Cell cycle and apoptosis. Neoplasia., 2(4): 291-9.
- 182. Qie S, Diehl JA. (2016) Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl).*, 94(12): 1313-26.
- 183. Radzki RP, Bieńko M, Pierzynowski SG. (2009) Effect of dietary alpha-ketoglutarate on blood lipid profile during hypercholesterolaemia in rats. *Scand J Clin Lab Invest.*, 69(2): 175-80.
- 184. Rajabi M, Mousa SA. (2017) The role of angiogenesis in cancer treatment. *Biomedicines.*, 5(2). pii: E34.
- Rajendram R, Preedy VR, Patel VB. (red.) (2015) Glutamine in clinical nutrition, rozdział 19: Li C. Insulin secretion and the glutamine-glutamate-alpha-ketoglutarate axis. Humana Press, New York, 239-54.
- 186. Raymond AK, Jaffe N. (2009) Osteosarcoma multidisciplinary approach to the management from pathologist's perspective. *Cancer Treat Res.*, 152: 63-84.
- 187. Ren W, Gu G. (2017) Prognostic implications of RB1 tumour suppressor gene alterations in the clinical outcome of human osteosarcoma: a meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl).*, 26(1).
- 188. Rickel K, Fang F, Tao J. (2017) Molecular genetics of osteosarcoma. Bone., 102: 69-79.

- 189. Ritter J, Bielack SS. (2010) Osteosarcoma. Ann Oncol., 7: vii320-vii325.
- 190. Robertson KD. (2005) DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet., 6(8): 597-610.
- 191. Robinson LE, Bussière FI, Le Boucher J, Farges MC, Cynober LA, Field CJ, Baracos VE. (1999) Amino acid nutrition and immune function in tumour-bearing rats: a comparison of glutamine-, arginine- and ornithine 2-oxoglutarate-supplemented diets. *Clin Sci (Lond)*., 97(6): 657-69.
- 192. Rocchiccioli F, Leroux JP, Cartier PH. (1984) Microdetermination of 2-ketoglutaric acid in plasma and cerebrospinal fluid by capillary gas chromatography mass spectrometry; application to pediatrics. *Biomed Mass Spectrom.*, 11(1): 24-8.
- 193. Roe DS, Roe CR, Brivet M, Sweetman L. (2000) Evidence for a short-chain carnitineacylcarnitine translocase in mitochondria specifically related to the metabolism of branched-chain amino acids. *Mol Genet Metab.*, 69(1): 69-75.
- 194. Rzeski W, Walczak K, Juszczak M, Langner E, Pożarowski P, Kandefer-Szerszeń M, Pierzynowski SG. (2012) Alpha-ketoglutarate (AKG) inhibits proliferation of colon adenocarcinoma cells in normoxic conditions. *Scand J Gastroenterol.*, 47(5): 565-71.
- 195. Salabei JK, Lorkiewicz PK, Holden CR, Li Q, Hong KU, Bolli R, Bhatnagar A, Hill BG. (2015) Glutamine regulates cardiac progenitor cell metabolism and proliferation. *Stem Cells.*, 33(8): 2613-27.
- 196. Salvesen GS. (2002) Caspases and apoptosis. Essays Biochem., 38: 9-19.
- 197. Sasaki K, Hitora T, Nakamura O, Kono R, Yamamoto T. (2011) The role of MAPK pathway in bone and soft tissue tumors. *Anticancer Res.*, 31(2): 549-53.
- 198. Savage SA, Mirabello L. (2011) Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology. *Sarcoma.*, 2011: 548151.
- 199. Schaap FG, French PJ, Bovée JV. (2013) Mutations in the isocitrate dehydrogenase genes IDH1 and IDH2 in tumors. *Adv Anat Pathol.*, 20(1): 32-8.
- 200. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun.*, 338(1): 617-26.
- 201. Sciacovelli M, Gonçalves E, Johnson TI, i in. (2016) Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature.*, 537(7621): 544-7.
- Scully SP, Ghert MA, Zurakowski D, Thompson RC, Gebhardt MC. (2002) Pathologic fracture in osteosarcoma : prognostic importance and treatment implications. *J Bone Joint Surg Am.*, 84-A(1): 49-57.
- Semenza GL. (2013) HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. J Clin Invest., 123(9): 3664-71.
- 204. Simpson S, Dunning MD, de Brot S, Grau-Roma L, Mongan NP, Rutland CS. (2017) Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Vet Scand.*, 59: 71.
- 205. Smith MA, Seibel NL, Altekruse SF, Ries LA, Melbert DL, O'Leary M, Smith FO, Reaman GH. (2010) Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. J Clin Oncol., 28(15): 2625-34.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. (2010) UICC International Union Against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumors. New York, Wiley-Blackwell, 153-6.
- 207. Su Y, Wagner ER, Luo Q, i in. (2011) Insulin-like growth factor binding protein 5 suppresses tumor growth and metastasis of human osteosarcoma. *Oncogene.*, 30(37): 3907-17.
- 208. Tatara MR, Krupski W, Tymczyna B, Studziński T. (2012) Effects of combined maternal administration with alpha-ketoglutarate (AKG) and β-hydroxy-β-methylbutyrate (HMB) on prenatal programming of skeletal properties in the offspring. *Nutr Metab (Lond)*., 9(1): 39.
- 209. Tennant DA, Frezza C, MacKenzie ED, i in. (2009) Reactivating HIF prolyl hydroxylases under hypoxia results in metabolic catastrophe and cell death. *Oncogene.*, 28(45): 4009-21.

- 210. Tennant DA, Gottlieb E. (2010) HIF prolyl hydroxylase-3 mediates alpha-ketoglutarate-induced apoptosis and tumor suppression. *J Mol Med (Berl)*., 88(8): 839-49.
- 211. Tsubaki M, Yamazoe Y, Yanae M, Satou T, Itoh T, Kaneko J, Kidera Y, Moriyama K, Nishida S. (2011) Blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathways by statins reduces the expression of bFGF, HGF, and TGF-β as angiogenic factors in mouse osteosarcoma. *Cytokine.*, 54(1): 100-7.
- 212. Tulsawani R, Kumar D, Bhattacharya R. (2007) Effect of pre-treatment of alpha-ketoglutarate on cyanide-induced toxicity and alterations in various physiological variables in rodents. *Biomed Environ Sci.*, 20(1): 56-63.
- 213. Vatrinet R, Leone G, De Luise M, Girolimetti G, Vidone M, Gasparre G, Porcelli AM. (2017) The α-ketoglutarate dehydrogenase complex in cancer metabolic plasticity. *Cancer Metab.*, 5: 3.
- 214. Velvizhi S, Dakshayani KB, Subramanian P. (2002) Effects of alpha-ketoglutarate on antioxidants and lipid peroxidation products in rats treated with ammonium acetate. *Nutrition.*, 18(9): 747-50.
- 215. Verrecchia F, Rédini F. (2018) Transforming growth factor-β signaling plays a pivotal role in the interplay between osteosarcoma cells and their microenvironment. *Front Oncol.*, 8: 133.
- 216. Vijayakumar S, Liu G, Rus IA, Yao S, Chen Y, Akiri G, Grumolato L, Aaronson SA. (2011) High-frequency canonical Wnt activation in multiple sarcoma subtypes drives proliferation through a TCF/β-catenin target gene, CDC25A. *Cancer Cell.*, 19(5): 601-12.
- 217. Wagner BM, Donnarumma F, Wintersteiger R, Windischhofer W, Leis HJ. (2010) Simultaneous quantitative determination of alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.*, 396(7): 2629-37.
- 218. Wang LL, Gannavarapu A, Kozinetz CA. (2003) Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund-Thomson syndrome. *J Natl Cancer Inst.*, 95(9): 669-74.
- 219. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.*, 292(5517): 727-30.
- 220. Wenzel ES, Singh ATK. (2018) Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo.*, 32(1): 1-5.
- 221. Wernerman J, Hammarqvist F. (1999) Glutamine: a necessary nutrient for the intensive care patient. *Int J Colorectal Dis.*, 14(3): 137-42.
- 222. Widhe B, Widhe T. (2000) Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. J Bone Joint Surg Am., 82(5): 667-74.
- 223. Wirén M, Permert J, Larsson J. (2002) Alpha-ketoglutarate-supplemented enteral nutrition: effects on postoperative nitrogen balance and muscle catabolism. *Nutrition.*, 18(9): 725-8.
- 224. Wong RS. (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.*, 30: 87.
- 225. Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Knabe DA, Burghardt RC, Spencer TE, Li XL, Wang JJ. (2011) Triennial Growth Symposium: important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. *J Anim Sci.*, 89(7): 2017-30.
- 226. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. (2016) Alpha-ketoglutarate: physiological functions and applications. *Biomol Ther (Seoul).*, 24(1): 1-8.
- 227. Xiao D, Zeng L, Yao K, Kong X, Wu G, Yin Y. (2016) The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications. *Amino Acids.*, 48(9): 2067-80.
- 228. Xiao M, Yang H, Xu W, i in. (2012) Inhibition of α-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev.*, 26(12): 1326-38.

- 229. Xu S, Yang S, Sun G, Huang W, Zhang Y. (2014) Transforming growth factor-beta polymorphisms and serum level in the development of osteosarcoma. *DNA Cell Biol.*, 33(11): 802-6.
- 230. Xu W, Yang H, Liu Y, i in. (2011) Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell.*, 19(1): 17-30.
- 231. Yang RS, Wu CT, Lin KH, Hong RL, Liu TK, Lin KS. (1998) Relation between histological intensity of transforming growth factor-beta isoforms in human osteosarcoma and the rate of lung metastasis. *Tohoku J Exp Med.*, 184(2): 133-42.
- 232. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.*, 275(5303): 1129-32.
- 233. Yang J, Yang D, Sun Y, Sun B, Wang G, Trent JC, Araujo DM, Chen K, Zhang W. (2011) Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including *VEGFA*, in human osteosarcoma. *Cancer.*, 117(21): 4925-38.
- 234. Yao C, Wei JJ, Wang ZY, Ding HM, Li D, Yan SC, Yang YJ, Gu ZP. (2013) Perifosine induces cell apoptosis in human osteosarcoma cells: new implication for osteosarcoma therapy? *Cell Biochem Biophys.*, 65(2): 217-27.
- 235. Yi WR, Li ZH, Qi BW, Ernest ME, Hu X, Yu AX. (2016) Downregulation of IDH2 exacerbates the malignant progression of osteosarcoma cells via increased NF-κB and MMP-9 activation. *Oncol Rep.*, 35(4): 2277-85.
- 236. Yu CL, Tucker MA, Abramson DH, Furukawa K, Seddon JM, Stovall M, Fraumeni JF Jr, Kleinerman RA. (2009) Cause-specific mortality in long-term survivors of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst.*, 101(8): 581-91.
- 237. Yu Y, Luk F, Yang JL, Walsh WR. (2011) Ras/Raf/MEK/ERK pathway is associated with lung metastasis of osteosarcoma in an orthotopic mouse model. *Anticancer Res.*, 31(4): 1147-52.
- 238. Zdzisińska B, Żurek A, Kandefer-Szerszeń M. (2017) Alpha-ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use. *Arch Immunol Ther Exp* (*Warsz*)., 65(1): 21-36.
- 239. Zhang J, Walsh MF, Wu G, i in. (2015a) Germline mutations in predisposition genes in pediatric cancer. *N Engl J Med.*, 373(24): 2336-46.
- 240. Zhang J, Yu XH, Yan YG, Wang C, Wang WJ. (2015b) PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. *Clin Chim Acta.*, 444: 182-92.
- 241. Zhang W, Liu HT. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.*, 12(1): 9-18.
- 242. Zhang Y, Yang J, Zhao N, i in. (2018) Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma (Review). *Oncol Lett.*, 16(5): 6228-37.
- 243. Zhang Y, Hu H, Song L, Cai L, Wei R, Jin W. (2013) Epirubicin-mediated expression of miR-302b is involved in osteosarcoma apoptosis and cell cycle regulation. *Toxicol Lett.*, 222(1): 1-9.
- 244. Zhao S, Lin Y, Xu W, i in. (2009) Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science.*, 324(5924): 261-5.
- 245. Zhao J, Zhang ZR, Zhao N, Ma BA, Fan QY. (2015) VEGF silencing inhibits human osteosarcoma angiogenesis and promotes cell apoptosis via PI3K/AKT signaling pathway. *Int J Clin Exp Med.*, 8(8): 12411-7.
- 246. Zhou R, Zhang Z, Zhao L, i in. (2011) Inhibition of mTOR signaling by oleanolic acid contributes to its anti-tumor activity in osteosarcoma cells. *J Orthop Res.*, 29(6): 846-52.

## SPIS RYCIN I TABEL

**Ryc. 1.** Rola prawidłowych enzymów IDH w komórce i znaczenie ich mutantów w rozwoju nowotworu, **str. 25.** 

Ryc. 2. Cykl kwasów trikarboksylowych, str. 29.

**Ryc. 3.** Wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego w hodowli Saos-2 po 48 godz. inkubacji - reprezentatywne histogramy DNA z cytometru przepływowego, **str. 63.** 

**Ryc. 4.** Wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego w hodowli HOS po 48 godz. inkubacji - reprezentatywne histogramy DNA z cytometru przepływowego, **str. 64.** 

**Ryc. 5.** Wpływ AKG na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (dot ploty), **str. 69.** 

**Ryc. 6.** Wpływ AKG na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii HOS po 72 godz. inkubacji - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (dot ploty), **str. 70.** 

**Ryc. 7.** Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (histogramy), str. 72.

**Ryc. 8.** Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3 w komórkach linii HOS po 72 godz. inkubacji - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (histogramy), str. 73.

**Ryc. 9.** Reprezentatywny immunoblot przedstawiający poziom kaspazy-8 w lizatach komórkowych z linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji z AKG, **str. 75.** 

**Ryc. 10.** Wpływ AKG na aktywację kaspazy-8 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (histogramy), **str. 75.** 

**Ryc. 11.** Reprezentatywny immunoblot przedstawiający poziom kaspazy-9 w lizatach komórkowych z linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji z AKG, **str. 76.** 

**Ryc. 12.** Wpływ AKG na aktywację kaspazy-9 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (histogramy), **str. 77.** 

**Ryc. 13.** Reprezentatywne immunobloty przedstawiające poziom białka Bax oraz Bcl-2 w lizatach komórkowych z linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji z AKG, **str. 78.** 

**Ryc. 14.** Wpływ selektywnego inhibitora JNK (SP600125) na poziom indukowanej przez AKG apoptozy w hodowli komórkowej Saos-2 po 72 godz. inkubacji - reprezentatywne wykresy z cytometru przepływowego (dot ploty), **str. 86.** 

**Ryc. 15.** Wpływ AKG na zdolności migracyjne komórek linii Saos-2 po 24 godz. inkubacji – reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe hodowli, **str. 91.** 

**Ryc. 16.** Wpływ AKG na zdolności migracyjne komórek linii HOS po 24 godz. inkubacji – reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe hodowli, **str. 92.** 

Tab. 1. Klasyfikacja kostniakomięsaka wg. Ennekinga, str. 16.

Tab. 2. Klasyfikacja kostniakomięska wg. TNM, str. 17.

# SPIS WYKRESÓW

**Wykres 1.** Wpływ AKG na żywotność komórek linii HSF i hFOB 1.19 po 24 godz. inkubacji, test LDH, **str. 60.** 

**Wykres 2.** Wpływ AKG na aktywność proliferacyjną komórek linii Saos-2 i HOS po 96 godz. inkubacji, test MTT, **str. 61.** 

**Wykres 3.** Wpływ AKG na proliferację komórek linii Saos-2 i HOS po 48 godz. inkubacji, test BrdU, **str. 62.** 

**Wykres 4.** Wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego w hodowli Saos-2 po 48 godz. inkubacji, **str. 63.** 

**Wykres 5.** Wpływ AKG na przebieg cyklu komórkowego w hodowli HOS po 48 godz. inkubacji, **str. 64.** 

**Wykres 6.** Wpływ AKG na ekspresję cykliny D1 w komórkach linii Saos-2 po 24 i 48 godz. inkubacji, **str. 65.** 

**Wykres 7.** Wpływ AKG na ekspresję cykliny D1 w komórkach linii HOS po 24 i 48 godz. inkubacji, **str. 66.** 

**Wykres 8.** Wpływ AKG na ekpresję inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 w komórkach linii Saos-2 po 6 i 24 godz. inkubacji, **str. 67.** 

**Wykres 9.** Wpływ AKG na ekpresję inhibitora kinaz zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1 w komórkach linii HOS po 6 i 24 godz. inkubacji, **str. 68.** 

**Wykres 10.** Wpływ AKG na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji, **str. 69.** 

**Wykres 11.** Wpływ AKG na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii HOS po 72 godz. inkubacji, **str. 70.** 

**Wykres 12.** Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji, **str. 72.** 

**Wykres 13.** Wpływ AKG na aktywację kaspazy-3 w komórkach linii HOS po 72 godz. inkubacji, **str. 73.** 

**Wykres 14.** Wpływ AKG na aktywację kaspazy-8 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji, **str. 75.** 

**Wykres 15.** Wpływ AKG na aktywację kaspazy-9 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji, **str. 76.** 

**Wykres 16.** Wpływ AKG na poziom białka Bax oraz białka Bcl-2 w komórkach linii Saos-2 po 72 godz. inkubacji, **str. 78.** 

**Wykres 17.** Wpływ AKG na aktywację kinazy ERK1/2 w komórkach linii Saos-2 po 6 i 24 godz. inkubacji, **str.80.** 

**Wykres 18.** Wpływ AKG na aktywację kinazy JNK w komórkach linii Saos-2 po 6 i 24 godz. inkubacji, **str. 81.** 

**Wykres 19.** Wpływ AKG na aktywację kinazy p-38 w komórkach linii Saos-2 po 6 i 24 godz. inkubacji, **str. 81.** 

**Wykres 20.** Wpływ AKG na fosforylację reszty seryny 473 kinazy Akt w komórkach linii Saos-2 po 6, 24 i 48 godz. inkubacji, **str. 83.** 

**Wykres 21.** Wpływ AKG na fosforylację reszty treoniny 308 kinazy Akt w komórkach linii Saos-2 po 6, 24 i 48 godz. inkubacji, **str. 84.** 

**Wykres 22.** Wpływ selektywnego inhibitora JNK (SP600125) na poziom indukowanej przez AKG aktywacji kinazy w komórkach Saos-2 po 24 godz. inkubacji, **str. 85.** 

**Wykres 23.** Wpływ selektywnego inhibitora JNK (SP600125) na poziom indukowanej przez AKG apoptozy w hodowli komórkowej Saos-2 po 72 godz. inkubacji, **str. 87.** 

**Wykres 24.** Wpływ AKG na wytwarzanie TGF- $\beta$  przez komórki kostniakomięsaka linii Saos-2 i HOS po 72 godz. inkubacji, **str. 88.** 

**Wykres 25.** Wpływ AKG na wytwarzanie VEGF przez komórki kostniakomięsaka linii Saos-2 i HOS po 72 godz. inkubacji, **str. 89.** 

**Wykres 26.** Wpływ AKG na zdolności migracyjne komórek kostniakomięsaka linii Saos-2 i HOS po 24 godz. inkubacji, **str. 93.** 

**Wykres 27.** Wpływ AKG na inwazyjność komórek linii Saos-2 i HOS po 24 godz. inkubacji, **str. 94.**