

Mgr inż. Katarzyna Zembrzuska

**Wpływ różnych warunków tlenowych i natleniania  
hiperbarycznego na potencjał proliferacyjny oraz  
wrażliwość komórek nowotworowych linii złośliwego  
glejaka T98G traktowanych wybraną pochodną  
izotiomocznika**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w dyscyplinie biologia medyczna

Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Ewa Matyja



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 30.05.2018

## Streszczenie

*Glioblastoma* (GBM) jest najczęściej występującym nowotworem pierwotnym ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o najwyższym, IV stopniu złośliwości histologicznej wg klasyfikacji WHO. Standardowe leczenie w przypadku złośliwego glejaka oparte jest na leczeniu operacyjnym, radioterapii oraz chemioterapii. Rozlany charakter wzrostu uniemożliwia całkowitą resekcję chirurgiczną zmiany nowotworowej i prowadzi do szybkiej wznowy. Pomimo rozwoju nowoczesnych technik stosowanych w diagnostyce i leczeniu glejaków, prognoza kliniczna dla pacjentów ze zdiagnozowanym GBM pozostaje niekorzystna, a średnie przeżycie na ogół nie przekracza 16 miesięcy. Wprowadzony do leczenia glejaków chemioterapeutyk, jakim jest temozolomid, pozwala na wydłużenie czasu przeżycia pacjentów zaledwie o kilka miesięcy. Prowadzone są więc intensywne badania nad rozwojem nowoczesnych metod leczenia, w tym immunoterapii, terapii antyangiogennych oraz eksperymentalnych terapii genowych.

Znaczącą rolę w progresji złośliwych glejaków oraz oporności komórek nowotworowych na leczenie odgrywa wysoki poziom niedotlenienia tkanki nowotworowej. W warunkach niewystarczającego zaopatrzenia w tlen, w komórkach nowotworowych dochodzi do szeregu niekorzystnych zmian metabolicznych, nasilenia angiogenezy oraz zaburzenia procesu apoptozy. Głównym czynnikiem transkrypcyjnym, zaangażowanym w regulację procesów adaptacyjnych, jest czynnik indukowany hipoksją HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor 1*), zbudowany z dwóch podjednostek:  $\alpha$  i  $\beta$ . Poziom podjednostki  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) wykazuje ścisłą zależność od poziomu natlenowania komórek.

Jedną z atrakcyjnych metod uzyskania poprawy stanu natlenowania tkanki nowotworowej oraz zahamowania aktywności białka HIF-1 $\alpha$  wydaje się być hiperbaria tlenowa (HBO). Podawanie tlenu pod zwiększonym ciśnieniem pozwoliłoby na wydłużenie dystansu dyfuzji i dotarcia O<sub>2</sub> do głębszych, często źle ukrwionych partii guza. Należy spodziewać się, że lepiej natlenowana tkanka nowotworowa stanie się bardziej podatna na stosowane formy terapii. Tlen hiperbaryczny jest powszechnie wykorzystywany w leczeniu m.in. trudno gojących się ran, choroby dekompresyjnej oraz zatruc tlenkiem węgla. Hiperbarię tlenową próbowano również stosować w onkologii, szczególnie w połączeniu z innymi, dotychczas stosowanymi formami terapii: radioterapią, chemioterapią, terapią fotodynamiczną oraz leczeniem operacyjnym. Niektóre z tych badań doprowadzono do fazy badań klinicznych,

jednakże nie udało się opracować procedury medycznej, która mogłaby być powszechnie stosowana w leczeniu pacjentów z chorobą nowotworową.

Progresja nowotworów prowadzi do wykształcenia mechanizmów oporności na leczenie. Z tego względu zachodzi konieczność opracowywania nowatorskich terapii z zastosowaniem bardziej efektywnych chemioterapeutyków. Nową, obiecującą grupę związków cytotoksycznych stanowią heterocykliczne pochodne izotiomocznika, szczególnie S-benzylo pochodne - tzw. pentabromo-benzyloizotiomoczniki, w skrócie ZKKs. Związki tej grupy były przedmiotem badań *in vitro*, w których potwierdzono ich działanie proapoptotyczne i cytotoksyczne względem różnych komórek nowotworowych, w tym linii komórkowej *glioblastoma*. Budowa strukturalna ZKKs zbliżona jest do związków z grupy benzotriazoli (TBB) i benzimidazoli (TBI, DMAT), które są znanymi inhibitorami kinazy kazeinowej 2 (CK2). Wzmoczona aktywność tej kinazy zwiększa potencjał czynników onkogennych i sprzyja transformacji nowotworowej. Ze względu na podobieństwo strukturalne do znanych inhibitorów CK2 oczekiwano, że ZKKs również będą efektywnie hamowały aktywność tej kinazy. Jednak badania na szerokim panelu kinaz białkowych wykazały, że ZKK-3 (N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzylo)izotiomocznik) słabo hamuje CK2, posiada natomiast zdolność do specyficznej inhibicji innych kinaz, w tym kinazy białkowej D1 (PKD1). Kinaza ta odpowiada za regulację detoksykacji reaktywnych form tlenu i azotu, powstających w mitochondriach i chroni komórki przed stresem oksydacyjnym. Zaburzenia ekspresji PKD1 sprzyjają rozwojowi licznych procesów patologicznych, w tym także chorób nowotworowych. Można przypuszczać, że poprzez regulację poziomu PKD1, można byłoby wpływać na rozwój procesów nowotworowych.

**Celem prowadzonych badań** była ocena wpływu różnych warunków tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego, na potencjał przeciwnowotworowy wybranej pochodnej izotiomocznika – ZKK-3 wobec komórek nowotworowych linii złośliwego glejaka T98G *in vitro*.

Cele szczegółowe obejmowały:

- 1) Porównanie proliferacji oraz żywotności komórek nowotworowych linii T98G w różnych warunkach tlenowych: normoksji, anoksji oraz hipoksji.
- 2) Ocenę wpływu natleniania hiperbarycznego na proces proliferacji oraz żywotność komórek nowotworowych linii T98G.
- 3) Ocenę wpływu HBO na poziom ekspresji białka HIF-1 $\alpha$  w komórkach nowotworowych linii T98G.

- 4) Ocenę efektu cytotoksycznego pochodnej izotiomocznika ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych oraz przy zastosowaniu natleniania hiperbarycznego.
- 5) Ocenę wpływu ZKK-3 na poziom ekspresji kinazy białkowej PKD1 oraz poziom jej form ufosforylowanych: pPKD1 (Ser 916) i pPKD1 (Ser 744/748) w różnych warunkach tlenowych oraz przy zastosowaniu natleniania hiperbarycznego.

Przyjęta hipoteza badawcza zakładała, że podawanie tlenu hiperbarycznego pozwoli na obniżenie stopnia niedotlenienia komórek *glioblastoma* linii T98G, uwrażliwiając je tym samym na działanie wybranej pochodnej izotiomocznika, co mogłoby stanowić potencjalnie skuteczną linię działania w terapii przeciwnowotworowej. Można było przypuszczać, że hamowanie aktywności kinazy PKD1 przez ZKK-3 może spotęgować stres oksydacyjny i w związku z tym nasilić efekt antyproliferacyjny proponowanego połączenia ZKK-3/HBO.

Doświadczenia prowadzono na ludzkiej linii komórkowej złośliwego nowotworu glejopochodnego - *glioblastoma* T98G (*American Type Culture Collection*) o IV-tym stopniu złośliwości histologicznej wg klasyfikacji WHO (WHO GIV).

Do badań efektu cytotoksycznego użyto modyfikowanej pochodnej izotiomocznika – N,N'-dimetylo-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzyl)izotiomocznika (ZKK-3), stosowanej w stężeniach 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M i 50  $\mu$ M.

Hodowle komórkowe poddane były działaniu różnych warunków tlenowych:

- 1/ normoksja (21% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>/ 74% N<sub>2</sub>) - 24-godzinna inkubacja po podaniu ZKK-3
- 2/ anoksja (5% CO<sub>2</sub>/ 95% N<sub>2</sub>) – 24-godzinna inkubacja po podaniu ZKK-3
- 3/ hipoksja (1% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>/ 94% N<sub>2</sub>) – 24-godzinna inkubacja po podaniu ZKK-3
- 4/ hiperbaria tlenowa (HBO, 97,5% O<sub>2</sub>/ 2,5% CO<sub>2</sub>, ciśnienie 2 ATA) – 1-godzinna inkubacja po podaniu ZKK-3, a następnie 23-godzinna inkubacja w warunkach normoksyjnych
- 5/ hipoksja/hipoksja (podwójna hipoksja) – 24-godzinna preinkubacja w warunkach hipoksyjnych przed podaniem ZKK-3, następnie przedłużenie hipoksji przez kolejne 24 godziny
- 6/ hipoksja/hiperbaria tlenowa – 24-godzinna preinkubacja w warunkach hipoksyjnych przed podaniem ZKK-3, następnie analogicznie jak w pkt 4.

Oceniano proliferację oraz żywotność komórek *glioblastoma* linii T98G, traktowanych ZKK-3 w warunkach standardowych (normoksja), niedoboru tlenu (anoksja, hipoksja) oraz hiperbarii tlenowej (HBO). Oceny proliferacji dokonywano po 24 godzinach inkubacji z ZKK-3 w liczniku *Multisizer 3 Coulter Counter* (Beckman Coulter). Żywotność komórek

określano po 24 i 48 godzinach inkubacji z ZKK-3, posługując się zmodyfikowanym testem cytotoksyczności MTS z wykorzystaniem odczynnika CellTiter 96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Badano również wpływ HBO na poprawę stopnia natlenowania komórek nowotworowych poprzez oznaczenie poziomu ekspresji białka HIF-1 $\alpha$  w lizatach komórkowych metodą testu ELISA. Ekspresję kinazy PKD1 oraz poziom jej form ufosforylowanych, pPKD1 (Ser 916) i pPKD1 (Ser 744/748), w komórkach *glioblastoma* oceniano przy użyciu techniki Western Blot.

Uzyskane wyniki pokazują, że w warunkach normoksji następuje istotne statystycznie obniżenie proliferacji komórek ludzkiej linii *glioblastoma* T98G traktowanych ZKK-3 w stężeniach 25  $\mu$ M i 50  $\mu$ M. Wraz ze wzrostem stężenia badanej pochodnej izotiomocznika istotnie maleje także żywotność komórek linii T98G po 24 i 48 godzinach inkubacji.

W warunkach beztlenowych liczba komórek glejaka również ulega znaczącemu obniżeniu po podaniu ZKK-3, jednak spadek ten jest mniej gwałtowny niż w warunkach standardowych. Co więcej, sama anoksja powoduje istotne spowolnienie proliferacji nawet bez dodatku ZKK-3 w porównaniu do normoksji. Jednakże żywotność komórek w anoksji jest zdecydowanie wyższa niż w warunkach standardowych, zarówno w grupach kontrolnych, jak i doświadczalnych po 24 i 48 godzinach inkubacji z ZKK-3 w stężeniu 10  $\mu$ M i 25  $\mu$ M. Znaczący efekt cytotoksyczny testowanego związku w warunkach anoksji obserwowany jest dopiero przy wyższych stężeniach i przedłużonej ekspozycji na działanie ZKK-3.

Zastosowanie samej hipoksji, jak również połączonej z podaniem ZKK-3 w stężeniu 10  $\mu$ M nie powoduje znaczących różnic w proliferacji komórek linii T98G w porównaniu do warunków normoksji. Dopiero podanie wyższych stężeń ZKK-3 wywołuje istotny statystycznie spadek liczby komórek, niezależnie od warunków tlenowych. Ponadto, po zastosowaniu 50  $\mu$ M ZKK-3 liczba komórek w warunkach obniżonego stężenia tlenu jest istotnie wyższa niż w warunkach standardowych. Sama hipoksja znacząco obniża natomiast żywotność komórek *GBM in vitro* w porównaniu do normoksji zarówno po 24, jak i 48 godzinach. W warunkach niedotlenienia tylko przy stężeniu 50  $\mu$ M badany związek wywołuje spadek żywotności komórek linii T98G w sposób istotny statystycznie, zarówno po jedno-, jak i dwudniowej ekspozycji. Co więcej, po 48 godzinach inkubacji z badaną pochodną izotiomocznika w stężeniu 10  $\mu$ M i 25  $\mu$ M żywotność komórek jest wyższa w warunkach obniżonego stężenia tlenu niż w warunkach standardowych.

Hiperbaria tlenowa podawana samodzielnie nie zmienia proliferacji oraz żywotności komórek linii T98G, zarówno w porównaniu do warunków standardowych, jak i niedotlenienia.

Jednoczesne stosowanie HBO i ZKK-3 w stężeniu 50  $\mu\text{M}$  skutkuje istotnie statystycznie większym obniżeniem liczby komórek *glioblastoma in vitro*, niż w warunkach normoksji. Żywotność komórek linii T98G traktowanych testowaną pochodną izotiomocznika również ulega zmniejszeniu pod wpływem natleniania hiperbarycznego. Po 24-godzinnej inkubacji z ZKK-3, spadek liczby żywych komórek w warunkach HBO jest znacząco większy w porównaniu do normoksji jedynie po podaniu badanego związku w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ . Jednak po 48 godzinach istotne statystycznie różnice pomiędzy warunkami HBO i normoksji obserwuje się także przy niższych stężeniach ZKK-3.

Bezpośrednie porównanie proliferacji komórek glejaka *in vitro* w warunkach hiperbarii tlenowej i hipoksji pokazuje, że w obu warunkach tlenowych wzrost komórek linii T98G jest znacząco spowolniony po podaniu ZKK-3 w stężeniach 25  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$ . Jednakże istotnie statystycznie silniejszy efekt cytotoksyczny badanej pochodnej izotiomocznika uzyskuje się po połączeniu z HBO. Co więcej, pod wpływem tlenu hiperbarycznego ZKK-3 znacząco redukuje żywotność komórek nowotworowych już przy stężeniu 10  $\mu\text{M}$ . Wrażliwość komórek na działanie testowanego związku jest zdecydowanie wyższa w warunkach HBO niż w przypadku hipoksji, niezależnie od czasu ekspozycji na działanie ZKK-3. Jedynie po podaniu ZKK-3 w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ , niezależnie od warunków tlenowych oraz czasu inkubacji, nie obserwuje się różnic istotnych statystycznie.

Przeprowadzone badania potwierdzają, że poziom białka HIF-1 $\alpha$  w komórkach linii T98G ściśle zależy od warunków tlenowych w jakich są one hodowane. W komórkach utrzymywanych w hipoksji ekspresja HIF-1 $\alpha$  jest znacząco wyższa w porównaniu do warunków standardowych. Wydłużenie czasu niedotlenienia (preinkubacja w warunkach hipoksji przed podaniem ZKK-3) sprawia, że wzrost poziomu HIF-1 $\alpha$  jest jeszcze większy. Z drugiej strony, ekspozycja na działanie HBO nie powoduje istotnych zmian w poziomie HIF-1 $\alpha$  w porównaniu do normoksji. Wyjątek stanowią lizaty z grupy hipoksja/HBO traktowane wyższymi stężeniami ZKK-3, w których odnotowuje się znaczące obniżenie poziomu badanego białka. Co więcej, bezpośrednie porównanie ekspresji HIF-1 $\alpha$  w grupach preinkubowanych w analogicznych warunkach tlenowych pokazuje, że podawanie HBO prowadzi do znacznego zahamowania aktywności badanego białka w stosunku do hipoksji.

Testowana pochodna pentabromobenzoyloizotiomocznika nie wpływa znacząco na ekspresję kinazy białkowej D1 (PKD1) w komórkach *glioblastoma in vitro*. Inkubacja z ZKK-3 w stężeniu 50  $\mu\text{M}$  skutkuje natomiast istotnym statystycznie spadkiem poziomu pPKD1 (Ser 916), niezależnym od stosowanych warunków tlenowych, jak również znaczącym wzrostem poziomu pPKD1 (Ser 744/748) w warunkach standardowych, hipoksji oraz HBO.

Wysoce prawdopodobnym wydaje się zatem, że podawanie wysokiego stężenia ZKK-3 zapobiega fosforylacji PKD1 właśnie na reszcie Ser 916.

Ekspresja PKD1 w komórkach linii T98G nie ulega istotnym zmianom pod wpływem różnych warunków tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego, zarówno w grupie kontrolnej jak i grupach traktowanych ZKK-3. W hodowlach, którym nie podano związku cytotoksycznego, następuje znaczący spadek poziomu pPKD1 (Ser 916) w hipoksji, HBO oraz podwójnej hipoksji. Z kolei w przypadku pPKD1 (Ser 744/748) jedynie w grupie kontrolnej dochodzi do znaczącego wzrostu aktywności w warunkach hipoksja/HBO w stosunku do normoksji.

## Wnioski

- Brak tlenu (anoksja) oraz warunki obniżonego poziomu tlenu (hipoksja) osłabiają efekt cytotoksyczny pochodnej izotiomocznika ZKK-3 i sprzyjają lepszej przeżywalności komórek *glioblastoma* w warunkach *in vitro*.
- Podanie tlenu hiperbarycznego istotnie obniża proliferację komórek linii złośliwego glejaka T98G oraz zwiększa ich wrażliwość na testowaną pochodną izotiomocznika – ZKK-3. Korzystny efekt cytotoksyczny ZKK-3/HBO można uzyskać przy niższych stężeniach badanego związku oraz po krótszym czasie ekspozycji.
- Poziom białka HIF-1 $\alpha$  w komórkach linii T98G wzrasta w warunkach hipoksji, natomiast ulega obniżeniu pod wpływem natleniania hiperbarycznego. Może to sugerować, że HBO zmniejszając niedotlenienie i poziom markerów hipoksji, obniży oporność komórek nowotworowych na działanie cytostatyków.
- Spadek poziomu pPKD1 (Ser 916) po podaniu ZKK-3 wskazuje, że badana pochodna pentabrombenzyloizotiomocznika wykazuje właściwości inhibitora względem tej formy kinazy białkowej D1.
- Brak znaczących różnic w poziomie PKD1 i jej ufosforylowanych form w komórkach *glioblastoma* poddawanych działaniu ZKK-3 w różnych warunkach tlenowych, w tym natleniania hiperbarycznego, sugeruje, że hamowanie aktywności kinazy białkowej D1 nie jest wiodącym mechanizmem działania cytotoksycznego ZKK-3/HBO.
- Połączenie pochodnej izotiomocznika ZKK-3 i natleniania hiperbarycznego można rozważać jako obiecujące podejście terapeutyczne w leczeniu nowotworów mózgu o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej.