

## Streszczenie

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

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

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

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

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

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

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

Joanna Surołek-Wiedro