

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*, *RBI*, *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 w metabolizmie energetycznym komórek zwierzęcych. Oprócz funkcji metabolicznych, AKG pełni w organizmie funkcje niemetalaboliczne, 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 egzogenego 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 G₁ 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.