

Badania przedkliniczne związku BK124
jako potencjalnego leku
przeciwnowotworowego

mgr Iga Stukan

Praca doktorska

Promotor:

prof. dr hab. Urszula Wojda

Pracownia Badań Przedklinicznych o Podwyższonym
Standardzie

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego
Polska Akademia Nauk

Warszawa, 2023

Podziękowania

Nauka jest pracą zespołową. Tym bardziej, że większość eksperymentów nie kończy się radosnym „Eureka!”, a raczej posępnym „No cóż, może następnym razem?”. Potrzeba dookoła ludzi. Ludzi, którym można powierzyć swoje żale, przesądne hipotezy, heretyczne wnioski. Ludzi, których można się poradzić, na których można liczyć. Ludzi, którzy wyciągną za uszy z nieudanego eksperymentalnego bluesa i powiedzą „Non omnis moriar”.

I do przodu.

*Dziękuję mojej najważniejszej mentorce, **profesor dr hab. Urszuli Wojdzie**, która nieraz mnie wyciągnęła za uszy. Bez której ten doktorat by nie powstał. Dziękuję za wiarę we mnie i wsparcie, kiedy potrzebowałam go najbardziej.*

*Dziękuję nieocenionej **dr Ewie Kozłowskiej**, do której przyszłam na pierwszy laboratoryjny staż, która opiekowała się mną podczas pracy licencjackiej i pracy magisterskiej. Dziękuję za wskazywanie nowych, ekscytujących ścieżek rozwoju oraz za całą przekazaną mądrość. To nie jest pustostowie.*

Dziękuję również moim wspaniałym towarzyszom podróży w Instytucie Nenckiego:

dr Katarzynie Laskowskiej-Kaszub

dr Joannie (Wojsiat) Podgórskiej

dr. Siranjeevi Nagaraj

dr Annie Mietelskiej-Porowskiej

Angelice Więckowskiej-Gacek

Małgorzacie Wydrych

Katarzynie Brzozowskiej

Markowi Gryzikowi

Wioletcie Grabowskiej-Pyrzewskiej

Julianowi Swatlerowi

Laurze Tuross-Korgul

I wielu, wielu osobom nie wymienionym w powyższej pracy, którzy wskazywali i wskazują mi drogę w zawiłym świecie nauki.

Praca doktorska powstała w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki „Nowe leki przeciwbiałaczkowe – zaawansowane badania przedkliniczne.”: 2014/15/B/NZ7/00966 dla prof. dr. hab. Urszuli Wojdy

Spis treści

SPIS TREŚCI	4
STRESZCZENIE	8
ABSTRACT	9
WYKAZ SKRÓTÓW	10
I. WSTĘP	13
ROZDZIAŁ 1. NOWOTWÓR JAKO CHOROBA GENETYCZNA CYKLU KOMÓRKOWEGO	13
1.1. DANE EPIDEMICZNE CHORÓB NOWOTWOROWYCH	13
1.2. ROZWÓJ NOWOTWORU – KANCEROGENEZA.....	13
1.3. ONKOGENY, ANTYONKOGENY I PROTOONKOGENY	16
1.4. KANCEROGENEZA - PODSUMOWANIE.....	20
1.5. „THE HALLMARKS OF CANCER”	22
ROZDZIAŁ 2. BIAŁACZKA	23
2.1. PRZEWLEKŁA BIAŁACZKA SZPIKOWA – DANE STATYSTYCZNE	23
2.2. OBRAZ KLINICZNY I PRZEBIEG PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ	24
2.3. ROKOWANIE W PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZCE SZPIKOWEJ	25
2.4. KINAZA BCR-ABL1	26
2.4.1. Szlak sygnałowy JAK/STAT	29
2.4.2. Szlak sygnałowy PI3K/AKT/mTOR.....	30
2.4.3. Szlak sygnałowy RAS/RAF/MEK/ERK.....	33
2.5. KOMÓRKI MACIERZYSTE BIAŁACZKI	34
ROZDZIAŁ 3. LECZENIE NOWOTWORÓW Z UWZGLĘDNIENIEM PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ	36
3.1. HISTORIA ROZWOJU CHEMIOTERAPII.....	37
3.1.1. Zastosowanie pierwszych leków cytostatycznych.....	37
3.1.2. Mechanizmy działania leków cytostatycznych stosowanych w chemioterapii	39
3.2. TERAPIE CELOWANE W LECZENIU NOWOTWORÓW – „ZŁOTA KULA”	40
3.3. AKTUALNE LECZENIE PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ	41
3.4. STRATEGIE LECZENIA CML W PRZYPADKU NIEPOWODZENIA CHEMIOTERAPII INHIBITORAMI KINAZY BCR-ABL.....	43
ROZDZIAŁ 4. LEKOOPORNOŚĆ	44
4.1. OPORNOŚĆ WRODZONA.....	44
4.2. OPORNOŚĆ NABYTA	45
4.3. OPORNOŚĆ NA IMATINIB ZALEŻNA OD BCR-ABL1 – MUTACJE W DOMENIE KINAZY TYROZYNOWEJ	46

4.4.	OPORNOŚĆ NIEZALEŻNA OD BCR-ABL1.....	48
4.4.1.	<i>Białka transportowe – MDR1 i oporność wielolekowa</i>	48
4.4.2.	<i>Inne BCR-ABL1-niezależne mechanizmy oporności</i>	49
ROZDZIAŁ 5.	POSZUKIWANIA NOWYCH LEKÓW	51
5.1.	UZASADNIENIE BADAŃ NAD NOWYMI LEKAMI	51
5.2.	TRUDNOŚCI W BADANIU NOWYCH ZWIĄZKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH	52
5.3.	DIKARBOKSYMIDY	53
5.3.1.	<i>Amonafid i mitonafid</i>	53
5.3.2.	<i>Talidomid</i>	54
5.4.	ZWIĄZEK BK124	55
ROZDZIAŁ 6.	ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	57
II.	METODYKA	58
ROZDZIAŁ 7.	MATERIAŁY I METODY.....	58
7.1.	SPRZĘT LABORATORYJNY	58
7.2.	PRZECIWCIAŁA UŻYWANE W EKSPERYMENTACH.....	58
7.3.	ZWIĄZEK BK124.....	59
7.3.1.	<i>Eksperymenty in vivo</i>	59
7.4.	HODOWLA KOMÓRKOWA.....	60
7.4.1.	<i>Liczenie komórek i oznaczanie ich żywotności</i>	61
7.4.2.	<i>Warunki hodowli poszczególnych linii</i>	61
7.5.	TEST ŻYWOTNOŚCI MTT (BROMEK 3-(4,5-DIMETYLOTIAZOL-2-YL)- 2,5-DIFENYLOTETRAZOLIOWY).....	62
7.5.1.	<i>Przygotowanie odczynników</i>	63
7.5.2.	<i>Przebieg eksperymentu</i>	63
7.6.	POZYSKIWANIE KOMÓREK CD34 ⁺ Z KRWI OBWODOWEJ PACJENTÓW CHORYCH NA PRZEWLEKŁĄ BIAŁACZKĘ SZPIKOWĄ .	65
7.6.1.	<i>Zgoda komisji bioetycznej</i>	65
7.6.2.	<i>Izolowanie komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej</i>	65
7.6.3.	<i>Selekcja komórek CD34+ z populacji komórek PBMC</i>	66
7.7.	CYTOMETRIA PRZEPŁYWOWA	67
7.7.1.	<i>Badanie apoptozy</i>	67
7.7.2.	<i>Analiza cyklu komórkowego</i>	69
7.7.3.	<i>Analiza ekspresji glikoproteiny-P przy użyciu cytometrii przepływowej</i>	70
7.7.4.	<i>Pomiar czystości populacji komórek CD34⁺ izolowanych z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej</i>	70
7.8.	UODPARNIANIE KOMÓREK NA BK124 (EKSPERYMENT SZEŚCIOMIESIĘCZNY)	71
7.8.1.	<i>Izolowanie RNA</i>	71
7.8.2.	<i>Odwrotna transkrypcja</i>	72
7.8.3.	<i>RT qPCR</i>	72

7.9.	ELEKTROFOREZA SDS PAGE I WESTERN BLOTTING.....	72
7.9.1.	<i>Ekstrahowanie białka z komórek</i>	73
7.9.2.	<i>Przygotowanie próbek do analizy typu Western Blotting</i>	74
7.9.3.	<i>Żel poliakrylamidowy</i>	74
7.9.4.	<i>Elektroforeza SDS-PAGE</i>	74
7.9.5.	<i>Blokowanie i inkubacja membran z przeciwciałami</i>	75
7.9.6.	<i>Badanie fosforylacji kinaz JNK, p38 oraz ERK1/2</i>	75
7.10.	EKSPERYMENTY <i>IN VIVO</i>	76
7.10.1.	<i>Zgoda komisji bioetycznej</i>	76
7.10.2.	<i>Zwierzęta</i>	76
7.10.3.	<i>Farmakokinetyka i badanie toksyczności</i>	76
7.10.4.	<i>Eksperymenty w modelu ksenotransplantacyjnym CML</i>	77
7.11.	ANALIZA STATYSTYCZNA	78
III.	WYNIKI	80
ROZDZIAŁ 8.	BADANIE CYTOTOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKU BK124 W KOMÓRKACH PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ.....	80
8.1.	EFEKT CYTOTOKSYCZNY ZWIĄZKU BK124 W KOMÓRKACH PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ	80
8.1.1.	<i>Przeżywalność komórek K562 w zależności od stężenia związku BK124</i>	80
8.1.2.	<i>Analiza apoptozy w komórkach K562</i>	81
8.2.	BADANIE PROTEOLIZY PROKASPAZ 3, 8 I 9	83
8.3.	BADANIE BIAŁEK SYGNAŁOWYCH WARUNKUJĄCYCH PRZEŻYCIE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH.....	85
8.3.1.	<i>Poziom białek szlaków onkogennych związanych z kinazą BCR/ABL1</i>	85
8.3.2.	<i>Badanie lokalizacji białka p21 oraz czynnika FOXO3a w komórce.....</i>	87
8.3.3.	<i>Badanie cyklu komórkowego</i>	87
8.3.4.	<i>Badanie aktywacji kinaz MAPK przez fosforylację</i>	89
ROZDZIAŁ 9.	BADANIE PODSTAWOWEJ FARMAKOKINETYKI I CYTOTOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKU BK124 W MODELU ZWIERZĘCYM	92
9.1.	BADANIE FARMAKOKINETYKI ZWIĄZKU BK124 W MODELU SZCZURZYM ORAZ MYSIM	92
9.2.	BADANIE CYTOTOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKU BK124 W MYSIM MODELU KSENOTRANSPLANTACYJNYM.....	97
ROZDZIAŁ 10.	BK124 A OPORNOŚĆ WIELOLEKOWA TYPU I (MDR1)	102
10.1.	DŁUGOTERMINOWA INKUBACJA K562 ZE ZWIĄZKIEM BK124	102
10.2.	INDUKCJA FENOTYPU MDR1 W KOMÓRKACH K562.....	105
10.3.	ANALIZA APOPTOZY W KOMÓRKACH K562-MDR1 POD WPŁYWEM ZWIĄZKU BK124.....	106
ROZDZIAŁ 11.	WPŁYW BK124 NA KOMÓRKI MACIERZYSTE BIAŁACZKI (LSCS)	109
11.1.	IZOLOWANIE KOMÓREK CD34+ Z KRWI OBWODOWEJ PACJENTÓW Z CML	109

11.2.	ANALIZA PRZEŻYWALNOŚCI KOMÓREK CD34+ W ZALEŻNOŚCI OD STĘŻENIA BK124.....	109
11.2.1.	<i>Test MTT</i>	109
11.2.2.	<i>Analiza apoptozy w komórkach CD34+</i>	110
11.2.3.	<i>Analiza odsetka komórek apoptotycznych w subpopulacji CD34+ CD38-</i>	112
IV.	DYSKUSJA	116
ROZDZIAŁ 12.	BK124 JAKO POTENCJALNY NOWY LEK PRZECIWNOWOTOROWY	116
12.1.	BK124 INDUKUJE APOPTOTYCZNĄ ŚMIERĆ W KOMÓRKACH K562	117
12.2.	BK124 OBNIŻA POZIOM BIAŁEK SZLAKÓW ONKOGENNYCH, HAMUJE PROLIFERACJĘ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH I PROMUJE APOPTOZĘ	118
12.3.	BK124 POWODUJE AKTYWACJĘ P38 ORAZ JNK.....	119
12.4.	BK124 POSIADA KORZYSTNE PARAMETRY FIZYKOCHEMICZNE	120
12.5.	BK124 SKUTECZNIE ZWALCZA LUDZKIE KOMÓRKI KRYZY BŁASTYCZNEJ	121
12.6.	BK124 JEST CYTOTOKSYCZNY WZGLĘDEM KOMÓREK OPORNYCH NA CHEMIOTERAPIĘ	122
12.6.1.	<i>MDR1</i>	122
12.6.2.	<i>Komórki LSCs</i>	124
12.7.	PRZYSZŁOŚĆ ROZWOJU BK124 JAKO LEKU PRZECIWNOWOTWOROWEGO.....	125
ROZDZIAŁ 13.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	127
BIBLIOGRAFIA	128	
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD W PRACY DOKTORSKIEJ:	144	
POZOSTAŁE PUBLIKACJE DOKTORANTKI	144	
SPIS RYCIN	146	
SPIS TABEL	147	

Streszczenie

Zjawisko oporności nowotworów na terapię jest jednym z największych wyzwań współczesnej onkologii, co sprawia, że istnieje nieustanna potrzeba badań nad nowymi lekami. Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej nowej pochodnej dikarboksyimidu, związku BK124, w ramach badań przedklinicznych *in vitro* oraz *in vivo*. Badania przeprowadzono w modelach przewlekłej białaczki szpikowej (ang. chronic myelogenous leukemia, CML): w linii ludzkich komórek K562, pochodzących z kryzy blastycznej CML, w komórkach macierzystych i progenitorowych białaczki pobranych od pacjentów oraz w mysim modelu CML po ksenotransplantacji komórek K562.

Stosując metody cytometrii przepływowej, test MTT oraz metody immunoblottingu stwierdzono, że związek BK124 wywołuje w komórkach K562 apoptozę ($IC_{50} = 2,5 \mu M$) oraz wpływa na poziom białek szlaków onkogennych. 24-godzinna inkubacja z BK124 skutkowałą aktywacją kaspazy 9 oraz kinaz MAP: p38MAPK i JNK, czemu towarzyszyła jądrowa lokalizacja białka p21^{waf1/cip1} i FOXO3a oraz blokada cyklu komórkowego w fazie G2/M. Ponadto, zaobserwowano obniżony poziom kinazy BCR-ABL1, a także białek onkogennych szlaków JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR oraz NF- κ B.

Następnie opracowano nietoksyczną formulację BK124, umożliwiającą podania drogą iniekcji u zwierząt, wyznaczono podstawowe parametry farmakokinetyczne związku BK124 i ustalono optymalną drogę podania oraz dawkę. Związek BK124 podany dootrzewnowo w dawce 20 mg/kg masy ciała zwalczał skutecznie komórki nowotworowe *in vivo* w mysim modelu ksenotransplantacyjnym, bez widocznego pogorszenia dobrostanu myszy i toksycznego wpływu na narządy wewnętrzne.

Ponadto, używając testu MTT oraz cytometrii przepływowej wykazano cytotoksyczność związku BK124 wobec komórek o wysokiej oporności na leki: komórek z ekspresją genu glikoproteiny P (PgP) i opornością wielolekową typu I (K562-MDR1) oraz komórek macierzystych białaczki od nieleczonych pacjentów w fazie chronicznej CML. Wykazano, że związek BK124 prawdopodobnie nie jest substratem dla pompy MDR1 ($IC_{50} = 2,35 \mu M$). Co więcej, inkubacja komórek K562 w subletalnym stężeniu BK124 przez sześć miesięcy obniżyła poziom transkryptu genu *PgP* (*ABCB1*). Dikarboksyimid BK124 był również toksyczny dla białaczkowych komórek macierzystych i progenitorowych CD34⁺ ($IC_{50} = 1,5 \mu M$), w tym szczególnie niebezpiecznej subpopulacji komórek macierzystych CD34⁺CD38⁻ inicjujących nowotwór.

Biorąc pod uwagę korzystne własności farmakokinetyczne BK124 jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego, szczególną zdolność BK124 do pokonania oporności wielolekowej oraz wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek macierzystych nowotworu można stwierdzić, że przyszły rozwój BK124 może poszerzyć możliwości terapii chorych cierpiących na przewlekłą białaczkę szpikową, a także potencjalnie na inne nowotwory, na które nie ma obecnie terapii lub też w których występuje zjawisko oporności na leki.

Abstract

Cancer resistance to therapy is one of the greatest challenges of the contemporary oncology and as a result there is a constant need for research on new medications. The main objective of this study was to investigate the potential anticancer activity of a new dicarboximide derivative, compound BK124, in preclinical studies *in vitro* and *in vivo*. The studies were carried out in models of chronic myelogenous leukemia (CML): in the human K562 cell line, derived from the CML blast crisis, in leukemia stem and progenitor cells taken from patients, and in a mouse model of CML after K562 cell xenotransplantation.

Using flow cytometry, MTT and immunoblotting methods, it was found that the BK124 compound induces apoptosis in K562 cells ($IC_{50} = 2.5 \mu M$) and affects the level of proteins of oncogenic pathways. A 24-hour incubation with BK124 resulted in the activation of caspase 9 and MAP kinases: p38MAPK and JNK, which was accompanied by nuclear localization of p21waf1/cip1 and FOXO3a proteins and blockade of the cell cycle in the G2/M phase. In addition, decreased levels of BCR-ABL1 kinase as well as oncogenic proteins of the JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR and NF- κ B pathways were observed.

Then, a non-toxic formulation of BK124 was developed, enabling administration by injection in animals, and the basic pharmacokinetic parameters of the BK124 compound were determined, as well as the optimal route of administration and dose. Compound BK124 administered intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg of body weight was effective in combating tumor cells *in vivo* in a mouse xenotransplantation model, without any apparent deterioration in the well-being of the mice or toxic effects on internal organs.

In addition, using the MTT assay and flow cytometry, BK124 was shown to be cytotoxic to highly drug-resistant cells: K562 cells with multidrug resistance type I (K562-MDR1) expressing the gene encoding P-glycoprotein (PgP), and to the leukemia stem cells from untreated CML patients in the chronic phase. Compound BK124 was shown to be probably not a substrate for the MDR1 pump ($IC_{50} = 2.35 \mu M$). Moreover, incubation of K562 cells with a sub-lethal concentration of BK124 for six months downregulated the PgP (*ABCB1*) gene transcript. BK124 dicarboximide was also toxic to CD34+ leukemic stem and progenitor cells ($IC_{50} = 1.5 \mu M$), including the particularly dangerous subpopulation of CD34+CD38- cancer-initiating stem cells.

Taking into account the favorable pharmacokinetic properties of BK124 as a potential anti-cancer drug, the special ability of BK124 to overcome multidrug resistance and the high cytotoxic activity against cancer stem cells, it can be concluded that the future development of BK124 may broaden the therapeutic possibilities of patients suffering from chronic myelogenous leukemia, and potentially other cancers, that are not yet effectively treated, as well as for patients who have developed resistance to existing therapy.

Wykaz skrótów

Skrót	Znaczenie
ABL1	ang. Abelson murine Leukemia viral oncogene homolog 1, homolog wirusowego onkogenu mysiej białaczki Abelsona
AKT	ang. Protein kinase B, białkowa kinaza B
ALL	ang. Acute lymphocytic leukemia, ostra białaczka limfoblastyczna
AML	ang. Acute myeloid leukemia, ostra białaczka szpikowa
AMPK	ang. 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, kinaza aktywowana 5' – adenozymonofosforanem
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan
AUC_∞	Ang. Area under the curve infinity; Parametr farmakokinetyczny, określający obszar pod krzywą, ekstrapolowany do nieskończoności
AUC_{last}	Ang. Area under the curve last; Parametr farmakokinetyczny, określający obszar pod krzywą kalkulowany w stosunku do ostatniego obserwowalnego punktu czasu
BCL-X	ang. Apoptosis regulator Bcl-X, regulator apoptozy Bcl-X
BCR	ang. Breakpoint cluster region, region podziału klastra
C₀	Parametr farmakokinetyczny, określający maksymalne stężenie związku wykrywanego w surowicy, ekstrapolowane do t = 0
CD	ang. Cluster of differentiation, klister różnicowania
CL	ang. Clearance; Parametr farmakokinetyczny, określający klirens badanej substancji
CLL	ang. Chronic lymphocytic leukemia, przewlekła białaczka limfoblastyczna
CLL-1	ang. C-type lectin-like molecule-1, lektynopodobna cząsteczka typu C - 1
CML	ang. Chronic myeloid leukemia, przewlekła białaczka szpikowa
CRKL	ang. V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog-Like
CRKL	ang. V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog-Like
ERK	ang. Extracellular signal-regulated kinases, zewnątrzkomórkowe kinazy regulujące sygnał
FBS	ang. Fetal bovine serum, płodowe serum bydlęce
FOXO	ang. Forkhead box O, podklasa O czynników transkrypcyjnych z rodziny Forkhead

GAB2	ang. Growth Factor Receptor Bound Protein 2-Associated Protein 2, białko oddziałujące z GRB2
GPR56	ang. G protein-coupled receptor 56, receptor sprzężony z białkiem G 56
GRB2	ang. Growth Factor Receptor Bound Protein 2, białko 2 związane z receptorem dla czynnika wzrostu
GSK-3β	ang. Glycogen synthase kinase 3, kinaza syntazy glikogenu
HCK	ang. Hematopoietic cell kinase, kinaza komórek hematopoetycznych
HSC	ang. Hematopoietic stem cell, hematopoetyczna komórka macierzysta
IC₅₀	ang. inhibitory concentration, stężenie związku, wywołujące 50% zahamowanie wzrostu komórek
IL	Interleukina
IL1RAP	ang. Interleukin-1 receptor accessory protein, białko pomocnicze receptora interleukiny 1
IP	ang. Intraperitoneal, podanie dootrzewnowe
IV	ang. Intravenous, podanie dożylnie
JAK	ang. Janus-activated kinases), kinazy janusowe
LSC	ang. Leukemic stem cell, komórka macierzysta białaczki
LYN	ang. Lck/Yes-Related Novel Protein Tyrosine Kinase, białkowa kinaza tyrozynowa związana z Lck/Yes
MAPK	ang. Mitogen-Activated Protein Kinase, kinaza aktywowana mitogenem
MEK	ang. Mitogen-activated protein kinase kinase, kinaza kinazy aktywowanej mitogenem
MRT_{last}	ang. Mean residence time; parametr farmakokinetyczny, określający średni czas przebywania w organizmie, kalkulowany na podstawie ostatniego obserwowalnego punktu w czasie
mTOR	ang. mammalian Target of Rapamycin, ssaczy cel rapamycyny
NF-κB	ang. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, czynnik jądrowy wzmacniacza lekkiego łańcucha kappa aktywowanych limf. B
p21^{Waf1/Cip1}	ang. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1, inhibitor cyklinozależnych kinaz 1
PARP	ang. poly ADP ribose polymerase, polimeraza poli-ADP-rybozy
PBMC	ang. Peripheral blood mononuclear cell(s), komórki jednojądrzaste z krwi obwodowej
PCNA	ang. Proliferating cell nuclear antygen, antygen jądrowy proliferującej komórki
PI3K	ang. Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, kinaza 3 fosfatydylinozytolo-4,5- bisfosforu

RAF	ang. Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase, kinaza serynowo-treoninowa protoonkogenu Raf-1
RAS	ang. Ras protooncogene, protoonkogen Ras
SASP	ang. senescence-associated secretory phenotype, fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem
SH2	ang. Src Homology 2, homolog Src 2
SOS	ang. Son of sevenless, brak odpowiednika
STAT	ang. Signal transducers and activators of transcription, transduktory sygnału i aktywatory transkrypcji
t_{1/2}	ang. Half-time; parametr farmakokinetyczny, określający okres półżycia badanej substancji w krwioobiegu
TFR	ang. Treatment-free remission, remisja nie wymagająca dalszego leczenia farmakologicznego
V_{ss}	Parametr farmakokinetyczny, określający objętość dystrybucji badanej substancji w stanie równowagi

I. Wstęp

Rozdział 1. Nowotwór jako choroba genetyczna cyklu komórkowego

1.1. DANE EPIDEMICZNE CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Nowotwory są najczęstszą przyczyną śmierci na całym świecie. W Ameryce, wiodącym kraju jeśli chodzi o leczenie i diagnostykę nowotworów, w 2022 r. zdiagnozowano prawie 2 miliony nowych przypadków, a ponad 600 tysięcy śmierci spowodowanych było chorobą i jej rozprzestrzenieniem w ciele¹. Zgodnie z danymi za 2020 rok, na świecie zarejestrowano 20 milionów nowych przypadków, w tym przypadki raka piersi (2,3 mln), raka płuc (2,2 mln), raka jelita grubego (1,93 mln), raka prostaty (1,41 mln), raka skóry innego niż czerniak (1,2 mln) i raka żołądka (1,09 mln). Nowotwory te stanowią aż 60% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów². W Polsce, zgodnie z informacjami podanymi przez Krajowy Rejestr Nowotworów, choroby nowotworowe są przyczyną ok. 100 tysięcy zgonów rocznie, co stanowi 25% wszystkich zgonów. Ponad 1 mln Polaków żyje z chorobą nowotworową, a 440 osób na każde 100 tysięcy ma zdiagnozowany nowotwór. W 2020 roku ponad 146 tysięcy Polaków otrzymało diagnozę onkologiczną. U mężczyzn najczęściej diagnozowany jest nowotwór gruczołu krokowego (ponad 20% przypadków), płuca (16%) i okrężnicy (7%); u kobiet najczęściej diagnozuje się raka piersi (23% przypadków), płuca (10%), trzonu macicy (7%) i okrężnicy (6%)^{3,4}.

1.2. ROZWÓJ NOWOTWORU – KANCEROGENEZA

Kancerogeneza to proces, w wyniku którego z komórki normalnej w wyniku mutacji onkogennej rozwija się komórka złośliwego nowotworu, zdolna do inwazji innych tkanek. Pytania o pochodzenie nowotworów nurtowały ludzkość od zarania dziejów, jednak najważniejsze odkrycia przyniósł wiek XX.

W roku 1927 Herman J. Muller opublikował pracę pokazującą, że promieniowanie jonizujące wywołujące nowotwory powoduje również przyspieszoną mutagenezę. Przełomowym odkryciem było stwierdzenie zależności liczby mutacji od siły promieniowania X. Ponadto odkryto, że powstające zmiany w genach nie są adaptacyjne ani deterministyczne, tylko

zupełnie przypadkowe, a część z nich jest letalna i nie daje efektu fenotypowego⁵. Za swoje odkrycia Muller otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny. Podczas swojej pracy badaczowi udało się dość szczegółowo opisać, w jaki sposób DNA ulega uszkodzeniom pod wpływem promieniowania, czemu dał podsumowanie w swoim wykładzie Noblowskim 12 grudnia 1946 r.:

„Poza zmianami w pojedynczych genach, promieniowanie powoduje również rearanżacje części chromosomów (...) spowodowane pęknięciami chromosomów. (...) Dwa (lub więcej) pęknięcia [w DNA] możliwie bardzo odległe, spowodowane niezależnymi uderzeniami [promieniowania], mogą powodować dużą zmianę strukturalnąⁱ. Są to zmiany różnego typu, w zależności od tego, gdzie nastąpiło pęknięcie i które końce połączyły się z którymi końcami. (...) Nierzadko dwa pęknięcia powstają w zlokalizowanych obok siebie punktach (...). Połączenie, w nowym porządku, uszkodzonych końców w następstwie takiego bliskiego pęknięcia, powoduje powstanie zmiany małej^j. Najczęściej, mały fragment [DNA] między pęknięciami zostaje zagubiony (powodując deficyt [genu]), ale czasem zostaje odwrócony, a nawet ulega transferowi w zupełnie inne miejsce dzięki kolejnemu uderzeniu [promieniowania] ⁶”.

Opis Mullera pozostaje do dziś bardzo aktualny. Faktycznie, w następstwie działania mutagenu powstają mutacje punktowe, insercje, delecje, deficyty, inwersje oraz rearanżacje genomowe. Kolejną obserwacją poczynioną przez Mullera było, że chromosomy podczas podziałów komórkowych są bardziej wrażliwe na uszkodzenia:

„Geny w skondensowanych chromosomach plemników, na przykład, zdają się być bardziej podatne na zmiany w materiale genetycznym niż te w fazie spoczynku. (...) Ta zmienność w efektywności jest, jak sądzę, oczekiwana. Nie podważa naszej konkluzji o przypadkowym, kwantowym charakterze zdarzeń inicjujących mutację genu.⁶”

Wiedząc, że promieniowanie X prowadzi do rozwoju nowotworu, odkrycie, że bezpośrednio pod jego wpływem zachodzi intensywna mutageneza, pozwoliło połączyć zmiany w materiale genetycznym z nowotworzeniem. Wysłunięto wniosek, że akumulacja mutacji w czasie jest odpowiedzialna za rozwój nowotworów. Sam Hermann mówił o tym, że bezpośrednio po

ⁱ W odniesieniu do konsekwencji powstania oddalonych od siebie pęknięć Muller używa sformułowania ang. *gross structural change*, podczas gdy w rezultacie pęknięć położonych blisko siebie powstają zmiany małe ang. *minute change*

zajściu mutacji, często nie można jeszcze zaobserwować jej szkodliwego wpływu⁶. Jednak nie każda dawka promieniowania X powodowała powstawanie onkogennych mutacji, nie każda była też letalna. Czy istnieje zatem system, umożliwiający komórce powrót do stanu równowagi? Odpowiedź na te wątpliwości przyniosły badania nad naprawą DNA w komórce prowadzone dwie dekady później przez Amerykańskich badaczy Jamesa Cleaver'a oraz Roberta Painter'a. Poszukując biologicznego modelu wrażliwości na promieniowanie UV badacze odnaleźli doniesienie konferencyjne z kwietnia 1967 r., w którym doktor Henry Lynch przedstawiał podłoże genetyczne choroby *Xeroderma Pigmentosum* (skóra pergaminowa, XP). Chorych cechowała wrażliwość na światło słoneczne, a także skłonność do zapadania na nowotwory skóry. Badacze pozyskali biopsje wrażliwej tkanki pacjentów dotkniętych chorobą, z której następnie wyprowadzili linie komórkowe⁷. Wyniki ich badań (opublikowane w czasopiśmie *Nature* w 1968 r.) pokazały, że normalne fibroblasty skóry mogą naprawiać szkody wywołane promieniowaniem UV poprzez wstawianie nowych, poprawnych zasad do DNA, podczas gdy komórki pacjentów dotkniętych XP posiadają mutację sprawiającą, że naprawa DNA jest nieobecna albo znacznie zredukowana. Ponieważ pacjenci ze skórą pergaminową po ekspozycji na światło słoneczne rozwijają nowotwory skóry, dysfunkcja w naprawie uszkodzeń w DNA w komórkach skóry musi być związana z kancerogenezą⁸. Badania nad mechanizmami naprawy DNA toczyły się, a za opracowanie ich szczegółowych mechanizmów w 2015 r. została przyznana nagroda Nobla dla Tomasa Lindahla, Paula Modricha oraz Aziza Sancar.

A zatem, istnieją czynniki takie jak promieniowanie X, które działając na DNA powodują w nim losowe mutacje, a te mutacje są odpowiedzialne za kancerogenezę. Czynniki te dziś nazywamy zbiorczo kancerogenami, a komórkę, która uległa mutacji pod wpływem działania kancerogenu nazywamy komórką zainicjowaną. Ale nie każda mutacja prowadzi do inicjacji nowotworowej. Postęp wiedzy genetycznej dostarczył wiedzy i pojęć, pozwalających precyzyjnie określić, co jest dziedziczne i w jaki sposób. Na spotkaniu Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej w 1957 r. Francis Crick sformułował centralny paradygmat biologii molekularnej (zwany również centralnym *dogmatem*), przedstawiający podstawowy przepływ informacji genetycznej: DNA → RNA → białko. Naturalnie dogmat ten istnieje obecnie w formie zmodyfikowanej, uzupełnionej o istnienie odwrotnej transkrypcji oraz prionów, jednak w swojej istocie pierwszy raz związał ściśle informację zawartą w DNA z jej funkcjonalnym produktem w postaci białka. Umożliwiło to badanie struktury pojedynczych genów i zrozumienie, że nawet pojedyncza zmiana w sekwencji nukleotydowej, która nie uległa

naprawie, przekazana komórce potomnej, może być źródłem patologii. Kolejnym krokiem było zatem ustalenie, jakie geny są odpowiedzialne za rozwój nowotworów, jakie zmiany w nich występują oraz jakie jest źródło tych zmian.

1.3. ONKOGENY, ANTYONKOGENY I PROTOONKOGENY

Jeszcze zanim Herman Muller rozpoczął swoje badania nad mutagenezą i jej związkiem z nowotworzeniem, na samym początku rozwoju genetyki jako dziedziny nauki, niemiecki biolog Theodor Boveri usiłował wyjaśnić mechanizmy rządzące proliferacją komórek. W swoim dziele „Concerning the Origin of Malignant Tumours” (1914 r.) hipotetyzował, że w normalnej komórce podziały mitotyczne zachodziłyby nieustannie, gdyby nie istnienie specjalnych genów (Boveri nazywał je jeszcze „chromosomami”) hamujących cykl komórkowy. Unieczynnienie takich „chromosomów” prowadziłoby do nieograniczonych podziałów komórkowych. Pisał:

„Komórka złośliwego nowotworu jest komórką ze specyficznym defektem; utraciła zdolność, którą normalna tkanka posiada. W tym aspekcie w zupełności zgadzam się z konceptem, który Hansemannⁱⁱ nazwał „anaplazją”. Komórka w tym drastycznie odmiennym stanie odpowiada inaczej na swoje środowisko i możliwe, że jest to w swojej istocie wystarczające, żeby sprawić, że dzieli się ona bez ograniczeń. (...) jest możliwe, że w tkankach metazoa istnieją specjalne mechanizmy hamujące, które muszą zostać wyeliminowane zanim rozpoczną się nieograniczone podziały [komórki]. (...) Eksperymenty na jeżowcach doprowadziły mnie do wniosku, że muszą istnieć nadrzędne własności takie same dla wszystkich chromosomów i specjalne, będące własnością tylko kilku. Co więcej, możliwe, że wiele chromosomów jest niezbędnych do zachowania podstawowych funkcji komórki oraz że są inne, których nieobecność mogłaby bardzo uszkodzić własności komórek, prawdopodobnie całkowicie zmieniając ich charakter, bez spowodowania śmierci. Jeśli, jak w tym wypadku, normalny związek komórki z otoczeniem jest uszkodzony permanentnie (...) może być to wystarczającą przyczyną nieograniczonych podziałów komórki i jej potomstwa.

Inną możliwością jest, że istnieje specyficzny mechanizm hamujący w każdej komórce, który umożliwia podział komórkowy tylko wtedy, kiedy specjalny bodziec zniesie ten mechanizm.

ⁱⁱ przyp. autora: David Hansemann jest uznawany za prekursora cytogenetyki ludzkich nowotworów, pierwszy zaobserwował nieprawidłowości w strukturze chromosomów komórki nowotworowej

Pozostawałoby to w zgodzie z naszym podstawowym założeniem, że istnieją specyficzne chromosomy hamujące podział komórkowy.⁹

W tym samym artykule Boveri przedstawił również alternatywną, w swoim rozumieniu, teorię o genach-chromosomach. Zakładał, że mogą istnieć „chromosomy” inicjujące podział mitotyczny komórki, jednak zbyt słabe by zrobić to bez wzmacniających ich ekspresję sygnałów z otoczenia. W komórce nowotworowej nadmiar takich „chromosomów” inicjujących stymulowałby nieograniczone podziały bez wzmacniającego sygnału:

„Jednakże, hipoteza, że istnieją chromosomy stymulujące podziały komórkowe również jest zgodna z naszymi rozważaniami [o nieograniczonym podziale wywołanym zmianami w chromosomach]. W tym wypadku, podział komórkowy odbywałby się wówczas, kiedy region chromatyny, zwykle zbyt słaby, zostałby wzmocniony jakimś czynnikiem aktywującym. Nieograniczone podziały komórki złośliwego nowotworu miałyby miejsce z powodu ciągłego nadmiaru chromosomów stymulujących.⁹”

Dzisiaj wiemy, że obie hipotezy przewidziane przez Theodora Boveriego są poprawne. Z jednej strony amplifikacje genów związanych z postępowaniem cyklu komórkowego faktycznie mogą prowadzić do proliferacji niezależnej od sygnałów z otoczenia. Takie geny stymulujące podziały komórkowe nazywamy dzisiaj **onkogenami** (więcej w podrozdziale 1.5).

Z drugiej zaś strony, nieograniczone podziały mogą być również spowodowane uszkodzeniami we fragmentach genów hamujących podziały, znanych dzisiaj jako **supresory nowotworu (antyonkogeny)**. Pierwszy odkryty i nazwany gen supresorowy zaobserwował w 1971 r. Alfred G. Knudson. Knudson badał siatkówczaka w postaci dziedzicznej oraz niedziedzicznej. Zauważył, że dzieci obciążone siatkówczakiem nie zawsze rozwijają chorobę, a jeśli już choroba wystąpi, to we wczesnym wieku dotyka oboje oczu. Jeśli zaś żaden z rodziców dziecka nie wykazywał cech choroby (forma sporadyczna), wówczas występowała ona wyłącznie w jednym oku i zwykle rozwijała się dopiero w dorosłości. Knudson uznał, że jedynym logicznym wyjaśnieniem jest, że dzieci dotknięte dziedziczną formą siatkówczaka posiadają rodzinną mutację w jednym allelu genu (pierwsze uderzenie), a żeby choroba dała objawy, ulec mutacji musi tylko drugi allel (drugie uderzenie). Sporadyczna forma choroby rozwija się późno i tylko w jednym oku, ponieważ muszą zajść dwie mutacje^{10,11}. Piętnaście lat później udało się wyodrębnić gen *RB1*, który opisywał Knudson¹². Jego białkowy produkt jest jednym z najważniejszych regulatorów cyklu komórkowego. Knudson wprowadził nazwę antyonkogen

na określenie genów, które pełnią funkcję supresorów nowotworów, a mutacje w nich mają charakter recesywny i dają efekt fenotypowy dopiero jak oba allele genu ulegną mutacji. Zjawisko to nazywa się dziś utratą heterozygotyczności albo LOH (ang. *loss of heterozygosity*). Na podstawie wyników swoich badań Knudson sformułował hipotezę dwóch uderzeń, w myśl której trzeba co najmniej dwóch mutacji w jednym genie, żeby nowotwór się rozwinął. W podobnym czasie odkryto gen *TP53*, który kontroluje między innymi śmierć komórkową. Wyizolowano go z wirusa SV40¹³. Dziś wiemy, że poza *RB1* oraz *TP53* istnieje co najmniej trzydzieści innych genów supresorowych, wśród nich m.in. *CDKN2A*, *APC*, *BRCA1*, *MLH1*, *MSH2* i *VHL*.

Termin **protoonkogeny** oznacza geny regulujące proliferację komórki¹⁴. Jedną z podstawowych cech charakterystycznych nowotworu jest podtrzymywanie ciągłych podziałów. Dzieje się to, kiedy protoonkogen ulegnie mutacji, nazywanej aktywacją, i stanie się onkogenem ekspresjonowanym konstytutywnie i wspierającym wzrost nowotworu. Pierwszym odkrytym onkogenem był wirusowy gen *v-src*, powodujący wzrost mięsaków Rousa. Za swoje odkrycie Rousse otrzymał w 1966 r. nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny. Dzięki odkryciu onkowirusów, upowszechniło się użycie słowa „proto-onkogen”, pozwalające pierwotnie odróżnić komórkowy, endogeny prekursor transformującego wirusowego genu od tak zwanych „onkogenów” przenoszonych przez wirusy, jak postulowali Huebner i Todaro¹⁵. Naturalnie, dzisiaj pojęcia te stosowane są szerzej, nie tylko w odniesieniu do transformacji nowotworowej wywołanej onkogennym szczepem wirusa.

Pierwszy endogeny onkogen został wyizolowany przez Roberta Weinberga w 1982 r. Zainspirowany historycznymi eksperymentami ze szczepami bakteryjnymi dwoinki zapalenia płuc, które mogły przekazać sobie geny wirulencji, we współpracy z Chiaho Shih'em podjął się próby przetransferowania fragmentu DNA z komórki nowotworowej do komórki normalnej. Eksperyment ten miał na celu udowodnienie, że źródłem nowotworu są przede wszystkim konkretne zmiany na poziomie DNA. Wyizolowano fragment DNA z komórek nowotworu, a następnie użyto go do transformacji nienowotworowych mysich fibroblastów NIH3T3. Komórki zawierający potencjalnie onkogenny fragment podano myszom zastrzykiem podskórnym, w wyniku czego zaczęły rosnąć guzy. Oznaczało to, że przekazanie onkogenego fragmentu z komórki nowotworowej do komórki normalnej, faktycznie zainicjowało nieograniczone podziały. Wskazywało to na genetyczne pochodzenie nowotworów¹⁶. W artykule z 1982 r. opublikowanym w czasopiśmie *Cell*, Shih i Weinberg piszą o fragmencie DNA

pochodzącym z raka pęcherza moczowego, który to jest zdolny transformować onkogenicznie mysie fibroblasty. Onkogen zdawał się pochodzić z sekwencji obecnych w normalnym komórkowym DNA¹⁷. Jak opublikował pół roku później hiszpański biochemik Mariano Barbacid, fragment różnił się jednak nieznacznie od sekwencji w ludzkim genomie, a konkretnie pojedynczym nukleotydem. Mutacja ta miała jednak daleko idące skutki i przekładała się na zmianę w sekwencji aminokwasowej. Zmiana ta była wystarczająca, żeby jej produkt był odpowiedzialny za transformację nowotworową całej komórki¹⁸. Protoonkogen początkowo został nazwany c-bas/has, dziś znany jest jako *HRAS*.

Badania Roberta Weinberga dostarczyły dowodów na genetyczne podłoże nowotworów, natomiast Mariano Barbacid pokazał dokładnie jak przewidywane przez badaczy w przeszłości mutacje faktycznie mogą wpływać na aktywację protoonkogenu. Dzisiaj wyróżniamy kilka **mechanizmów aktywacji protoonkogenów**¹⁹, do których zaliczamy:

- Zmianę sekwencji w krytycznym regionie regulatorowym genu, uniewrażliwiająca go na mechanizmy regulacyjne. Przykładem mogą być właśnie geny z rodziny protoonkogenów *RAS* (*KRAS*, *HRAS* and *NRAS*). Mutacja *KRAS* występuje często w najbardziej złośliwych nowotworach takich jak rak płuc (25% do 48% przypadków), jelita grubego (7% do 80% przypadków) oraz trzustki (25% do 87% przypadków)²⁰. Większość tych mutacji występuje w kodonie 12, 13 oraz 61 (miejsca w genie, które często ulegają mutacji w literaturze są spotykane pod nazwą "hot spots")²⁰.
- Amplifikację genu, która prowadzi do jego wzmożonej ekspresji. Przykładem takiego mechanizmu może być amplifikacja genu *c-MYC* w nowotworach piersi oraz jajnika²¹, *N-MYC* w nowotworach o pochodzeniu neuronalnym albo neuroendokrynnym takich jak nerwiak zarodkowy współczulny (neuroblastoma)²¹ albo gen *ERBB* w prawie 50% glejaków²².
- Rearanżacje chromosomalne, głównie translokacje. Rearanżacja skutkuje albo aktywacją protoonkogenu, albo stworzeniem konstytutywnie aktywnego genu fuzyjnego.

Aktywacja transkrypcyjna może być spowodowana przeniesieniem protoonkogenu ze swojego macierzystego miejsca na chromosomie i wstawieniem w region pod kontrolą aktywnego promotora. Przykładem może być translokacja t(8;14)(q24;q32) występująca w większości przypadków chłoniaka Burkitta²³. Translokacja ta powoduje niekontrolowaną proliferację poprzez wstawienie genu *c-MYC* w *locus* pod kontrolą

silnego wzmacniacza (enhancera) transkrypcji genu *IGH* (gen odpowiedzialny za ekspresję ciężkiego łańcucha przeciwciał). Skutkuje to nadekspresją *MYC* w komórkach limfoidalnych^{24,25}. W chłoniaku Burkitta znajdowane są też inne rodzaje translokacji *c-MYC*, jednak konsekwencja jest ta sama – deregulacja cyklu komórkowego²⁶.

W niektórych typach nowotworów fragment genu ulega translokacji do innego *locus*, co skutkuje powstaniem i konstytutywną ekspresją nowego genu fuzyjnego. Jednym z pierwszych odkrytych genów fuzyjnych jest gen *BCR-ABL1*, który zlokalizowany jest na tzw. chromosomie Filadelfia w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *Chronic myeloid leukemia*, CML). Odkrycie nowego chromosomu u chorych cierpiących na ten rodzaj białaczki miało miejsce jeszcze w 1961 r. w laboratoriach zlokalizowanych w Filadelfii²⁷⁻²⁹; przypisuje się je Peterowi Nowellowi oraz Davidowi Hungerfordowi³⁰. Translokacja t(9;22)(q34;q11) łączy kinazę tyrozynową *ABL1* (ang. *Abelson tyrosine kinase 1*) z genem *BCR* (ang. *Breakpoint cluster region*), w rezultacie czego powstaje produkt o wielkości 210 kDa – konstytutywnie aktywna kinaza BCR-ABL1. Rzadziej pojawiają się również produkty o długości 190 kDa. Forma p210 jest najważniejszym onkogenem w przewlekłej białaczce szpikowej, ale występuje również w niektórych przypadkach ostrej białaczki szpikowej lub ostrej białaczki limfoblastycznej^{19,28}. Molekularne i kliniczne konsekwencje ekspresji *BCR-ABL1* będą opisane w dalszych częściach tekstu.

BCR-ABL1 nie jest jedynym genem fuzyjnym o aktywności kinazy tyrozynowej. Innym przykładem może być *EML4-ALK* w niedrobnokomórkowym raku płuca³¹. Gen *ALK* koduje receptorową kinazę tyrozynową i często ulega translokacji, również w nowotworach hematologicznych³². Jego skrócona wersja przeniesiona pod kontrolę silnego promotora, jak na przykład promotor NPM¹⁹, zapewnia nieustanną aktywację. Onkogenna fuzja *EML4-ALK* jest szczególnie interesująca, ponieważ jest obecna w raku płuca rozwijanym przez osoby, które paliły rzadko albo wcale, głównie u młodych kobiet^{33,34}.

1.4. KANCEROGENEZA - PODSUMOWANIE

Kancerogeneza, a więc ciąg przemian genetycznych od normalnej komórki do komórki złośliwego nowotworu, może być opisana przy pomocy analogii do samochodu. Tak jak wciskanie pedału gazu powoduje, że samochód jedzie szybciej, tak podziały komórkowe

następują szybciej przez aktywację onkogenu. Mutacja, która aktywuje onkogen, nazywa się mutacją typu „*driver*”, a komórka, w której zaszła nazywa się komórką zainicjowaną.

Hamulce w samochodzie pozwalają zatrzymać rozpędzony samochód, jednak nie będą działały, jeśli uległy awarii. W komórce nowotworowej rolę hamulca pełnią geny supresorowe. Jeżeli ulegną mutacji, wówczas komórka traci zdolność do hamowania podziałów, na przykład w sytuacji poważnych uszkodzeń DNA albo braku czynników wzrostu. Komórka zainicjowana dzieli się w sposób niekontrolowany, przez co zwiększa się ryzyko powstawania mutacji. Mutacje, które powstaną w tym czasie to tzw. mutacje typu „*passanger*”, są niezbędne, żeby odblokować w komórce geny związane z inwazją i metastazą. Analogię można pokazać na przykładzie raka jelita grubego. Akumulacja kilku mutacji typu „*driver*” jest wystarczająca, żeby komórka epitelialna jelit uległa transformacji w komórkę nowotworu. Sekwencja mutacji nadaje takiej komórce przewagę selekcyjną podczas rozrostu klonalnego, a niestabilność genomowa ułatwia nabycie mutacji niezbędnych do progresji nowotworu³⁵. Na początku komórka traci gen supresorowy *APC*, który reguluje tempo podziałów komórkowych i adhezji wpływając na wewnątrzkomórkowe stężenie β -kateniny. Takie wydarzenie znacznie ułatwia rozwój nowotworu i jest obecne w niemal 80% wszystkich przypadków raka jelita³⁶. Deficjencja albo dysfunkcja (mutacja „*loss-of-function*”) genu *APC* prowadzi do aktywacji szlaku Wnt/ β -katenina i zwiększenia ekspresji genów *MYC* oraz *CCND1* – białek, które regulują cykl komórkowy i apoptozę. Szlak Wnt/ β -katenina promuje również fenotyp macierzysty (ang. *stemness*) i hamuje normalne różnicowanie³⁷. A zatem, komórka zdobywa w ten sposób przewagę proliferacyjną and innymi. Białko *APC* jest również zaangażowane w stabilizację kinetochorów podczas podziału mitotycznego. Jego brak powoduje powstanie nadliczbowych centrosomów, a przez to zwiększenie niestabilności genomowej komórek epitelialnych³⁸.

Kolejnym etapem jest mutacja punktowa w genie *KRAS* (najczęściej mutacja gain-of-function *KRAS*^{G12D}, występuje w niemal 40-50% wczesnych stadiów raka jelita grubego³⁹) która działa w synergii z utratą funkcjonalnego *APC*. Utrata kolejnych supresorów nowotworu - *SMAD4* oraz *TP53* podnosi całkowite tempo translacji⁴⁰, a także uniemożliwia zatrzymanie cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy ze względu na uszkodzenia DNA. Rola szlaku mutacyjnego *APC*, *KRAS*^{G12D}, *SMAD4* and *TP53* była dogłębnie zbadana i opisana przez Smit WL et al. w czasopiśmie PNAS, w którym badano wpływ mutacji poszczególnych genów w organoidach utworzonych przez ludzkie i mysie komórki epitelialne jelit⁴⁰.

Mechanizmy związane z mutacjami w genach uznawane są za kluczowe dla transformacji onkogennej, jednak warto nadmienić, że istnieją również mechanizmy epigenetyczne, takie jak na przykład metylacja promotora genu czy ekspresja pewnych mikroRNA, które sprawiają, że transkrypt genu może ulec represji lub degradacji. Przykład takiego mechanizmu opisuje Adamowicz M, Stukan I et al., pokazując jak w grupie pacjentów cierpiących na pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSC) podniesiony jest poziom mikroRNA-155. Jako, że mikroRNA-155 obniża ekspresję niektórych genów związanych z naprawą DNA, prowadzi to do niestabilności mikrosatelitarnej i prawdopodobnie predysponuje tę grupę chorych w przyszłości do transformacji onkogennej⁴¹.

1.5. „THE HALLMARKS OF CANCER”

Nowotwory stanowią niezwykle różnorodną grupę chorób. Jednakże istnieją pewne cechy wspólne, podsumowane pierwszy raz w 2000 roku przez Roberta Weinberga oraz Douglasa Hanahana w przełomowym artykule przeglądowym „The hallmarks of cancer”⁴². Populację złośliwych komórek nowotworowych cechuje nieustanna proliferacja, nieśmiertelność replikacyjna, oporność na supresory wzrostu i indukcję śmierci komórkowej. Klony te są ponadto niestabilne genomowo, a ich metabolizm przeprogramowany w sposób, który zapewni szybko rosące zapotrzebowanie na energię. Mikrośrodowisko, w którym rośnie i rozwija się nowotwór również ulega daleko idącym adaptacjom, umożliwiając angiogenezę i *immunoediting*, obejmujący unikanie odpowiedzi immunologicznej oraz zapewniający stan zapalny promujący rozwój guza. W końcu, komórki złośliwe są zdolne do przerzutu i inwazji tkanek innych narządów niż ten, w którym pierwotnie się rozwinęły.

Rozdział 2. Białaczka

W poprzednim rozdziale omówiono historię badań genetycznych nad nowotworami oraz molekularne podstawy kancerogenezy – mutacje w protoonkogenach, supresorach onkogenów oraz translokacje. Tematem niniejszego rozdziału będzie przegląd wiedzy na temat nowotworów szczególnego rodzaju, jakimi są białaczki oraz jednego z najlepiej przebadanych rodzajów nowotworów, a mianowicie przewlekłej białaczki szpikowej.

2.1. PRZEWLEKŁA BIAŁACZKA SZPIKOWA – DANE STATYSTYCZNE

Białaczki to grupa złośliwych nowotworów komórek krwi. Termin „białaczka” (łac. leucaemia) pochodzi od greckich słów „leukos”, oznaczającego biały oraz „haima” czyli krew. Klasyfikacji białaczek dokonuje się na podstawie liczby poszczególnych rodzajów komórek krwi, ich morfologii, immunofenotypu, zaburzeń cytogenetycznych i molekularnych, a także obrazu klinicznego pacjenta. Zgodnie z informacjami pochodzącymi z najaktualniejszego dostępnego raportu dla Ministerstwa Zdrowia za 2020 r., w Polsce białaczkę zdiagnozowano łącznie u 1610 mężczyzn i 1322 kobiet, co stanowiło odpowiednio 2,2% i 1,8% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów. Białaczkę szpikową (mieloidalną) odnotowano zaś u 550 mężczyzn (0,8% wszystkich nowotworów) i u 505 kobiet (0,7% wszystkich nowotworów). Białaczki są jednym z wiodących nowotworów złośliwych w Polsce pod względem śmiertelności. Odnotowano, że białaczka była powodem zgonu u 2,8% pacjentów onkologicznych płci męskiej (8. nowotwór złośliwy co do ilości zgonów), a także 2,8% pacjentów onkologicznych płci żeńskiej (10. nowotwór złośliwy co do ilości zgonów)³.

Generalnie białaczki kategoryzuje się do czterech dużych grup na podstawie linii pochodzenia w procesie krwiotwórczym (hematopoezy) komórek białaczki (szpikowa czy limfoidalna) oraz tempa przebiegu choroby (ostra, przewlekła), (**tabela 1**). Klasyfikacja ta umożliwia zastosowanie odpowiedniego leczenia⁴³.

Rodzaj	Komórki	Cytologia	Objawy	Epidemiologia
Ostra białaczka szpikowa (AML)	Niedojrzałe komórki linii mieloidalnej (WBC)	Mutacje w onkogenach, pojedyncza mutacja w mieloblastyce, nieprawidłowości cytogenetyczne	Anemia, spontaniczne krwawienia	Dzieci oraz dorośli
Przewlekła białaczka szpikowa (CML)	Komórki macierzyste szpiku	Translokacja chromosomalna, granulocyty	Anemia, małopłytkowość, powiększona śledziona	Rzadka u dzieci
Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)	Niedojrzałe limfocyty B i T oraz makrofagi	Aberracja chromosomalna	Zaburzenia funkcjonowania szpiku	Częsta u dzieci
Przewlekła białaczka limfoblastyczna (CLL)	Komórki linii limfoidalnej – limfocyty B lub T	Nieprawidłowości chromosomalne	Opuchlizna węzłów chłonnych, powiększenie śledziony	Częste u ludzi powyżej 55 roku życia

Tabela 1. Charakterystyka różnych typów białaczek.

Podział białaczek ze względu na linię pochodzenia w procesie krwiotwórczym komórki macierzystej oraz tempa przebiegu choroby. Przetłumaczono tabelę z Rafiq S et al., Journal of Biosciences and Medicines, 2018⁴⁴.

Przewlekła białaczka szpikowa jest rzadką chorobą, występującą u jednej do dwóch osób na 100 000⁴⁵. Występuje przeważnie u pacjentów powyżej 65 roku życia. Jej podstawowym onkogenem jest wspomniany wcześniej gen kodujący kinazę BCR-ABL1, który powstaje w wyniku translokacji chromosomalnej t(9;22)(q34;q11), a więc fragmentu genu *BCR* do obszaru kodującego elementy regulatorowe kinazy *ABL1*. W ten sposób powstaje konstytutywnie aktywna cytoplazmatyczna kinaza BCR-ABL1, która umożliwia intensywną proliferację, zahamowanie apoptozy oraz upośledza przyleganie komórek do podścieliska szpiku.

2.2. OBRAZ KLINICZNY I PRZEBIEG PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ

Zgodnie z informacjami pochodzącymi z aktualizowanego co roku podręcznika „Interna Szczeklika”⁴⁶, prawie połowa chorych nie odczuwa wyraźnych objawów chorobowych, chociaż u ok. 30% pacjentów pojawia się osłabienie, niektórzy tracą na masie oraz doświadczają tzw. „nocnych potów”. Utrata masy może być spowodowana faktem, że u co drugiego pacjenta śledziona jest powiększona, co sprawia, że uczucie sytości pojawia się szybciej, ale i może powodować dyskomfort w lewym podżebrzu. Czasem powiększonej śledzionie towarzyszy hepatomegalia. Pacjenci często doświadczają zaburzeń w mikrokrążeniu związanych z nadmierną liczbą leukocytów, ponad 200 000 – 300 000 komórek/ μ l. Rzadziej występujące

objawy dotyczą zaburzeń związanych z krzepnięciem krwi (zakrzepica/krwawienia), tkliwości mostka, a także zaburzonego metabolizmu puryn (dna moczanowa).

Białaczkę najczęściej rozpoznaje się podczas rutynowego badania morfologii krwi, ponad 90% przypadków w fazie przewlekłej (chronicznej, CP). Badania pomocnicze przy rozpoznaniu CML to biopsja aspiracyjna i trepanobiopsja szpiku, a także badania cytogenetyczne szpiku i molekularne krwi (obecność transkryptu genu *BCR-ABL1*, ewentualnie inne aberracje chromosomalne). Nieleczona faza przewlekła w ciągu 3-4 lat przechodzi w kryzę blastyczną, która w przebiegu przypomina ostrą białaczkę szpikową. Z powodu przyspieszonej proliferacji podczas kryzy blastycznej, w komórkach białaczki powstaje wiele mutacji, co przekłada się na fenotyp oporny na leczenie oraz złe rokowanie^{46,47}.

2.3. ROKOWANIE W PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZCE SZPIKOWEJ

Do oceny rokowania, a więc szans na wyleczenie i przeżycie, stosuje się cztery systemy prognostyczne. System Sokala, Hasforda, EUTOS oraz ELTS (tabela 2). Najbardziej aktualna jest skala EUTOS, która przewiduje odpowiedź pacjenta na leczenie imatinibem, jednak ważne jest, żeby pomiar został dokonany przed rozpoczęciem leczenia. Skala ELTS bierze pod uwagę parametry takie jak wiek, rozmiar śledziony, liczba komórek blastycznych oraz płytek krwi wyrażona w notacji wykładniczej $10^9/L$. Zmienne muszą być poddane ocenie w momencie diagnozy pacjenta. Uzyskane w ten sposób wyniki pozwalają przewidywać długoterminowe przeżycie.

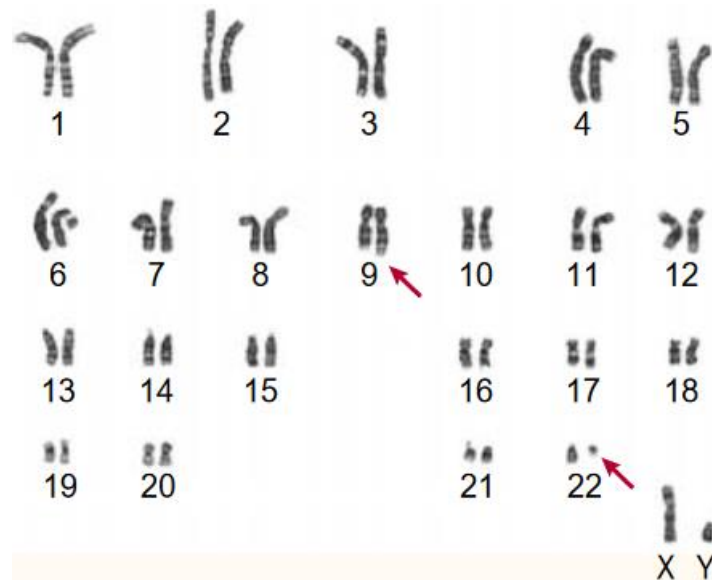
Skala (system)	Opis	Parametry	Ryzyko
Sokala⁴⁸	Skala używana w czasach przed wynalezieniem inhibitorów kinazy tyrozynowej. Od tego czasu parametry przeżywalności uległy poprawie.	<ul style="list-style-type: none"> Rozmiar śledziony Odsetek komórek mieloblastycznych we krwi obwodowej Wiek Liczba płytek krwi 	<p>Niskie <0,8 Średnie 0,8-1,2 Wysokie >1,2</p> <p>Niskie – dwuletnie przeżycie 90%; mediana czasu przeżycia: 5 lat Średnie – dwuletnie przeżycie 65 – 90%; mediana przeżycia 2,5 – 5 lat Wysokie – dwuletnie przeżycie 65%; mediana przeżycia: 2,5 roku</p>
Hasforda⁴⁹	Ocena przeżywalności u pacjentów leczonych IFN α	<ul style="list-style-type: none"> Wiek Rozmiar śledziony Liczba płytek krwi Liczba blastów (%leukocytów) Ilość eozynofiliów (%leukocytów) Ilość bazofiliów (%leukocytów) 	<p>Niskie: Hasford score \leq 780 – Średnie: Hasford score 781-1480 Wysokie: Hasford score \geq1480</p>
EUTOS⁵⁰	Ocena powodzenia terapii 18 miesięcy po rozpoczęciu leczenia (osiągnięcie CCgR, czyli kompletnej remisji cytogenetycznej)	<ul style="list-style-type: none"> Rozmiar śledziony Odsetek bazofiliów 	EUTOS score > 87 - pacjent wysokiego ryzyka nieosiągnięcia kompletnej remisji cytogenetycznej (CCgR) po 18 miesiącach
ELTS⁵¹ (ocena przeżycia długoterminowego)	Ocena ryzyka śmierci związanego z przewlekłą białaczką szpikową	<ul style="list-style-type: none"> Wiek Rozmiar śledziony Liczba komórek blastycznych we krwi obwodowej (zaokrąglone do pełnej liczby) Liczba płytek krwi (podana w 10⁹/L) 	<p>Niskie: ELTS score \leq 1.5680 Średnie: ELTS score > 1.5680 \leq 2.2185 Wysokie: ELTS score > 2.2185</p>

Tabela 2. Systemy oceny rokowania u pacjentów dotkniętych przewlekłą białaczką szpikową. Tabela na podstawie publikacji ⁴⁸⁻⁵¹

2.4. KINAZA BCR-ABL1

Obserwacje chromosomów poczynione na początku XX wieku pozwoliły jednoznacznie stwierdzić, że istnieją różnice między komórkami nowotworowymi i normalnymi, odzwierciedlające się w zawartości jądra komórkowego. Teodor Boveri jeszcze w 1914 r. wysuwał przypuszczenia o genetycznym pochodzeniu nowotworów, jednak dopiero eksperymenty Roberta Weinberga w drugiej połowie XX wieku ostatecznie to potwierdziły.

Wspomniani wcześniej w tekście (punkt 1.3.1) Peter Nowell oraz David Hungerford w 1960r. zaobserwowali, że wśród komórek pacjentów cierpiących na przewlekłą białaczkę szpikową, chromosom 22 (chromosom Filadelfia, Ph) zdaje się być wyjątkowo niewielkich rozmiarów. Typowy kariotyp osoby dotkniętej przewlekłą białaczką szpikową przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Typowy kariotyp osoby chorej na przewlekłą białaczkę szpikową.

Rycina przedstawia kariotyp osoby chorej na przewlekłą białaczkę szpikową. Czerwoną strzałką zaznaczono efekt translokacji 9;22. Na podstawie Knudson AG, 2001¹⁰.

Czternaście lat później Janet Rowley ustaliła, że to translokacja między chromosomem 9 i 22 jest odpowiedzialna za powstanie chromosomu Ph^{47,52}. Zidentyfikowanie konkretnych genów nastąpiło niewiele później. Biologiczna funkcja białka ABL1 powoduje, że obecność kinazy BCR-ABL1 jest wystarczająca, żeby wywołać symptomy przewlekłej białaczki szpikowej, co zostało pokazane na modelach zwierzęcych jeszcze w 1977 roku⁵³. Mutacje, które upośledzały aktywność kinazy w rejonie kieszeni wiążącej ATP (substytucja K1176R), uniemożliwiały rozwinięcie białaczki, nawet jeśli ekspresja miała miejsce w hematopoetycznych komórkach macierzystych⁵⁴.

Pęknięcia w genie *ABL1* powstają zwykle przed eksonem 1b, za eksonem 1a albo pomiędzy eksonem 1b i 1a, możliwe też są różne miejsca pęknięć w genie *BCR*, które prowadzą do powstania różnych izoform BCR-ABL1⁴⁷. Najczęstsza izoforma jest wynikiem fuzji eksonu 13 albo 14 genu *BCR* z eksonem 2 genu *ABL1*, czego produktem jest transkrypt **e13a2 (b2a2)** albo **e14a2 (b3a3)**, z którego następnie powstaje białko o wielkości 210 kDa (**p210^{BCR-ABL1}**). W niektórych przypadkach przewlekłej białaczki szpikowej spotykany jest wariant białka o

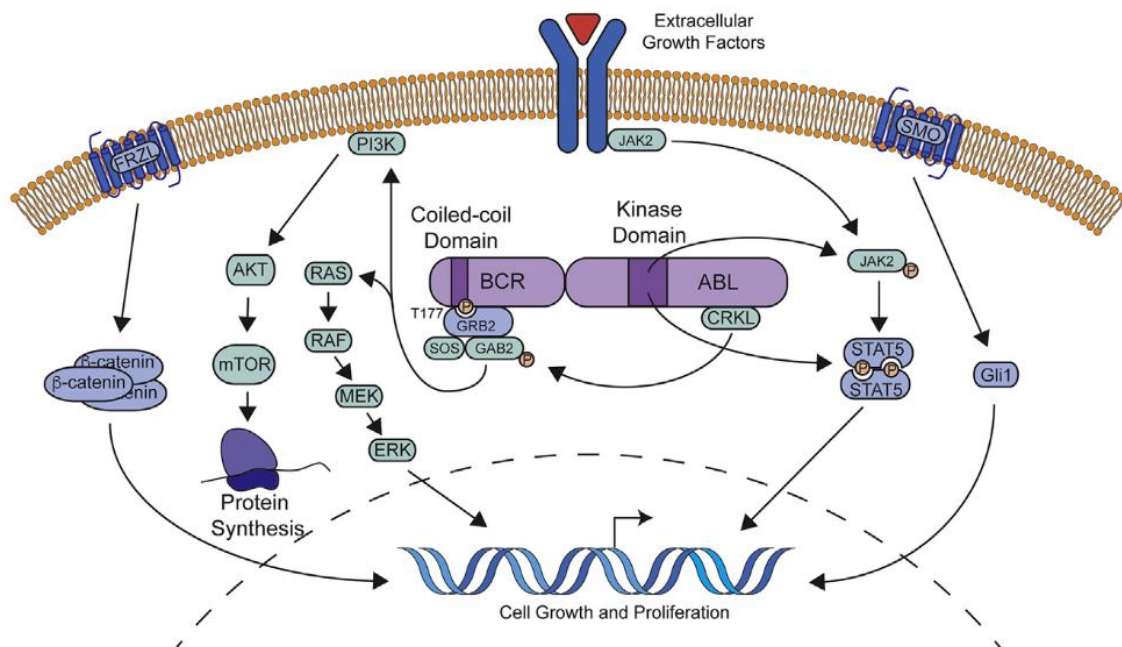
wielkości 190 kDa (**p190^{BCR-ABL1}**). W innych typach Ph⁺ białaczki, takich jak przewlekła białaczka neutrofilowa, często spotykana jest forma p230^{BCR-ABL1} 55.

Fuzja genu *BCR* z genem *ABL1* prowadzi do co najmniej trzech podstawowych onkogennych konsekwencji (szlaki sygnałowe przedstawiono na rycinie 2):

- Na N-końcu zawierającym część BCR znajduje się domena *coiled coil*, umożliwiająca dimeryzację oraz konstytutywną autofosforylację domeny kinazy tyrozynowej białka ABL1. To z kolei prowadzi do fosforylacji kolejnych białek szlaku sygnałowego, takich jak:
 - GRB2 (ang. *Growth Factor Receptor Bound Protein 2*)/GAB2 (ang. *Growth Factor Receptor Bound Protein 2-Associated Protein 2*)
 - CRKL (ang. *V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog-Like*)
 - JAK/STAT (ang. *Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*)
 - MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
 - PI3K (ang. *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase*)^{47,56–59}.
- Fosforylacja 177. reszty tyrozyny białka BCR aktywuje ważny onkogen, onkogen RAS (ang. *Ras protooncogene*)⁶⁰. Jest to fosforylacja niezbędna dla leukemogenezy, a mutacja Tyr177Phe w tym rejonie obniża zdolność aktywacji BCR-ABL1. Fosforylacja T177 umożliwia oddziaływanie z domeną SH2 (ang. *Src Homology 2*) białka GRB2 (składnika kompleksu GRB2/GAB2/SOS). Ta interakcja aktywuje szlak sygnałowy RAS/RAF/MEK/ERK, który prowadzi do transkrypcji genów związanych z przeżyciem i proliferacją (więcej punkt 2.4.3) oraz szlak PI3K/AKT, który jest m.in. odpowiedzialny za hamowanie apoptozy (punkt 2.4.2).
- BCR-ABL1 aktywuje czynnik transkrypcyjny STAT5 bezpośrednio i pośrednio, poprzez aktywację JAK2 i kinaz SRC – HCK (ang. *Hemopoietic Cell Kinase*) oraz LYN (ang. *Lck/Yes-Related Novel Protein Tyrosine Kinase*). Aktywacja ta hamuje apoptozę poprzez aktywację transkrypcji antyapoptotycznego genu *BCL-X* (ang. *BCL2 Like 1*)⁶¹.

BCR-ABL1 aktywuje wiele onkogennych ścieżek, które działają ze sobą w synergii, odblokowując prawdziwy onkogenny potencjał fuzyjnej kinazy. Seria eksperymentów, w których do komórek linii K562 (chroniczna białaczka szpikowa, BCR-ABL1-pozytywne) wprowadzano dominującą-negatywną (a więc unieczynnioną) formę genów kodujących białka RAS, PI3K albo STAT5, ujawniła znaczną apoptozę w komórkach ko-ekspresyjujących 2 z 3 dominujących-negatywnych form w jakiegokolwiek kombinacji. Prowadziło to do konkluzji, że

aktywność tylko jednego szlaku, bez względu na to, czy jest to szlak RAS, STAT5 czy PI3K, nie wystarcza do podtrzymania wzrostu i przeżycia komórek K562⁶².



Rycina 2. BCR-ABL1 aktywuje w sposób ciągły onkogenne szlaki sygnałowe, związane z przeżyciem komórki.

Na fragmencie BCR kinazy BCR-ABL1 znajduje się domena coiled coil, umożliwiająca dimeryzację i autofosforylację kinazy. Fosforylacja reszty Tyrozyny 177 (T177) rekrutuje kompleks GRB2/SOS/GAB2. Kompleks ten aktywuje onkogenne szlaki PI3K/AKT oraz RAS/RAF/MEK/ERK. Domena kinazy tyrozynowej zlokalizowana na fragmencie ABL1 aktywuje szlak JAK/STAT, a także STAT5 bezpośrednio promując jego jądrową translokację. BCR-ABL1 aktywuje również CRKL, która w następstwie fosforyluje kompleks GRB2/SOS/GAB2. Rycina pochodzi z Braun T et al., Cancer Cell, 2020⁴⁷.

CML jest chorobą genetycznie homogeną, przez co przez wielu bywa uznawana za modelową chorobę nowotworową i często stanowi jeden z pierwszych modeli do badań nad nowymi lekami. Niewielka liczba mutacji inicjujących przewlekłą białaczkę szpikową pozwoliła stworzyć jedną z najlepszych do tej pory chemioterapii nowotworów – terapię inhibitorem kinazy tyrozynowej, imatinibem. Lek nowej generacji był pierwszym z wielu kolejnych inhibitorów kinaz, co pozwalało precyzyjnie wymierzyć leczenie w podstawowy mechanizm napędzający chorobę. W dalszych podrozdziałach poszczególne szlaki sygnałowe odpowiedzialne za rozwój CML zostaną omówione bardziej szczegółowo.

2.4.1. Szlak sygnałowy JAK/STAT

Szlak JAK/STAT prowadzi do transkrypcji genów związanych z mitogennymi szlakami sygnałowymi⁶³. W prawidłowej hematopoezie wewnątrzkomórkowa kinaza tyrozynowa Janus

ulega aktywacji po związaniu przez receptor hematopoetycznych czynników wzrostowych. To zdarzenie prowadzi do a fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT5, promując jego jądrową translokację^{58,64}. Poza aktywacją szlaku JAK/STAT, BCR-ABL1 może bezpośrednio aktywować czynnik transkrypcyjny STAT5, co uruchamia ekspresję białek cyklu komórkowego, na przykład cykliny D1, uniezależniając proliferację komórki od sygnałów wzrostu oraz od aktywacji kinazy JAK. Ponadto, eksperymenty w mysim modelu CML pokazały, że delecja genu *Jak2* skutkuje przewagą klonalną i przyspieszonym rozwojem przewlekłej białaczki szpikowej⁶⁵.

2.4.2. Szlak sygnałowy PI3K/AKT/mTOR

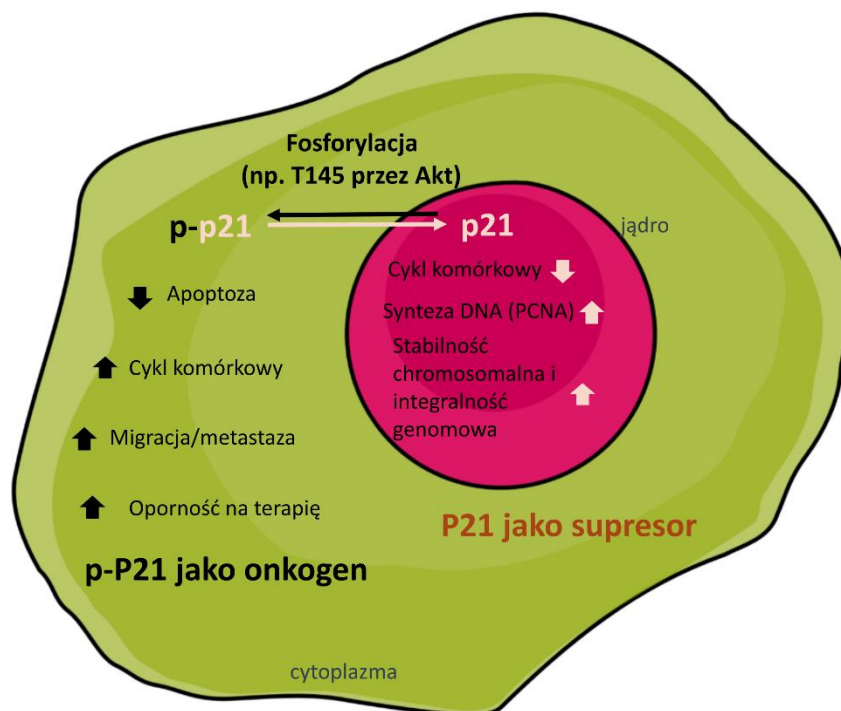
Szlak PI3K/AKT oraz aktywowane przez ten szlak białko mTOR (ang. *Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*) i czynnik transkrypcyjny NF-κB (ang. *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 3*)⁶⁶ są związane z ekspresją genów hamujących apoptozę i promujących przeżycie komórki⁶³.

Kinaza PI3K jest rekrutowana przez ufosforylowane białko GAB2, co dalej prowadzi do aktywacji kinazy AKT. Aktywacja AKT (ang. *AKT Serine/Threonine Kinase*) podnosi ekspresję czynnika transkrypcyjnego Myc, a także stabilizuje go hamując jego degradację przez białko GSK-3β (ang. *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*). Kinaza AKT wpływa również na lokalizację różnych białek, które mogłyby mieć negatywny wpływ na proliferację i przeżycie komórki. Jednym z takich białek jest p21^{Waf1/Cip1} (ang. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*), opisywane dalej w tekście jako p21.

2.4.2.1 Dwa „oblicza” białka p21: jądrowy supresor i cytoplazmatyczny onkogen

Fosforylując białko p21 na tyrozynie 145 (T145) kinaza AKT powoduje sekwestrację tego białka w cytoplazmie, co sprzyja przeżyciu komórki nowotworowej. W literaturze możemy znaleźć przykłady, jak cytoplazmatyczna lokalizacja p21 spowodowana aktywnością AKT indukowała oporność na chemioterapię m.in. doksorubicyną⁶⁷, cis-platyną⁶⁸, paklitakselem⁶⁹, a także 5-fluorouracylem⁷⁰. P21 to białko o niedługiej sekwencji i ubogiej strukturze drugorzędowej, bez struktur wyższego rzędu. Umożliwia to związanie i hamowanie aktywności wielu cyklinozależnych kinaz⁷¹⁻⁷³. P21 jest w stanie wiązać kinazy o podobieństwie sekwencji nie przekraczającym 83%, a także cykliny o podobieństwie nie przekraczającym 42%⁷². W literaturze rola p21 bywa zawężana do funkcji inhibitora cyklu komórkowego, induktora procesu starzenia komórkowego (senescencji) albo supresora wzrostu nowotworu, ale w istocie jego rola jest bardziej złożona; p21 powinno być postrzegano jako szeroko pojęty regulator⁷¹. Tak na przykład, niskie stężenia p21 mogą w zależności od kontekstu

środowiskowego stymulować proliferację komórek⁷³, co stoi w sprzeczności z powszechnie uznawaną rolą inhibitora cyklu komórkowego. Dwoistość natury p21 odzwierciedla złożona rola w indukcji bądź hamowaniu apoptozy, co w dużej mierze zależy od lokalizacji p21 wewnątrz komórki. W cytoplazmie komórki nowotworowej p21 wykazuje aktywność onkogeną, zapobiegając apoptozie poprzez bezpośrednie oddziaływanie i hamowanie aktywności wielu kaspaz i efektorów apoptozy^{71,72}. Stymuluje to oporność na chemioterapię, a także wspiera migrację i metastazę komórek nowotworu złośliwego. Z drugiej strony p21 może również promować apoptozę⁷⁴, chociaż mechanizm nie jest do końca poznany i jest zwykle związany z lokalizacją jądrową białka⁷³. Ponadto, w jądrze komórkowym p21 oddziałuje z elementami cyklu komórkowego (cykliny, cyklinozależne kinazy), a także może wpływać na stabilność genomową poprzez stymulowanie naprawy DNA i oddziaływanie z białkiem PCNA⁷¹. Jądrowe p21 działa jak supresor wzrostu nowotworu. Dwoistość funkcji p21 w zależności od komórkowej lokalizacji została schematycznie zobrazowana na rycinie 3.

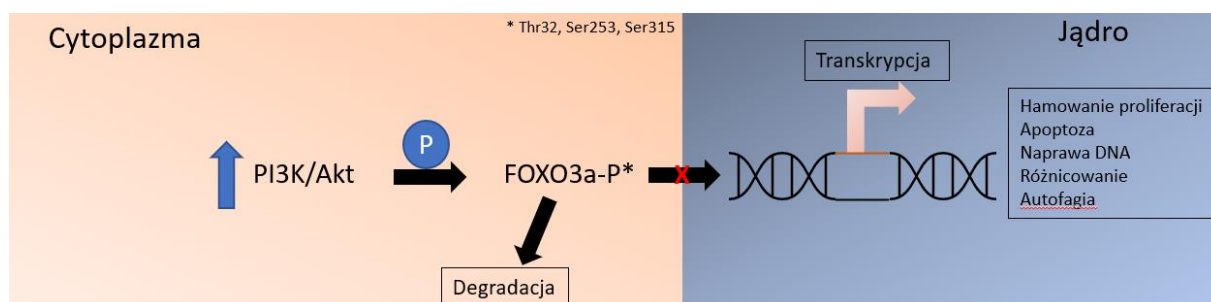


Rycina 3. Schematyczna ilustracja ukazująca podwójną rolę p21 w zależności od lokalizacji wewnątrz komórki. Fosforylowane p21 sekwestrowane jest w cytoplazmie, gdzie pełni rolę onkogeny, hamując apoptozę i promując fenotyp oporny na chemioterapię. Jądrowe p21 pełni rolę supresora wzrostu nowotworu, hamuje cykl komórkowy, wspiera naprawę DNA i stabilność chromosomową. Rycina na podstawie Kreis et al., *Cancers (Basel)*, 2019⁷¹

2.4.2.2 Czynniki Transkrypcyjny FOXO3a

Innymi białkami fosforylowanymi przez AKT są czynniki transkrypcyjne FOXO (ang. *Forkhead Box O*), w tym FOXO3a. FOXO3a może inicjować transkrypcję białek działających

proapoptotycznie, hamujących proliferację^{75,76}, a również białek indukujących naprawę DNA⁷⁷, detoksykację wolnych rodników⁷⁸, autofagię⁷⁹ oraz różnicowanie⁸⁰. Białka FOXO mogą też inicjować transkrypcję wcześniej opisanego białka p21⁷⁵. Chociaż w literaturze FOXO3a bywa opisywany jako supresor nowotworzenia, którego inaktywacja prowadzi do progresji nowotworu⁸¹, jego rola jest w istocie złożona i zależy ściśle od lokalizacji wewnątrz komórki, podobnie jak w przypadku p21. FOXO3a jest mediatorem odpowiedzi na różnego rodzaju stres komórkowy, co odzwierciedla się w jego modyfikacjach potranslacyjnych i w konsekwencji w lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Na przykład, pod wpływem stresu energetycznego w komórce nowotworowej może nastąpić aktywacja szlaku MEK/ERK oraz AMPK (ang. *5'-AMP-Activated Protein Kinase Catalytic Subunit Alpha-1*), co prowadzi do fosforylacji FOXO3a odpowiednio na reszcie seryny 12 oraz na seryny 30. Fosforylacje te prowadzą do mitochondrialnej translokacji FOXO3a, gdzie może on inicjować transkrypcję genów mitochondrialnego DNA i wspomagać przetrwanie stresu genotoksycznego, wywołanego chemioterapią⁷⁶. W stresie oksydacyjnym natomiast, kaskada sygnałowa mediowana przez kinazę JNK może fosforylować FOXO3a na reszcie seryny 574, co promuje jego jądrowy import i umożliwia aktywność transkrypcyjną. JNK wpływa też na obniżenie aktywności PI3K/AKT, co również wspomaga translokację jądrową białka⁸². Szlak PI3K/AKT natomiast deaktywuje FOXO3a, sekwestrując je w cytoplazmie (rycina 4). Aktywne białko AKT może fosforylować jądrowe FOXO3a na trzech konserwowanych ewolucyjnie resztach aminokwasowych – treoninie 32, serynie 253 oraz serynie 315⁷⁹. Tak ufosforylowane FOXO3a oddziałuje z białkiem 14-3-3 transportującym go poza jądro, co prowadzi do akumulacji w cytoplazmie, a nawet degradacji⁷⁶.



Rycina 4. Schemat obrazujący wpływ aktywności kinazy AKT na lokalizację i funkcję FOXO3a w komórce.

FOXO3a jest czynnikiem transkrypcyjnym, indukowanym stresem i promującym apoptozę, hamowanie proliferacji, a także naprawę DNA. Aktywacja kinazy AKT powoduje fosforylację FOXO3a na konserwowanych ewolucyjnie resztach Thr32, Ser253 oraz Ser315. Tak ufosforylowane FOXO3a oddziałuje z białkiem 14-3-3, usuwającym czynnik transkrypcyjny z jądra. FOXO3a ulega cytoplazmatycznej sekwestracji, co uniemożliwia mu pełnienie funkcji transkrypcyjnej, a także destabilizuje i prowadzi do jego degradacji.

2.4.3. Szlak sygnałowy RAS/RAF/MEK/ERK

Aktywacja szlaku sygnałowego RAS/RAF/MEK/ERK prowadzi do ekspresji genów stymulujących wzrost i proliferację komórek. Fragment BCR kinazy BCR-ABL1 stanowi punkt dokujący dla kompleksu białek GRB1/GAB2/SOS. Uformowanie tego kompleksu umożliwia aktywację różnych szlaków sygnałowych, w tym opisanego w punkcie 2.4.2 szlaku PI3K/AKT oraz kaskady sygnałowej MAPK. MAPK to grupa kinaz serynowo/treoninowych aktywowanych mitogenami (ang. *Mitogen-activated protein kinase*), a więc cząsteczkami indukującymi podziały w komórce. Kinazy te pełnią kluczową rolę w przekształceniu sygnału pochodzącego z zewnątrz na odpowiedź komórkową⁸³. W kaskadzie biorą udział co najmniej trzy enzymy – kinaza kinazy MAPK (MAPKKK), kinaza MAPK (MAPKK) oraz MAP kinaza (MAPK).

W przewlekłej białaczce szpikowej najlepiej opisaną MAPK jest ERK1/2 (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase 1*), dla której substratem jest czynnik transkrypcyjny STAT1/5 oraz Myc⁸³. Kompleks GRB1/GAB2/SOS fosforyluje kinazę Ras, następnie Raf (MAPKKK), która dalej przekazuje sygnał do kinazy MEK1/2 (MAPKK) i ERK1/2 (MAPK). Ufosforylowany ERK ulega jądrowej translokacji, gdzie promuje ekspresję genów związanych ze wzrostem i mitozą. Innymi aktywnymi kinazami MAPK są p38MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase 14*) oraz JNK.

Ekspresja p38MAPK ma zwykle miejsce w związku z uszkodzeniami powodowanymi promieniowaniem UV, szokiem cieplnym, szokiem osmotycznym, lipopolisacharydem, inhibitorami syntezy białek, cytokinami prozapalnymi oraz niektórymi mitogenami⁸³. Kinaza ta pełni kluczową rolę w szlakach sygnałowych związanych między innymi z apoptozą, a jej aktywacja może powodować areszt mitotyczny w punkcie kontrolnym wrzeciona podziałowego⁸⁴. Istnieją doniesienia pokazujące związek kinazy p38MAPK z fosforylacją histonu H2AX, promującą apoptozę w odpowiedzi na imatinib⁸⁵. Jednak wiele wskazuje na to, że wzmocnienie albo osłabienie efektów terapeutycznych TKI przez p38MAPK jest związane z dominującą izoformą^{86,87}.

Szlaki sygnałowe związane z kinazami MAP są bardzo złożone i obejmują wiele funkcji istotnych dla przeżycia komórki w sytuacji stresowej. Stąd, w niniejszym doktoracie przedstawiono opis jedynie wybranych ścieżek, istotnych z punktu widzenia omawianego w dalszych częściach mechanizmu aktywności związku BK124.

2.5. KOMÓRKI MACIERZyste BIAŁACZKI

Rozwój białaczki przebiega odmiennie od nowotworów litych. Między innymi nowotwory te różni presja związana z rozwinięciem zdolności do przerzutowania. Żeby przerzutować nowotwór lity musi pokonać bariery związane z wytworzeniem nowych naczyń albo przedostaniem się do istniejących, a więc musi mieć zdolność do wytwarzania metaloproteinaz, uwalniania czynników proangiogennych, uniknięcia apoptozy związanej z *anoikis* (tj. wywołanej brakiem ścisłego kontaktu między komórkami) a także musi uzyskać zdolność do przeżycia w krwioobieg (tranzycja epitelialno-mezenchymalna, EMT). Te wszystkie bariery sprawiają, że przerzutowanie nowotworów stałych nie jest wydajnym procesem⁸⁸. Przeszkody te nie istnieją jednak dla komórki białaczki. Poszczególne białaczki wykazują swoisty dla siebie tropizm do konkretnych organów⁴³. Proces przerzutowania obrazuje analogia „seed and soil”, nasienia i gleby. Termin ten pochodzi od obserwacji poczynionej w 1889 r. przez chirurga Stephana Pageta w artykule „Distribution of secondary growths in cancer of the breast” opublikowanym w czasopiśmie *Lancet*. Paget zauważył, że rak piersi ma tendencję do przerzutowania do konkretnych narządów. Pisał wówczas:

*„Kiedy roślina się rozsiewa, jej nasiona są niesione przez wiatr we wszystkich kierunkach; nasiona te mogą żyć i wzrastać jedynie, jeśli upadną na żyzny grunt. (...) Rozumowanie statystyczne jest podatne na wiele błędów. Niemniej, analogia do innych chorób zdaje się wspierać co wyniki statystyki sugerują, zależność nasiona (seed) od odpowiedniego gruntu (soil). W patologii nowotworu najcenniejsza jest praca tych, którzy (...) badają naturę nasienia. Są oni jak naukowcy botanicy, podczas gdy ci, którzy przerzucają opisy przypadków są tylko jak rolnicy, choć ich obserwacje dotyczące żyzności gleby są również pomocne”.*⁸⁹

Wiele lat później w artykule przywołującym wspomnienie badacza, profesorowie Isaiah Fidler oraz George Poste na łamach *Lancet oncology* wspominając historyczną publikację przypisali terminy używane przez Paget’a do funkcjonujących obecnie nazw:

*„Hipoteza „seed and soil” jest teraz powszechnie akceptowana i cytowana. Nasienie przemianowano na komórkę progenitorową, komórkę inicjującą, komórkę macierzystą nowotworu lub komórkę metastatyczną; glebę zaś nazywamy teraz czynnikami gospodarza, stromą albo mikrośrodowiskiem panującym wewnątrz narządu”.*⁹⁰

Zarówno komórki linii mieloidalnej jak i limfoidalnej pochodzą od hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC). Komórki HSC nie dzielą się często, większość z nich jest w stanie określanym mianem *quiescent*, to znaczy „milczącym”. Dla odróżnienia od uśpionych komórek nowotworowych, które nie dzielą się w stanie uśpienia (ang. *dormancy*), komórki te mogą się podzielić i wrócić do wyciszenia aktywności proliferacyjnej⁹¹. HSC są jednak komórkami ruchomymi, zdolnymi do przemieszczania się krwioobiegami do odległych narządów, w tym narządów niehematopoetycznych w odpowiedzi na stan zapalny⁹². Istnieje wiele dowodów na to, że białaczki pochodzą od pojedynczej hematopoetycznej komórki macierzystej, w której powstała onkogenna mutacja, na przykład gen fuzyjny *BCR-ABL1*⁴³. Komórki potomne mogą nabyć kolejne mutacje, przez co na przykład komórki ostrej białaczki szpikowej cechuje duża heterogenność. HSC, która nabyła onkogenną mutację staje się komórką macierzystą białaczki – LSC (ang. *Leukemia stem cell*). Pierwsze doniesienia o komórkach zdolnych do odtworzenia nowotworu po przeszczepie do myszy pochodzą sprzed 25 lat⁹³. W późniejszych latach zidentyfikowano te komórki na podstawie markerów powierzchniowych jako komórki CD34⁺ CD38⁻ (ang. *Cluster of differentiation*, CD). Są one zdolne do odnowienia swojej populacji, a także wyróżnicowania w kierunku białaczki i zainicjowania nawrotu nowotworu, na przykład po intensywnej terapii. Komórki LSC przebywają głównie w szpiku kostnym, w wyspecjalizowanym mikrośrodowisku, nazywanym „niszą”. Mikrośrodowisko to chroni komórki LSC przed chemioterapią, a także umożliwia podziały i hamuje różnicowanie⁹⁴. W porównaniu do prawidłowych macierzystych komórek hematopoetycznych, komórki LSC CD34⁺ CD38⁻ mają zaburzoną ekspresję markerów takich jak CD25, CD32, CD44, CD96, CD123, GPR56 (ang. *G protein-coupled receptor 56*), CLL1 (ang. *C-type lectin-like molecule-1*) oraz IL1RAP (ang. *Interleukin-1 receptor accessory protein*), N-kadheryna i Tie2⁹⁵. Jednak ze względu na duże zróżnicowanie poziomu ekspresji tych markerów pomiędzy pacjentami, nie można wyodrębnić z tej grupy pojedynczego markera, który pozwalałby odróżnić nowotworowe komórki macierzyste od nienowotworowych komórek HSC. Komórki LSC stanowią wyzwanie terapeutyczne, ponieważ użycie inhibitorów kinazy tyrozynowej nie prowadzi do ich całkowitej eradykacji⁹⁶; trwają badania nad połączeniem tych inhibitorów z inhibitorami skierowanymi na przykład przeciwko E-selektynie⁹⁷.

Rozdział 3. Leczenie nowotworów z uwzględnieniem przewlekłej białaczki szpikowej

Tak jak zostało to opisane w pierwszym rozdziale, chociaż nowotwory nie są homogeną grupą chorób, dzielą pewne wspólne cechy charakterystyczne. Ten rozdział będzie omówieniem istniejących już terapii nowotworowych (ze szczególnym uwzględnieniem chemioterapii), zjawiska oporności na leczenie oraz rozwoju nowych terapii nowotworowych, szczególnie dla chronicznej białaczki szpikowej.

Nowotwory były ludzkości znane od setek lat, chociaż do XX wieku choroba pozostawała niemożliwa do zatrzymania, nieuleczalna i śmiertelna. Wraz z rozwojem technik chirurgicznych stało się możliwe wycinanie nowotworów litych. Na przykład, terapia radykalna koncentrowała się na usunięciu jak największej ilości nowotworowej i potencjalnie nowotworowej tkanki. Tak stosowane leczenie w raku piersi pozwalało poprawić zaleczalność i wydłużyć długość życia po diagnozie, jednak pacjent pozostawał istotnie okaleczony. W 1896 r. nastąpiło jednak odkrycie, które rozbudziło nadzieje na leczenie nowotworów bez użycia skalpela. Niemiecki profesor fizyki Wilhelm Conrad Roentgen odkrył promieniowanie X. W zaledwie kilka dni po ogłoszeniu tego odkrycia firma E.H. Grubb po raz pierwszy użyła promieniowania X w terapii nowotworów⁹⁸, a sam Roentgen został nagrodzony nagrodą Nobla w dziedzinie fizyki już w 1901 r. Wspomniany już wcześniej w tekście Herman Muller w 1927 r. odkrył, że promieniowanie X zwiększa częstotliwość powstawania mutacji genetycznych oraz że efekt zależny był od dawki⁵. Zauważył również, że podczas mitozy komórka musi podzielić swoje DNA, jest zatem wrażliwa na uszkodzenia wywołane promieniowaniem X. Chociaż radioterapia oddziałuje na wszystkie komórki organizmu zdolne do podziału, po dziś dzień naświetlanie pozostaje jedną z najpowszechniejszych terapii pierwszej linii. Mimo niezaprzeczalnej skuteczności, terapia ta nie stała się jednak poszukiwanym panaceum. Komórki nowotworu mogą uodpornić się na terapię promieniowaniem jonizującym, głównie poprzez aktywację szlaków związanych z naprawą uszkodzeń DNA. W szczególności są to szlaki związane z czynnikami transkrypcyjnymi STAT3, NF-κB, NRF2 (ang. *NFE2 Like BZIP Transcription Factor 2*) oraz HIF-1α (ang. *Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha*)⁹⁹. Radioterapia była jednak zaledwie początkiem postępu w dziedzinie nieoperacyjnego leczenia

nowotworów. Kolejne odkrycia przyniosła pierwsza wojna światowa, a wraz z nią zastosowanie pierwszej śmiertelnej broni masowego rażenia – gazu musztardowego.

3.1. HISTORIA ROZWOJU CHEMIOTERAPII

3.1.1. Zastosowanie pierwszych leków cytostatycznych

W 1919 r. doktor Edward Krumbhaar badał krew osób narażonych na kontakt z zastosowanym na placu boju gazem musztardowym. Zaobserwował u nich poważną leukopenię, a także zubożenie szpiku kostnego i węzłów chłonnych¹⁰⁰. Paradoksalnie, niezaprzeczalnie okrutny akt użycia broni chemicznej przeciwko ludzkości przyczynił się do niezwykłego odkrycia. Ludzkość zyskała pierwszy lek przeciwnowotworowy. W niedługim czasie narodził się pomysł użycia gazu musztardowego, a dokładniej - iperytu w leczeniu nowotworów układu limfatycznego. Badacze Alfred Gilman i Louis Goodman wykonali eksperyment na modelu króliczym, który potwierdził, że pod wpływem gazu musztardowego spada ilość białych krwinek¹⁰¹. Zachęceni wynikami kontynuowali badania w mysim modelu po ksenotransplantacji ludzkich komórek chłoniaka. Leczenie przy użyciu gazu musztardowego powodowało zmniejszenie rozmiarów guza oraz wydłużenie życia¹⁰². Badacze oficjalnie zaproponowali leczenie przy użyciu iperytu azotowego chłoniaków opornych na dotychczasowe terapie. Doprowadziło to do pierwszej w historii próby klinicznej, w której zastosowano chemioterapię u pacjenta onkologicznego. W swoich notatkach doktor Goodman oznaczył pacjenta jako "JD". Przez wiele lat niewiele było wiadomo o tajemniczym pacjencie, dopiero w 2011 r. szczegóły jego historii zostały przedstawione przez Johna Fenna i Roberta Udelsmana podczas dwusetlecia istnienia uniwersytetu Yale¹⁰². JD urodził się w 1894 r. w Polsce i wyemigrował do Stanów Zjednoczonych. W 1940 r. zachorował na chłoniaka i przeszedł kilka cykli radioterapii promieniami X. Zmiany nowotworowe usuwane były także chirurgicznie. W 1942 r. przestał odpowiadać na standardowe leczenie. Wyczerpawszy opcje terapeutyczne, cierpiąc na problemy z oddychaniem, dysfagię oraz znaczną utratę masy, JD otrzymał eksperymentalny zastrzyk iperytu azotowego. Iperytyt został podany dożylnie dziesięciokrotnie w dawce 0,1 mg/kg masy ciała. Co ciekawe, w notatkach lekarza nie ma nazwy podawanej substancji. Odnosi się do niej jako do „limoficydalnej” albo „substancji X”, prawdopodobnie z powodu cenzury nałożonej przez Departament Wojny Stanów Zjednoczonych. Wyniki przeszły wszelkie oczekiwania, jako że biopsja wykazała całkowity brak tkanki nowotworu. Jednakże wraz z upływem czasu, pacjent zaczął cierpieć na intensywne krwotoki, czemu towarzyszył wyraźny

spadek poziomu leukocytów oraz płytek krwi. Do dnia 49 po zastrzyku, guzy zaczęły nawracać. Podjęto ponowne leczenie iperytem, przyniosło ono jednak zaledwie krótkotrwały skutek leczniczy. Pacjent oszedł 96-tego dnia po rozpoczęciu leczenia, jak donoszą źródła – „oszedł w spokoju”¹⁰².

Nie minęło jednak wiele czasu, a pojawiły się kolejne próby zastosowania farmakoterapii w leczeniu nowotworów. Krótco po zakończeniu drugiej wojny światowej Sidney Farber, który był w tamtym czasie patologiem dziecięcym na uniwersytecie medycznym Harvarda (Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) podjął pierwszą próbę leczenia nowotworu w oparciu o wiedzę o jego biologii. Farber wiedział, że kwas foliowy stymuluje proliferację komórek białaczki. We współpracy z Harriet Kiltie i Yellapragad'em Subbarow'em z Lederle Laboratories uzyskał zatem analogi folianów (głównie aminopteryny). Analogi folianów stanowiły antymetabolity, czyli związki wypierające naturalnie występujący metabolit, a w konsekwencji zaburzające szlak metaboliczny. W tym przypadku, antagonistą kwasu foliowego blokuje miejsce aktywne w reduktazie dihydrofolianowej – kluczowym enzymie w szlaku syntezy zasad azotowych (tymidyny oraz puryn). W 1948 Farber podał analogi folianów dzieciom dotkniętym ostrą białaczką limfoblastyczną, na którą w owym czasie nie istniało leczenie. Leki zadziałały antyproliferacyjnie na komórki nowotworu, a u pacjentów uzyskano przejściową remisję choroby¹⁰³. Aminopterynę z czasem zastąpiono metoteksatem, który po dziś dzień stosowany jest w leczeniu różnych typów nowotworów oraz również w chorobach zapalnych^{104,105}.

Obecnie łączy się różne metody leczenia nowotworów, a chemioterapia nie musi mieć na celu całkowitego wyleczenia nowotworu. Może być na przykład zastosowana jako terapia paliatywna, aby ulżyć symptomom choroby. Również jako terapia neoadjuwantowa, zmniejszająca guz przed chirurgicznym usunięciem albo terapia adjuwantowa, mająca na celu usunięcie komórek nowotworu pozostałych po operacji. Co więcej, w dzisiejszych terapiach zamiast pojedynczego specyfiku używa się często kombinacji różnych leków (o udowodnionej skuteczności w monoterapii w danym typie nowotworu) w wystandaryzowanych reżimach chemioterapeutycznych. Jako że różne związki o aktywności przeciwnowotworowej mają wpływ na różne aspekty proliferacji nowotworów, to podejście sprawia, że terapia jest bardziej efektywna i utrudnia wystąpienie oporności.

3.1.2. Mechanizmy działania leków cytostatycznych stosowanych w chemioterapii

Podstawowy, uproszczony mechanizm działania leku przeciwnowotworowego to indukcja stresu w komórce nowotworu, co prowadzi do zatrzymania maszynerii proliferacyjnej i skutkuje śmiercią komórki nowotworowej. Mechanizm molekularny działania cytostatyków obejmuje przede wszystkim hamowanie replikacji DNA oraz formacji struktur niezbędnych do przeprowadzenia mitozy (na przykład blokada wrzeciona podziałowego czy zaburzenie polimeryzacji mikrotubul)¹⁰⁶. Jednak komórki, które aktywnie nie proliferują w momencie zastosowania terapii często nie odpowiadają na leczenie¹⁰⁷. Poszczególne leki cytostatyczne i ich podstawowy mechanizm działania przedstawione są w tabeli 3.

Lek cytostatyczny	Główny mechanizm działania
Taksany Paklitaksel, docetaksel, kabazytaksel	Taksany wiążą się do mikrotubul, utrudniają ich poruszanie się i spełnianie swojej funkcji w mitozie
Alkaloidy <i>Vinca</i> Winblastyna, winkrystyna, winorelbina	Alkaloidy <i>Vinca</i> powodują depolimeryzację mikrotubul, niszczenie wrzeciona podziałowego (wyższe stężenia), blokowanie mitozy (niższe stężenia)
Analogi kamptotecyny Irynotekan, topotekan	Hamowanie replikacji poprzez oddziaływanie z topoizomerazą I lub II. Powoduje to stres widetek replikacyjnych, napotykalających kompleks leku i enzymu, prowadząc do powstawania dwuniciowych pęknięć.
Antracykliny Doksorubicyna, daunorubicyna, epirubicyna, idarubicyna, mitoksantron	
Daktynomycyna (Aktynomycyna D) Etopozyd Tenipozyd	
Cyklofosfamid Mitomycyna Dakarbazyna (i pochodne) Streptozotocyna	Alkilacja DNA, produkowanie adduktów łączących się kowalencyjnie, indukujących jedno- i dwuniciowe pęknięcia w DNA
Antracykliny	Interkalacja do DNA
Chemioterapie na bazie platyny Cisplatyna, karboplatyna i oksaliplatyna	Indukcja powstawania wiązań krzyżowych między nićmi DNA, a także pomiędzy cząsteczkami DNA. Zaburzenie struktury podwójnej helisy prowadzi do powstawania pęknięć i zakłócenia procesu replikacji
5-fluorouracyl (5-FU), Cytarbina Gemcytabina 6-tiopuryny (6-merkaptopuryna i 6-tioguanina) Klofarbina	Wstawianie w strukturę DNA nieprawidłowych nukleotydów, co hamuje syntezę DNA i powoduje jej przedwczesną terminację. Gemcytabina, cytarbina oraz fludarbina hamują też polimerazę DNA i reduktazę rybonukleotydów zatrzymując replikację, wydłużenie łańcucha i naprawę DNA.

Tabela 3. Mechanizmy działania leków cytostatycznych.

W Tabeli przedstawiono podstawowe mechanizmy działania poszczególnych cytostatyków hamujących mitozę komórek nowotworowych. Opracowano na podstawie Tilsed, CM et al., *Frontiers in Oncology* 2022¹⁰⁶

3.2. TERAPIE CELOWANE W LECZENIU NOWOTWORÓW – „ZŁOTA KULA”

Po zastosowaniu pierwszych substancji przeciwnowotworowych, pojawiały się następne, a wraz z nimi chemioterapia stała się złotym standardem leczenia nowotworów. Powiększała się również wiedza na temat nowotworów i biologii komórki nowotworowej. Chociaż efekty terapeutyczne, uzyskane przy użyciu stosowanych do końca XX wieku terapeutyków były ogromnym osiągnięciem i krokiem na drodze do skutecznego leczenia nowotworów, istniała wciąż niezaspokojona potrzeba stworzenia substancji wymierzonej precyzyjnie w komórkę dotkniętą chorobą. Stało się to w 2001 roku, kiedy dopuszczono do użytku imatinib – pierwszy inhibitor kinazy tyrozynowej.

Naukowcy pracujący w Ciba-Geigy (obecnie Novartis) badając serię inhibitorów kinazy tyrozynowej znaleźli związki o aktywności skierowanej specyficznie przeciwko domenie kinazy w białku ABL1. Dalsze badania rozwinęły związek STI-571, znany dzisiaj jako imatinib albo Gleevec⁴⁷. Imatinib działa specyficznie na kinazę ABL1 na zasadzie inhibicji kompetycyjnej z cząsteczką ATP. W zależności od stężenia związku, hamuje on specyficznie kinazę ABL1, ale może też hamować aktywność C-kit (znany również jako *Mast/Stem Cell Growth Factor Receptor Kit*, SCFR; jest to białko kodujące receptorową kinazę tyrozynową) i PDGFR (ang. *Platelet-derived growth factor receptor*, receptor dla czynnika wzrostu płytek krwi)¹⁰⁸. Odkrycie imatinibu nie doprowadziło do błyskawicznego wprowadzenia preparatu na rynek. Początkowo otrzymał on niski status pilności ze względu na niską częstość występowania przewlekłej białaczki szpikowej. Do prób klinicznych został dopuszczony dopiero po pięciu latach¹⁰⁹, jednak jego skuteczność spowodowała, że FDA po raz pierwszy w historii dopuściła lek do użytku w sposób przyspieszony. W trzeciej fazie badań klinicznych (próba kliniczna IRIS), imatinib jako monoterapia spowodował wystąpienie całkowitej odpowiedzi cytogennej (ang. *Complete cytogenic response*, CCR) u 73,8% pacjentów, podczas gdy stosowany do tej pory interferon α w połączeniu z cytarbiną wywołał taką odpowiedź zaledwie u 8,5% pacjentów¹¹⁰. Imatinib sprawił, że przewlekła białaczka szpikowa ze śmiertelnej choroby stała się chorobą, z którą można żyć. Co więcej, zachęcające wyniki dla przewlekłej białaczki szpikowej skłaniały do badań nad użyciem imatinibu w innych nowotworach, w tym nowotworach niehematologicznych, litych, na przykład nowotworze podścieliskowym przewodu pokarmowego (ang. *Gastrointestinal stromal tumor*, *GIST*)¹⁰⁸.

Celowane terapie przeciwnowotworowe są dzisiaj jednym z podstawowych filarów medycyny precyzyjnej, która przekłada wiedzę zdobytą badaniami wielkoskalowymi na użycie specyficznych inhibitorów, co pozwala minimalizować efekty uboczne terapii. Takie leczenie jednak często nie prowadzi do uzdrowienia, a jedynie do wyciszenia symptomów choroby. Przeprowadzono wiele prób klinicznych, w których pod kontrolą lekarza, pacjenci przerywali leczenie imatinibem.

Jedną z takich prób była Francuska STIM1 (Stop imatinib). Wzięło w niej udział 100 pacjentów, u których nie wykryto choroby resztkowej (UMRD, ang. *Undetectable Minimal Residual Disease*) przez ostatnie dwa lata. Niestety, po 2,5 miesiąca (mediana) 61 pacjentów ze 100 utraciło UMRD. U 43% odnotowano brak nawrotów po 6-ciu miesiącach. U 57 z 61 pacjentów ponowiono leczenie, a 55-ciu z nich odzyskało UMRD w ciągu czterech miesięcy (mediana)¹¹¹. W próbie klinicznej TWISTER wzięło udział 40-stu pacjentów bez wykrywalnej choroby resztkowej, a po 24 miesiącach od zaprzestania przyjmowania imatinibu stabilna remisja bez leczenia (TFR, ang. *Treatment-free remission*) została odnotowana u 47,1%¹¹².

W innej próbie klinicznej EURO-SKI przeanalizowano dane pochodzące od 755 pacjentów, mediana czasu obserwacji wyniosła 27 miesięcy. Odnotowano, że 49% pacjentów po zaprzestaniu leczenia utraciło większą odpowiedź molekularną (MMR, ang. *Major Molecular Response*)¹¹³.

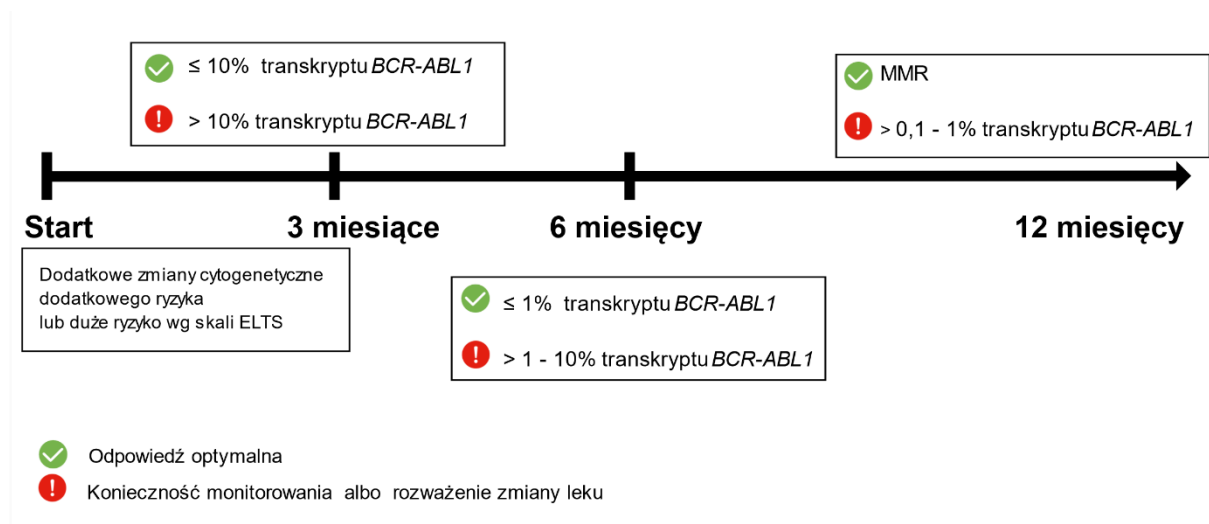
Podsumowując, prawie co drugi pacjent dotknięty przewlekłą białaczką szpikową nie może zaprzestać leczenia imatinibem. Podobnie zresztą w przypadku innych generacji inhibitorów kinaz tyrozynowych w przewlekłej białaczce szpikowej. Próba kliniczna DASFREE, w której wzięły udział 84 osoby pokazała, że remisja bez leczenia (TFR) była stabilna u zaledwie 46% pacjentów¹¹⁴. Dość dobre wyniki przyniosła próba kliniczna LAST, w której wzięło udział 172 pacjentów, wśród których uwzględnieni byli pacjenci przyjmujący nie tylko imatinib (60% biorących udział), ale również inne inhibitory kinaz tyrozynowych – nilotinib (23%), dasatinib (15%) i bosutinib (2%). Wyniki z tej próby pokazały, że 107 pacjentów pozostało w remisji TFR¹¹⁵.

3.3. AKTUALNE LECZENIE PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ

Aktualnie pierwszą linię leczenia przewlekłej białaczki szpikowej stanowią inhibitory kinazy tyrozynowej (TKI) – pierwszej generacji imatinib (refundowany), a także drugiej generacji: dazatynib, nilotinib oraz bosutinib. Często, jeżeli pacjent zalicza się do grupy pośredniego

albo wysokiego ryzyka (omówione w punkcie 2.3 rokowanie w przewlekłej białaczce szpikowej), wówczas leczenie zaczyna się od leków drugiej generacji. Podobnie w sytuacji, w której istnieje oporność lub nietolerancja na leczenie imatinibem. Jeżeli leczenie nie będzie przebiegać zgodnie z „kamieniami milowymi” (rycina 5), wówczas należy zbadać gen *BCR-ABL1* pod kątem mutacji (jeżeli jest mutacja T315I, wówczas włącza się leczenie lekiem trzeciej generacji - ponatynibem). Jeśli po 36-48 miesiącach nie uzyska się większej odpowiedzi molekularnej (ang. *Major molecular response*, MMR), należy zmienić inhibitor kinazy tyrozynowej.

Do czasu remisji, zaleca się, aby chory co dwa tygodnie badał krew (morfologia). Ponadto, należy zrobić badanie cytogenetyczne, które często zaleca się powtórzyć 3, 6 i 12 miesięcy po rozpoczęciu leczenia; badanie poziomu transkryptu *BCR-ABL1* przy pomocy *RealTime qPCR* (ang. *Quantitative polymerase chain reaction*) co trzy miesiące lub częściej; badanie mutacji w genie *BCR-ABL1*.



Rycina 5. „Kamienie milowe” odpowiedzi na terapię inhibitorami kinazy tyrozynowej.

Poziom transkryptu *BCR-ABL1* jest przeliczony na % wartości transkryptu referencyjnego, np. genu *ABL1* albo *GUSB* i przekonwertowany na wystandaryzowaną skalę międzynarodową (ang. International Scale, IS). Strzałka przedstawia schematycznie czas upływający od rozpoczęcia terapii imatinibem. Zalecenia dla poszczególnych miesięcy pozwalają monitorować odpowiedź nowotworu na zastosowane leczenie (uzyskanie długotrwałej większej odpowiedzi molekularnej MMR) i podjąć odpowiednie kroki w przypadku braku reakcji albo zaledwie częściowej reakcji na terapię. Schemat stworzono na podstawie zaleceń European LeukemiaNet 2020 (ELN) ^{46,116}

Jeżeli chory w fazie chronicznej przewlekłej białaczki szpikowej reaguje odpowiednio na pierwszą linię leczenia, to znaczy uzyskano u niego głęboką i długotrwałą większą odpowiedź molekularną (MMR), można wówczas rozważyć odstępianie od dalszej terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej. W 90-95% nawrotów można skutecznie zastosować ponownie inhibitory kinazy tyrozynowej.

3.4. STRATEGIE LECZENIA CML W PRZYPADKU NIEPOWODZENIA CHEMIOTERAPII INHIBITORAMI KINAZY BCR-ABL

Jeżeli leczenie przy pomocy inhibitorów kinazy tyrozynowej nie powiedzie się, wówczas należy rozważyć przeszczep allogeniczny komórek krwiotwórczych (allo-HCT). Inne dostępne metody leczenia to interferon α (IFN α) oraz hydroksymocznik. IFN α pobudza limfocyty T cytotoksyczne do atakowania komórek białaczki¹¹⁷. W obecnie stosowanej formie IFN α występuje w postaci PEGyłowanej (tzn. z dodatkiem glikolu polietylowego, polimeru przedłużającego uwalnianie) i jest stosowany jako monoterapia u kobiet w ciąży, ponieważ ciąża stanowi przeciwwskazanie do stosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej^{118,119}, a także u pacjentów będących kandydatami do przeszczepu. Jest również stosowany w skojarzeniu z cytarbiną (najczęściej) u chorych, którzy nie są kandydatami do przeszczepu szpiku po niepowodzeniu leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej.

Hydroksymocznik natomiast jest lekiem organicznym podawanym chorym tymczasowo na początkowych etapach choroby przed uzyskaniem diagnozy albo jako chemioterapia paliatywna. Ma działać cytoredukcyjnie, tak żeby choroba została wstępnie opanowana i poprawiła się jakość zastosowanego w przyszłości leczenia.

Rozdział 4. Lekooporność

Pomimo ogromnych sukcesów i postępu w leczeniu różnych rodzajów nowotworów, nieodłącznym wyzwaniem pozostaje aspekt czasowy skuteczności terapii. Komórki nowotworowe uodparniają się na leczenie. Chodzi zarówno o odporność nabytą, jak i wrodzoną, objawiającą się brakiem odpowiedzi na zastosowaną terapię. W niniejszym rozdziale omówione zostaną mechanizmy związane z różnymi rodzajami oporności wraz z przykładami. Przykłady te pochodzą z badań, w których autorka dysertacji uczestniczyła podczas staży zagranicznych. Nie stanowią one przedmiotu dysertacji, jednak dotyczą badań, które stworzyły podstawy do eksperymentów przedstawionych w niniejszej pracy.

4.1. OPORNOŚĆ WRODZONA

Oporność wrodzoną, zwana również wewnętrzną (ang. *intrinsic*) to niewrażliwość na leki, spowodowana czynnikami istniejącymi przed podjęciem danej terapii¹²⁰.

Mechanizmy oporności wrodzonej obejmują:

- zmiany w biologii komórek nowotworowych nabyte w toku rozwoju nowotworu – mutacje w genach związanych z odpowiedzią na dane leczenie
- aktywację szlaków obronnych związanych z usuwaniem toksyn obecnych w środowisku (na przykład aktywacja poprzednim lekiem cytostatycznym)
- heterogeniczność i istnienie subpopulacji komórek odpornych na dane leczenie, w tym komórek macierzystych nowotworów

Jednym z przykładów oporności wrodzonej jest nieskuteczność specyficznych inhibitorów cyklinozależnych kinaz CDK4/6 w leczeniu potrójnie negatywnego raka piersi (TNBC, ang. *Triple Negative Breast Cancer*). Cechą charakterystyczną potrójnie negatywnego raka piersi jest brak na ich powierzchni receptorów dla estrogenu (ER), progesteronu (PR), a także niski poziom białka HER2/*neu*. Jest to szczególnie agresywny, heterogenny, szybko rosnący nowotwór piersi, który bardzo często ulega przerzutom szybciej niż jest wykrywany. Nie ma też dobrych metod leczenia¹²¹. Jednym ze stosowanych z powodzeniem leków w terapii nowotworów piersi pozytywnych pod względem receptorów dla hormonów są specyficzne

inhibitory cyklinozależnych kinaz 4 i 6 (CDK4/6). Jednak komórki TNBC są odporne na leczenie tymi inhibitorami, a mechanizm tej oporności przez długi czas nie był znany. W 2020 roku w czasopiśmie *Science Advances* ukazały się wyniki badań zespołu profesora Petera Sicińskiego na uniwersytecie Harvarda w Stanach Zjednoczonych, w których autorka uczestniczyła w ramach stażu zagranicznego. W publikacji pokazano, że oporność komórek TNBC na leczenie inhibitorami CDK4/6 jest spowodowana zwiększoną aktywnością lizosomów. Leki, zamiast działać na cykl komórkowy, sekwestrowane są w lizosomach, a następnie degradowane zanim zdążą wywrzeć efekt na komórkach nowotworu¹²².

4.2. OPORNOŚĆ NABYTA

Oporność nabyta jest to taka oporność, którą komórki nowotworu nabywają w czasie leczenia przy użyciu danego leku. Istnieją różne rodzaje oporności, zależne w dużej mierze od mechanizmu działania leku. Rozróżniane są mechanizmy specyficzne, na przykład związane z mutacją w obrębie rejonu rozpoznawanego przez specyficzny inhibitor, jak w przypadku przewlekłej białaczki szpikowej (zagadnienie szerzej omówiono w punkcie 4.3). Oporność komórek nowotworowych na leki często opisywana jest w kontekście konkretnych mutacji czy amplifikacji. Coraz bardziej na znaczeniu zyskują również badania epigenetyczne, w tym badania analizujące poziom i rolę poszczególnych mikroRNA. Na przykład, u pacjentów cierpiących na niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC), choroba wywołana jest często obecnością genu fuzyjnego *EML4-ALK*. Translokacja ta dotyczy około 4-5% wszystkich przypadków NSCLC i powoduje konstytutywną aktywację kinazy tyrozynowej ALK (ang. *Anaplastic lymphoma kinase*). W leczeniu tych nowotworów powszechnie stosuje się specyficzny inhibitor kinazy tyrozynowej – Crizotinib, a także leki kolejnych generacji^{123,124}. Niemal u jednej trzeciej leczonych Crizotinibem pacjentów pojawiają się mutacje w domenie kinazy tyrozynowej¹²⁴. Jednakże, zmiany w rejonie funkcyjnym kinazy nie są obecne u wszystkich pacjentów opornych na leczenie tym inhibitorem¹²⁵. Jakie są zatem inne mechanizmy oporności na stosowany lek? W badaniach prowadzonych na uniwersytecie Karolińskim (Karolinska Institutet, Solna, Szwecja) Lai Y, (...), Stukan I et al. pokazali, że taki efekt może mieć mikroRNA-100-5p. Użycie specyficznego inhibitora, hamującego aktywność tego mikroRNA, uwrażliwiało odporne linie na inhibitory kinazy tyrozynowej ALK. Jako że poszczególne mikroRNA oddziałują na wiele genów, analiza komputerowa wykazała, że w tym przypadku są to głównie genu szlaku sygnałowego mTOR¹²⁴. Podsumowując, w indukcję

fenotypu oporności na leczenie, poza mutacjami, często zaangażowanych jest wiele innych mechanizmów, w tym mechanizmów epigenetycznych.

Mikrośrodowisko otaczające nowotwór również ma wpływ na indukcję oporności. Jednym z mechanizmów jest uwalnianie egzosomów przez komórki stromy, których *cargo* może dotrzeć zarówno do komórek nowotworu, jak i do towarzyszących nowotworowi elementów układu odpornościowego, np. makrofagów (TAMs, ang. *Tumor-associated macrophages*). Przyczynia się to do przetrwania nowotworu¹²⁰.

4.3. OPORNOŚĆ NA IMATINIB ZALEŻNA OD BCR-ABL1 – MUTACJE W DOMENIE KINAZY TYROZYNOWEJ

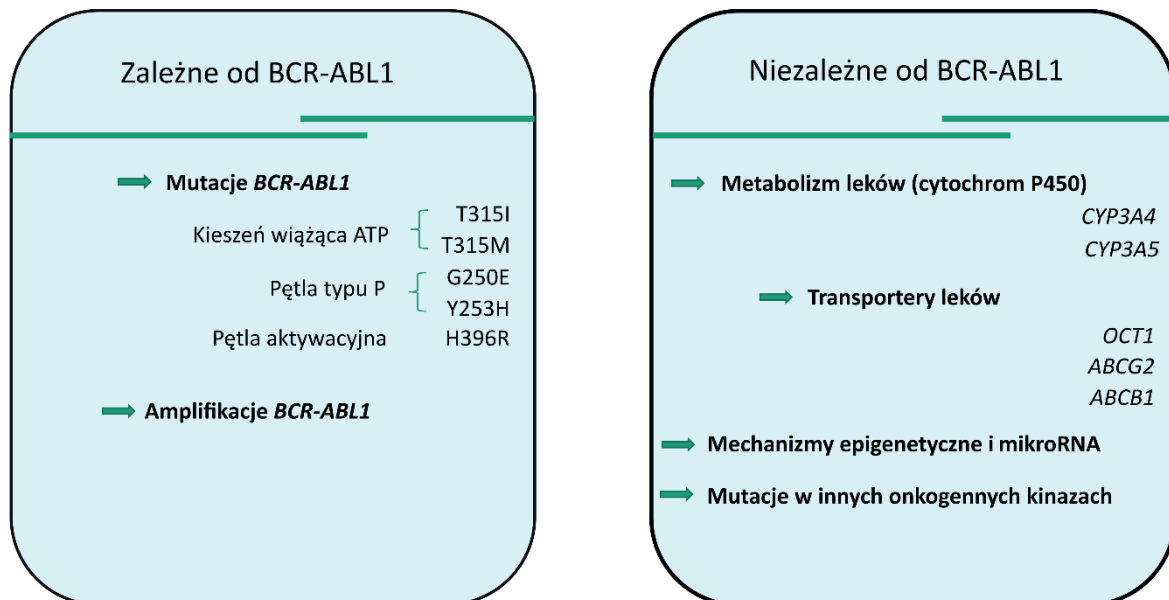
Jeszcze podczas pierwszej dużej próby klinicznej IRIS, która udowodniła skuteczność monoterapii imatinibem w leczeniu białaczki, około 17% pacjentów rozwinęło oporność na imatinib w pięcioletniej obserwacji (ang. *5-year follow-up*). Większość pacjentów w zaawansowanych stadiach białaczki bardzo szybko uodparniało się na działanie inhibitora. Na tym etapie zaobserwowano u części pacjentów fosforylację białka adaptorowego CRKL, świadczącego o ponownej aktywacji kinazy BCR-ABL1¹²⁶. Kolejne badania zidentyfikowały grupę mechanizmów oporności na leczenie imatinibem zależnych od BCR-ABL1 oraz niezależnych od BCR-ABL1^{127,128} (rycina 6).

Zazwyczaj u pacjentów, którzy wykazują pierwotną oporność na leczenie imatinibem dominują mechanizmy niezwiązane z BCR-ABL1, a u pacjentów uodparniających się w trakcie leczenia – mechanizmy związane z BCR-ABL1⁴⁷. Po pierwotnej odpowiedzi na leczenie, 20-25% pacjentów CML rozwija oporność na leczenie poprzez mechanizmy zarówno zależne, jak i niezależne od kinazy BCR-ABL1^{127,128}. Nie ma też jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jak powstaje oporność nabyta u pacjentów odpowiadających na imatinib. Z jednej strony może być ona spowodowana mutacjami powstałymi po rozpoczęciu leczenia. Z drugiej strony istnieje możliwość, że klony te już istniały zanim podano inhibitor kinazy tyrozynowej. Przemawiają za tym dowody eksperymentalne, na przykład fakt, że klony posiadające mutację T315I w części wiążącej ATP kinazy BCR-ABL1 rosną wolniej niż komórki posiadające tę domenę w formie niezmienionej. Możliwe zatem, że klony te nie ujawniają swojej obecności przed leczeniem przy pomocy TKI¹²⁹.

Około 50% oporności na inhibitory kinazy tyrozynowej jest spowodowanych amplifikacją albo zmianami sekwencji *BCR-ABL1*^{126,128}. Ponieważ imatinib wiąże się sześcioma wiązaniami wodorowymi z częścią kinazy wiążącą ATP oraz wymaga zmiany konformacji domeny

aktywacyjnej i pętli typu P (P-loop) w konformację aktywną, mutacje zmieniające pojedyncze aminokwasy w odpowiednich miejscach mają prawdopodobnie wpływ na wiązanie leku¹³⁰. Alternatywnie, lek wiąże się z kinazą pomimo mutacji, a za odporność odpowiedzialna jest zwiększona dysocjacja kinazy od imatinibu. Biorąc pod uwagę jak istotna jest długość oddziaływania inhibitora i jego kinazy, mutacje naruszające kinetykę wiązania mają wpływ na efektywność leku¹³¹. Najczęściej występuje mutacja T315I, która znosi możliwość utworzenia pojedynczego wiązania wodorowego w kieszeni wiążącej ATP i powoduje oporność na inhibitory kinazy tyrozynowej zarówno pierwszej, jak i drugiej generacji.

Mechanizmy oporności na TKI



Rycina 6. Mechanizmy oporności na inhibitory kinazy tyrozynowej (TKI).

Po lewej: mechanizmy oporności zależne od BCR-ABL1, w tym mutacje w BCR-ABL1 opisane jako substytucje konkretnych aminokwasów w kieszeni wiążącej ATP, pętli typu P albo pętli aktywacyjnej struktury przestrzennej kinazy BCR-ABL1. Po prawej: mechanizmy oporności niezależne od BCR-ABL1, w tym wybrane zmienione geny metabolizmu leków oraz białek transportujących leki.

W przypadku wystąpienia mutacji T315I zaleca się przejście na terapię ponatynibem, TKI trzeciej generacji. Jest to lek posiadający więcej efektów ubocznych niż inhibitory kinazy tyrozynowej poprzednich generacji¹³². Początkowo został wycofany z rynku z powodu wysokiej toksyczności, żeby w końcu znów być dopuszczonym, jednak w zredukowanej dawce^{133,134}. Przyjmowanie ponatynibu wiąże się ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym, a pacjenci powinni być regularnie kontrolowani pod kątem wystąpienia nadciśnienia, hiperlipidemii oraz cukrzycy¹¹⁶.

4.4. OPORNOŚĆ NIEZALEŻNA OD BCR-ABL1

Najlepiej zbadane mechanizmy oporności na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej niezależne od BCR-ABL1 dotyczą głównie białek transportujących cząsteczki z albo do wnętrza komórki, ale również obejmują aktywację innych szlaków onkogennych, zmiany epigenetyczne, wzrost aktywności enzymów odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków oraz ochronny wpływ mikrośrodowiska.

4.4.1. Białka transportowe – MDR1 i oporność wielolekowa

Już w 1976 r. Juliano i Ling donosili o istnieniu specyficznego białka błonowego o wielkości 170 kDa w chemicznych komórkach jajnika (CHO) uodpornianych na leczenie kolchicyną. Nazwali je P-glikoproteiną. Literka „p” w nazwie oznacza przepuszczalność, permeability, ponieważ badacze przewidywali że rolą P-glikoproteiny (**Pgp, MDR1**) jest umożliwianie miejscowej przepuszczalności błony komórkowej¹³⁵. Termin Pgp oraz MDR1 są używane w niniejszej pracy zamiennie. Dziś wiemy, że pompa P-gp, produkt genu **ABCB1**, należy do rodziny białek znanych jako ATP-binding cassette proteins (transportery ABC, MDR-ABC), które są obecne w błonie komórkowej i wpływają na dystrybucję, absorpcję i sekrecję szerokiej gamy związków chemicznych, niekoniecznie powiązanych ze sobą strukturalnie bądź funkcjonalnie^{136–138}. Kieszeń wiążąca ATP umożliwia pozyskanie energii na drodze hydrolizy. Energia zużywana jest między innymi do przemieszczania substratu przez błonę (głównie eksportu), ale niektóre z białek tej rodziny biorą udział w translacji RNA i DNA. W ludzkim genomie znajduje się 49 genów ABC. Poza wpływem na stężenie związku przeciwnowotworowego, eksportery ABC oddziałują również z lekami limitując ich biodostępność i transport przez bariery biologiczne, takie jak bariera krew-mózg¹³⁹. Ekspresję białek MDR-ABC, najczęściej **ABCB1** oraz **ABCG2** (ang. *Breast cancer resistance protein*, BCRP), uznaje się za główne źródło różnic indywidualnych między ludźmi w zakresie biodostępności leków, a podwyższone poziomy białek odpowiadających za wypływ związków z komórki są jednym z kluczowych mechanizmów oporności nowotworów na terapię¹⁴⁰. Szacuje się, że oporność na leczenie odpowiada aż za 90% śmierci wywołanych nowotworem¹³⁹. Nadekspresja białka MDR1 jest częstym mechanizmem oporności na chemioterapię. Glikoproteina P (MDR1) w swojej strukturze posiada wiele miejsc wiążących leki, co prowadzi do powstania nie tylko oporności na dany związek, ale też oporności krzyżowej na inne związki o aktywności

przeciwnowotworowej, m.in. cytostatyki takie jak etopozyd, dokсорubicyna, winblastyna oraz winkrystyna.

Inhibitory kinazy tyrozynowej (w tym nowy lek przeciwko CML - asciminib¹⁴⁰) również są substratami dla MDR1. U pacjentów przyjmujących w sposób przewlekły imatinib, poziom transkryptu *ABCB1* jest podwyższony i spada gwałtownie po zaprzestaniu leczenia¹⁴¹. Istnieją jednak ograniczone dowody na to, że przy wyższych stężeniach TKI mogą hamować aktywność pompy, chociaż na ten moment ten efekt zaobserwowano tylko *in vitro*¹⁴².

Polimorfizmy genu *MDR1* (znanego również jako *ABCB1*) mogą mieć znaczenie kliniczne dla przewlekłej białaczki szpikowej. W ostatnim czasie pokazano, że obecność polimorfizmów MDR1-C1236T lub MDR1-C3435T zwiększa prawdopodobieństwo niepowodzenia terapii imatinibem¹⁴³. Chociaż wciąż brakuje jednoznacznych dowodów, aby użyć konkretnych wariantów *ABCB1* jako biomarkera postępu leczenia¹⁴⁴.

Kolejnym transporterem opisywanym często w literaturze w kontekście oporności komórek CML na leczenie jest transporter imatinibu *OCT1* (ang. *Organic cation transporter 1*). Rola *OCT1* w rozwoju oporności na TKI jest niejednoznaczna i waha się od predyktora długoterminowej odpowiedzi na imatinib¹⁴⁵, po zupełny brak związku z opornością na działanie leku¹⁴⁶. U pacjentów przewlekłe przyjmujących imatinib (dane z próby klinicznej Euro-Ski), poziom transkryptu *OCT1* był obniżony^{128,141}. Prawdopodobnie supresja *OCT1* daje komórkom przewagę selekcyjną¹⁴¹.

4.4.2. Inne BCR-ABL1-niezależne mechanizmy oporności

Wśród wielu różnych mechanizmów przekładających się na fenotyp oporny na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej w literaturze spotyka się następujące:

- Aktywacja innych onkogennych szlaków pomimo zahamowania BCR-ABL1, na przykład szlaku MAPK, PI3K, SRC i JAK/STAT^{47,128}. Chociaż zwykle szlaki te są uzależnione od aktywacji onkogenu, mogą stać się autonomiczne, na przykład pod wpływem sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska⁴⁷.
- Zmiany epigentyczne. Mutacje w regulatorach epigenetycznych, na przykład w DNMT3A (metylotransferaza DNA 3α), które wpływają na pogorszenie rokowania i są często związane z progresją do kryzy blastycznej¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. W literaturze opisywane są również różnice w globalnym wzorze ekspresji mikroRNA u pacjentów opornych i wrażliwych na działanie inhibitorów, a także pacjentów odpowiadających i nie

odpowiadających na terapię¹⁵⁰. Jednak identyfikacja pojedynczych genów, aby użyć ich jako markerów predykcyjnych postępu leczenia nie jest możliwa bez dalszych badań¹⁵¹.

- Ochronne mikrośrodowisko szpiku kostnego. Na przykład cytokiny uwalniane przez stromę mogą promować fosforylację STAT3, aktywując komórki pierwotne CML w sposób niezależny od BCR-ABL1, uodparniając je na działanie inhibitorów⁴⁷.
- Zmiany w enzymach odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków. TKI są substratami dla cytochromu P450 (ang. *CYP*, białko *CYP*), a w szczególności dla białek CYP3A4 i CYP3A5¹⁵² (ang. *Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4* oraz *Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5*). Podobnie jak w przypadku MDR1, inhibitory kinazy tyrozynowej mogą być zarówno substratem, jak i inhibitorem enzymu CYP3A4¹⁵³, który metabolizuje je do formy o niższej cytotoksyczności, jednak wciąż zdolnej do zahamowania kinazy. Aktywność CYP3A4 i CYP3A5 u pacjentów o kompletnej molekularnej remisji jest często wysoka, zatem nie jest do końca jasne, czy uzyskane przez cytochrom metabolity nie mają pozytywnego wpływu na powodzenie leczenia¹⁵⁴.

Rozdział 5. Poszukiwania nowych leków

5.1. UZASADNIENIE BADAŃ NAD NOWYMI LEKAMI

Mimo ogromnego postępu w leczeniu nowotworów, istnieje wciąż niezaspokojona potrzeba badania nowych substancji o potencjale przeciwnowotworowym. Można wskazać na następujące powody tego zapotrzebowania, związane głównie z nabywaniem oporności na leki przeciwnowotworowe:

1. Systemy naprawy DNA w komórkach nowotworowych są zwykle unieczynnione, przez co komórka nabywa kolejne mutacje w krótszym czasie. W odpowiedzi na stres często dochodzi do uodpornienia na stosowaną terapię, na przykład poprzez odblokowanie ekspresji genów *ABC-MDR* i nabycie fenotypu oporności wielolekowej. Oporność ta poważnie limituje dostępne metody leczenia i powoduje zapotrzebowanie na nowe związki przeciwnowotworowe.
2. Chemioterapia celowana może prowadzić do uzależnienia pacjenta od ciągłego przyjmowania leku, na przykład chory dotknięty przewlekłą białaczką szpikową nie może zaprzestać leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej. Nowotwory są zaleczalne, ale nie uleczalne.
3. Istnieją komórki macierzyste nowotworu (ang. *Cancer stem cells*, CSCs), których proliferacja pozostaje wyciszona (*quiescent*), co sprawia, że nie odpowiadają na leczenie w takim samym stopniu jak komórki rozwiniętego nowotworu¹⁰⁷. Komórki te są jednak szczególnie niebezpieczne, ponieważ posiadają fenotyp macierzystopodobny. Sprawia to, że podobnie jak nienowotworowe komórki macierzyste, CSCs są zdolne do odnowy swojej populacji, a także do różnicowania i odbudowania różnych subpopulacji komórek nowotworu¹⁵⁵.
4. Istnieje różnica w pierwotnej odpowiedzi klinicznej na leczenie między pacjentami cierpiącymi na ten sam nowotwór. Na przykład, pacjenci cierpiący na raka przełyku są traktowani kombinacją karboplatyny/paklitakselu oraz radioterapii. U 30% pacjentów przynosi to kompletną regresję, a jednak zupełnie odwrotnie dzieje się u 20% pacjentów, u których nie obserwujemy żadnej klinicznie istotnej odpowiedzi na leczenie¹⁵⁶. Rodzi to potrzebę alternatywnych terapii, żeby umożliwić leczenie również pacjentom nieodpowiadającym na aktualnie dostępne leki.

5. Nowotwory złośliwe wciąż wykrywa się w stadium zaawansowanym pomimo relatywnie zaawansowanego stanu wiedzy na temat profilaktyki nowotworowej, świadomości odnośnie istnienia kancerogenów albo możliwości badania wariantów konkretnych genów o ustalonym prawdopodobieństwie rozwinięcia choroby nowotworowej. W stadium zaawansowanym komórki nowotworu są często niestabilne genomowo i szybko uodparniają się na leczenie, tak jak komórki kryzy blastycznej w przewlekłej białaczkę szpikowej^{46,47}.

Potrzeba zatem nowych sposobów leczenia, a także nowych leków przeciwnowotworowych, które poprawiłyby jakość leczenia pacjentów, a także zwiększyły ilość dostępnych opcji terapeutycznych.

5.2. TRUDNOŚCI W BADANIU NOWYCH ZWIĄZKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Istnieje uzasadniona potrzeba wprowadzania nowych substancji o aktywności przeciwnowotworowej, w związku z czym co roku pojawia się wiele publikacji raportujących otrzymanie takich związków.

Pierwszym etapem badania potencjału przeciwnowotworowego nowych związków są badania przesiewowe przeżywalności komórek prowadzone przy użyciu mikropłytkowych testów kolorymetrycznych. Pozwalają one zmierzyć żywotność komórek danego nowotworu pod wpływem badanej substancji. Miarą określającą przeżywalność jest parametr IC_{50} (stężenie hamujące, ang. *Inhibitory concentration*) czyli stężenie, przy którym w danym czasie uzyskano zahamowanie badanego procesu biologicznego (spadek żywotności komórek) o 50% w stosunku do kontroli. Zastosowanie parametru IC_{50} pozwala oszacować potencjalny efekt cytotoksyczny związku w danym nowotworze. Również, jeśli zastosujemy badaną substancję na linii nienowotworowej (na przykład na komórkach HUVEC – ludzkiej linii endotelium żyły pępkowej) poprzez określenie parametru IC_{50} badanej substancji można przewidzieć wpływ na toksyczność obwodową. Kolejnym krokiem często jest zbadanie molekularnego mechanizmu aktywności badanego związku i próba wyodrębnienia szlaku komórkowego, naruszonego jego aktywnością.

Po potwierdzeniu cytotoksyczności związku w badaniach przesiewowych *in vitro*, testowany jest potencjał przeciwnowotworowy związku w modelu zwierzęcym, co jest istotnym elementem zaawansowanych badań przedklinicznych.

Żeby podać substancję nierozpuszczalną w wodzie, należy opracować jej formułację w nietoksycznym nośniku, który zapewni bezpieczeństwo podania. Część związków na tym etapie okazuje się słabo rozpuszczalna w mieszaninach rozpuszczalników uznawanych za bezpieczne do podania do zwierzęcia.

Następnie zwykle prowadzone są podstawowe badania farmakokinetyczne, pozwalające dobrać optymalną dawkę i drogę podania. Parametry, które uzyskuje się na tym etapie pozwalają na ocenę stabilności badanej substancji we krwi, a także odpowiednie zaplanowanie drogi i częstości podania, żeby utrzymać terapeutyczne stężenie we krwi. Badania w modelu zwierzęcym pozwalają również ocenić toksyczność w stosunku do tkanek nienowotworowych, w tym ważnych narządów takich jak mózg, serce, wątroba i nerki.

Niezbędne są zatem badania prowadzące do syntezy nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym, ale również uważne zaplanowanie tych badań oraz funduszy, tak żeby uwzględnić możliwość podania związku *in vivo*, a więc w perspektywie – translację do realiów klinicznych.

5.3. DIKARBOKSYIMIDY

Jedną z grup związków o wysokiej aktywności biologicznej stanowią dikarboksyimidy. Cechą charakterystyczną ich struktury jest atom azotu, do którego przyłączone są bezpośrednio dwie grupy acylowe, chociaż związki te mogą mieć bardzo skomplikowaną budowę. Dikarboksyimidy wykazują szeroką aktywność biologiczną, od działania przeciwgrzybiczego, poprzez przeciwbakteryjne (kaptan, iprodion)¹⁵⁷ i przeciwnowotworowe. Imidy są aktualnie stosowane na przykład w leczeniu szpiczaka mnogiego - od lat złotym standardem jest użycie talidomidu oraz jego analogów. Związki te wykazują zarówno działanie immunomodulacyjne, jak i toksyczne w stosunku do komórek nowotworu¹⁵⁸. Inne opisane dość obszernie w literaturze przykłady dikarboksyimidów to mitonafid oraz amonafid, pochodne naftalenoimidu.

5.3.1. Amonafid i mitonafid

Analiza publikacji z bazy PubMed wskazuje, że, pierwsze doniesienia o aminofidzie (nafidimide) i mitonafidzie pojawiają się w 1980 roku¹⁵⁹ i opisują syntezę pochodnych naftalenoimidów o aktywności antyneoplastycznej w jądrzastych erytrocytach pochodzącego z kurczaka. Mechanizm działania amonafidu, a także jego strukturalnych analogów (takich jak

mitonafid) obejmuje interkalację do DNA oraz hamowanie działania topoizomerazy II (enzymu rozplatającego nici DNA)¹⁶⁰. W komórkach linii CHO (linia komórkowa wyprowadzona w wyniku biopsji jajnika chomika chińskiego) mitonafid powodował pękanie nici DNA oraz powstawanie aberracji chromosomowych¹⁶¹. W modelach mysich amonafid zwalczał skutecznie komórki białaczki, czerniaka oraz mięsaka¹⁶². Związek jest prawdopodobnie substratem dla P-gp¹⁶². Przeprowadzono liczne próby kliniczne, badające aktywność przeciwnowotworową u pacjentów obciążonych zaawansowanymi nowotworami hematologicznymi i niehematologicznymi, ale przeważnie badania te kończyły się na fazie II, w której wykazywano brak efektu terapeutycznego, a także często wysoką toksyczność, głównie leukocytopenię, trombocytopenię albo granulocytopenię^{163–175}. Jedynie w przypadku wtórnej ostrej białaczki szpikowej (ang. *Secondary acute myeloid leukemia*, sAML), jabłczan amonafidu w kombinacji z cytarbiną przeszedł do fazy III badań klinicznych. Uzyskano kompletną remisję u prawie połowy pacjentów, jednak leczenie nie poprawiło odsetka remisji w porównaniu do stosowanej w klinice daunorubicyny i cytarbiny¹⁷⁶.

Do dziś kontynuowane są prace nad dikarboksyimidami obejmującymi syntezę mononafateloimidów, bisnaftalenoimidów i koniugatów naftalenoimidów z innymi związkami heterocyklicznymi^{177–180}. Generalnie, obserwuje się cytotoksyczny wpływ imidów cyklicznych na ostrą białaczkę szpikową, jednak na ten moment żaden z nowych związków pochodnych nie jest na etapie prób klinicznych¹⁸¹.

5.3.2. Talidomid

Innym przykładowym dikarboksyimidem jest talidomid. Kontrowersje wokół pierwotnego użycia talidomidu stanowią przykład tego, jak ważne są badania *in vivo* przed dopuszczeniem produktów do stosowania u ludzi¹⁸².

Pierwotnie formulację tego związku opracowała szwajcarska firma Ciba, która jednak odsprzedała ten produkt niemieckiej firmie Chemie Grünenthal. Talidomid został wprowadzony na rynek w 1953 r. pod nazwą handlową Contergan. Niestety, jako lek na lęki, problemy ze snaniem i poranne mdłości, Contergan przepisywany był ciężarnym kobietom. Nie wiedziano wówczas, że lek ma działanie teratogenne, co prowadziło do poważnych wad płodu^{183,184}. Do 1961 r. talidomid wycofano z użycia w większości krajów. Badania nad związkiem jednak nie ustały i w niedługim czasie opublikowano doniesienia naukowe o jego wpływie immunomodulacyjnym i przeciwzapalnym, a także hamowaniu angiogenezy w komórkach nowotworowych. Pojawiły się głosy, że powinno się przywrócić związek do użytku,

jako że nie wykorzystano w pełni jego potencjału terapeutycznego, zwłaszcza w chorobach, w których dostępne leczenie było niewystarczające albo wówczas nie istniało¹⁸⁵. Efekty prób klinicznych stosujących talidomid były obiecujące. Obserwowano immunosupresję u pacjentów cierpiących na chroniczne odrzucenie przeszczepu (*graft-versus-host*, GVH)¹⁸⁶, AIDS¹⁸⁷, a zwłaszcza terapeutyczny efekt u chorych dotkniętych szpiczakiem mnogim¹⁸⁸. W grudniu 1999 podczas kongresu Amerykańskiego Towarzystwa Hematologicznego zaprezentowane wyniki zostały uznane za przełomowe dla leczenia tego nowotworu. Talidomid został dopuszczony do użytku przez amerykańską agencję do spraw bezpieczeństwa jedzenia i leków (*Food and Drug Administration*, FDA) w roku 1998 (FDA nie dopuściła talidomidu do użycia w latach 50-tych na fali jego popularności). Europejska Agencja bezpieczeństwa leków (EMA, ang. *European Medicines Agency*) odnotowuje dopuszczenie talidomidu do leczenia m.in. szpiczaka i GVH od 09.07.2001 r.

5.4. ZWIĄZEK BK124

Związek będący przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej został zsyntetyzowany i wstępnie przebadany *in vitro* jako jeden z osiemdziesięciu nowych pochodnych dikarboksyimidów przez współpracujące ze sobą zespoły – dr Mariolę Krawiecką i dr Bożenę Kuran z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz grupę profesor Barbary Nawrot z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. W wyniku badań przesiewowych wyłoniono związki o wysokiej cytotoksyczności w stosunku do komórek kilku linii nowotworowych i niskiej w stosunku do komórek prawidłowych, m.in. związek oznaczony jako BK124 (oznaczenie BK124 jest tożsame z oznaczeniem BK124.1). Wyniki tych badań stały się podstawą grantu konsorcyjnego NCN OPUS8 2014/15/B/NZ7/00966, którego liderem był Instytut Nenckiego; grant był realizowany w Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym standardzie pod kierunkiem prof. dr. hab. Urszuli Wojdy, a jego celem były badania przedkliniczne związku BK124, których wyniki opisano w niniejszej dysertacji.

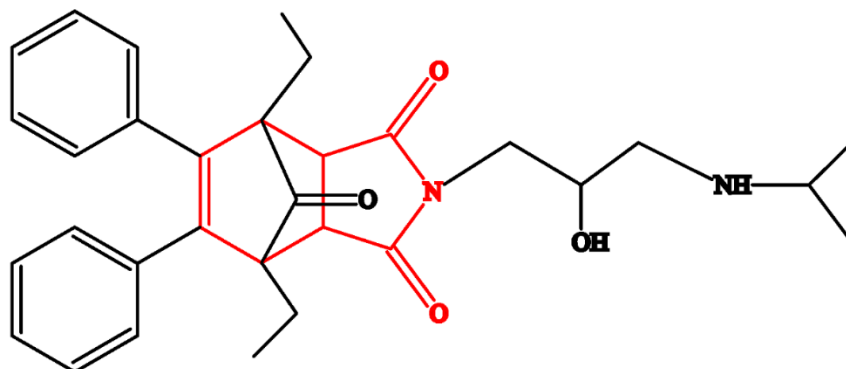
BK124 jest dikarboksyimidem, posiadającym w swojej budowie część heterocykliczną ftalimidu oraz rozgałęziony łańcuch acylowy (rycina 7). Związek powstał między innymi na bazie talidomidu, który oznaczono na rycinie 7 kolorem czerwonym.

Ponadto, BK124 posiada w swojej budowie element pośredni cyklu Krebsa - imid kwasu bursztynowego. W chemii medycznej, kwas bursztynowy używany jest jako substrat do syntezy nowych leków¹⁸⁹, a także w systemach dostarczania leków (ang. *drug delivery systems*,

DDS), w których uwalnianie leków zależne jest od silnie redukcyjnego środowiska, w którym rozwija się nowotwór¹⁹⁰.

Na etapie badań przesiewowych BK124 był testowany w komórkach linii K562 (przewlekła białaczka szpikowa), HL-60 (ostra białaczka szpikowa), HeLa (rak szyjki macicy) oraz w linii referencyjnej nienowotworowych komórek endotelialnych – HUVEC. Zauważono, że jako jeden z kilku związków posiada wysoką i selektywną toksyczność skierowaną przeciwko komórkom białaczkowym (IC_{50} 1-10 μ M), a jednocześnie niską aktywności przeciwko linii HUVEC (IC_{50} > 100 μ M)¹⁹¹. Szczegóły syntezy związku opisano, a także opublikowano wyniki analizy zgodności struktury związku z założeniami, rozbijając strukturę produktu przy użyciu promieniowania X do produktów pośrednich¹⁹².

Synteza i podstawowa aktywność cytotoksyczna względem wybranych linii komórkowych została opisana w publikacjach^{191,193}, a także jest chroniona patentem europejskim o numerze EP2687509.



Rycina 7. Wzór strukturalny BK124.

BK124 jest dikarboksyimidem, na czerwono zaznaczono część ftalimidową, wspólną z talidomidem.

Rozdział 6. Założenia i cel pracy

Poprzednie badania nad nowymi pochodnymi dikarboksyimidów pozwoliły wstępnie oszacować ich aktywność cytotoksyczną w komórkach białaczki, a także niską toksyczność względem linii nienowotworowej HUVEC. Dokładny mechanizm cytotoksycznego działania związków nie został jednak zbadany. Nie wiadomo było również, czy obserwowany w hodowli komórkowej efekt cytotoksyczny będzie również widoczny w modelu zwierzęcym białaczki, takim jak np. myszy model białaczki, uzyskany poprzez ksenotransplantację ludzkich komórek nowotworowych. Co więcej, ponieważ jednym z największych problemów współczesnej onkologii jest oporność na leczenie, powstało pytanie, czy nowo uzyskany związek będzie skuteczny w przypadku nowotworu szczególnie opornego na leczenie? A także, czy sam związek jest zdolny do indukcji oporności wielolekowej, spotykanej często podczas leczenia nowotworów.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było przeprowadzenie badań przedklinicznych *in vitro* oraz *in vivo* i ocena BK124 jako potencjalnego nowego leku przeciwnowotworowego do leczenia przewlekłej białaczki szpikowej.

Cele szczegółowe, służące realizacji celu głównego były następujące:

1. Ocena podstawowej cytotoksyczności indukowanej przez BK124 w komórkach ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej
2. Zbadanie zdolności BK124 do hamowania cyklu komórkowego, aktywacji apoptozy i modulacji szlaków sygnałowych związanych z proliferacją i przeżyciem komórki nowotworowej.
3. Wyznaczenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych BK124 w modelu zwierzęcym.
4. Ocena skuteczności przeciwnowotworowej związku BK124 w mysim modelu ksenotransplantacyjnym chronicznej białaczki szpikowej.
5. Zbadanie zdolności związku BK124 do indukcji oporności wielolekowej typu I (MDR1) oraz wrażliwość komórek o fenotypie MDR1 na leczenie związkiem BK124.
6. Zbadanie cytotoksyczności związku BK124 w komórkach macierzystych białaczki pochodzących od pacjentów w fazie chronicznej przewlekłej białaczki szpikowej przed podjęciem leczenia.

II. Metodyka

Rozdział 7. Materiały i metody

7.1. SPRZĘT LABORATORYJNY

Nazwa sprzętu	Firma, model
Termoblok	BioSan Bio TD8-100
Kołyska laboratoryjna	Stuart Gyro-rocker SSM3
Wirówka hodowla komórkowa	Eppendorf 5702
Wirówka stołowa	Eppendorf MiniSpin
Zasilacz (do elektroforezy)	Biorad PowerPac Basic
Muse® Cell Analyzer	Merck Millipore
Chemidoc	Biorad Chemidoc XRS+
Łaźnia wodna (hodowla komórkowa)	Julaba TW12
Inkubator komórkowy	Thermo Fisher HERAccl240i
Waga analityczna	Sartorius Quintix
Spektrofotometr	BioSpectrometer, Eppendorf
Termocykler	Mastercycler® Nexus, Eppendorf
Maszyna RT qPCR	RT Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System

Tabela 4. Wykaz sprzętów używanych w eksperymentach.

7.2. PRZECIWCIAŁA UŻYWANE W EKSPERYMENTACH

Zastosowanie	Przeciwciało	Numer katalogi, firma
Western Blot	Akt (pan) (C67E7)	4691, Cell Signalling Technologies
	c-Abl	2862, Cell Signalling Technologies
	ERK1/2	9102, Cell Signalling Technologies
	FOXO3a (75D8)	2497, Cell Signalling Technologies
	JNK	sc-7345, Santa Cruz Biotechnology
	Kaspaza-3	9662 Cell Signaling Technology (CST)
	Kaspaza-3 cięta (Asp175)	9661 Cell Signaling Technology (CST)
	Kaspaza-9	9502 Cell Signaling Technology (CST)
	Kaspaza-9 cięta (Asp330)	9501 Cell Signaling Technology (CST)
	Lamin B1 (A11)	sc-377000, Santa Cruz Biotechnology
	mTOR (7C10)	2983, Cell Signalling Technologies
	NF-κB p65(D14E12) XP®	8242, Cell Signalling Technologies
	p21 Waf1/Cip1 (12D1)	2947, Cell Signalling Technologies
	p38	612288, BD Transduction Laboratories
	PARP	BD Pharmingen 551025
	p-ERK1/2	9101, Cell Signalling Technologies
	p-JNK	sc-6254, Santa Cruz Biotechnology
	p-p38	612289, BD Transduction Laboratories
	STAT5	9363, Cell Signalling Technologies
	α-tubulin	T-6074, Sigma-Aldrich
β-Actin (8H10D10)	3700, Cell Signalling Technologies	

Cytometria przepływowa	APC anti human CD34 antibody	343607 Biolegend
	APC Mouse IgG2a κ isotype ctrl antibody	400221 Biolegend
	FITC Mouse Anti-Human P-glycoprotein (CD243) clone 17F9	BD Biosciences 557002
	FITC Mouse IgG2b κ Isotype Control	BD Biosciences 555742
	PE anti human CD38 antibody	303505 Biolegend
	PE Mouse IgG2a κ isotype ctrl antibody	400111 Biolegend

Tabela 5. Lista przeciwciał używanych w eksperymentach.

7.3. ZWIĄZEK BK124

Synteza BK124 została opisana wcześniej¹⁹¹. Masa molowa związku wynosi 537,0893g/mol. Związek występuje w postaci białego, niehigroskopijnego proszku o właściwościach elektrostatycznych. Dla wszystkich eksperymentów *in vitro* przygotowywano 20mM stężony roztwór BK124 w 100% DMSO i przechowywano w -20 °C, chroniąc przed światłem. Ze stężonego roztworu przygotowywano dalej rozcieńczone roztwory robocze, również w 100% DMSO, Do medium hodowlanego związek był dodawany tak aby końcowe stężenie DMSO w eksperymentach nie przekraczało 1% (v_{DMSO}/v_{medium}).

7.3.1. Eksperymenty *in vivo*

Do eksperymentów *w modelu* zwierzęcym, BK124 było rozpuszczane w mieszaninie 10% Solutolu HS 15 i 10% etanolu. Procedura rozpuszczania była dwuetapowa.

W pierwszym etapie 1 mg BK124 rozpuszczano w 50 µL Solutolu HS 15 i 50 µL bezwodnego etanolu 99.8%, a następnie wytrząsano przez 2 godziny w 30-40 °C do momentu aż BK124 rozpuściło się całkowicie. Roztwór (koncentrat) pozostawał stabilny przez 48 godzin w temperaturach 30-36 °C, charakteryzowała go duża lepkość, przez co nie dawał się on filtrować i porcjować.

W drugim etapie koncentrat rozcieńczano wodą do iniekcji (*aqua pro injectione*), otrzymując w ten sposób mieszaninę 10% Solutol HS 15/10% ethanol. Rozcieńczony roztwór zyskiwał bardziej płynną konsystencję, filtrowano go zatem przy użyciu filtra o średnicy pora 0.2 µm (Minisart PES; Sartorius, Goettingen, Germany), a następnie porcjowano do sterylnych 2 ml probówek. Roztwór do iniekcji przechowywano do 48 godzin przed podaniem zwierzęciu.

7.4. HODOWLA KOMÓRKOWA

Nazwa odczynnika	Firma, numer katalogowy
Butelki hodowlane T25	Eppendorf 0030710029
DMSO	Sigma-Aldrich D2650, D8418
Dokсорubicyna	Sigma-Aldrich
FBS - <i>Fetal bovine serum</i> (Płodowa surowica bydlęca)	Sigma-Aldrich F7524
Filtry nastrzykawkowe Minisart, średnica 0.22µm	Sartorius 16532
L-glutamina	Sigma G7513
Materiały zużywalne typu plastiki hodowlane	
Muse Cell Count&Viability Assay	Merck Millipore, MCH100102
Paklitaksel	Sigma-Aldrich
PBS (bez jonów Ca ²⁺ i Mg ²⁺)	Sigma-Aldrich 79382
Penicylina 10000 IU/ml, 10 mg/ml Streptomycyna	Sigma P4333
Płytki 96 dołkowa	Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplate 167008
Płytki 6-cidołkowe	Thermo Scientific™ Nunc™ Cell-Culture Treated Multidish 140675
rh GM-CSF 50ug (25 ng/mL)	PeproTech 300-03
rh IL-3 50 ug (50 ng/mL)	PeproTech 200-03
rh SCF 100ug (100 ng/mL)	PeproTech 300-07
RPMI 1640 w/o L-Glutamine, w/ 25mM HEPES	Biowest L0490-500
StemPro™-34 SFM medium	Gibco 10639011
Winkrystyna	Trimen Chemicals

Tabela 6. Lista odczynników i materiałów zużywanych w hodowli komórkowej.

Metoda oznaczania	Komórki	Gęstość wysiewania [komórek/ml]	Naczynie
Test MTT	K562	7 x 10 ³ w 50 µl	Płytki 96-dołkowa
	K562 – MDR1	7 x 10 ³ w 50 µl	
	CD34 ⁺	5 x 10 ⁴ w 50 µl	
Aneksyna V/jodek propidyny (apoptoza)	K562	1-2 x 10 ⁵ w 3 ml	Płytki 6-dołkowa
	K562-MDR1	1-2 x 10 ⁵ w 3 ml	
	CD34 ⁺	2.5 x 10 ⁵ w 3 ml	Płytki 24-dołkowa
	CD34 ⁺ CD38 ⁻	2.5 x 10 ⁵ w 3 ml	
Jodek propidyny (cykl komórkowy)	K562	1-2 x 10 ⁵ w 3 ml	Płytki 6-dołkowa
Immunobloting	K562	1-2 x 10 ⁵ w 4 ml	Płytki 6-dołkowa

Barwienia przy użyciu przeciwciała

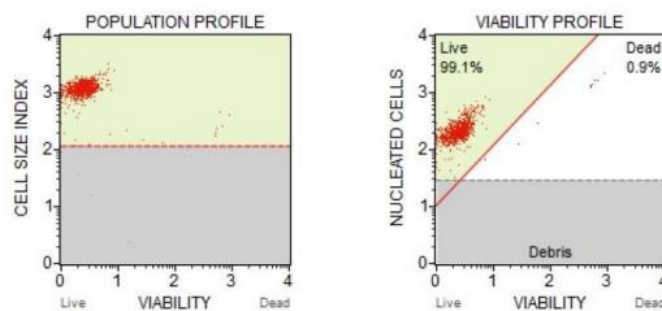
Anty MDR1	K562	1-2 x 10 ⁵ komórek/mL	Płytki 6-dołkowa
	K562-MDR1	1-2 x 10 ⁵ komórek/mL	
Anty CD34 ⁺	CD34 ⁺	2.5 x 10 ⁵ cells/mL	Płytki 24-dołkowa

Tabela 7. Gęstości komórek oraz naczynia hodowlane komórek używane w różnych eksperymentach

Wszystkie linie komórkowe oraz komórki pierwotne pochodzące od pacjentów hodowane były w inkubatorze (HERAcell 150i, Thermo Scientific) w 37°C, w atmosferze 5% stężenia CO₂ oraz 21% stężenia tlenu przy 95% wilgotności powietrza.

7.4.1. Liczenie komórek i oznaczanie ich żywotności

Komórki pobrane z hodowli rozcieńczano 1:20 w odczynniku Muse Cell Count&Viability Assay i oznaczano przy użyciu cytometru Muse Cell Analyzer. Integralność błony komórki umierającej lub martwej jest znacząco pogorszona, przez co reagent przedostaje się do jej wnętrza i daje barwny sygnał. Przykładowy pomiar został przedstawiony na rycinie 8. Na dotplocie po stronie lewej widoczna jest analizowana populacja, natomiast po stronie prawej odsetek komórek żywych oraz martwych. Komórki używane do eksperymentów pochodziły z fazy wzrostu logarytmicznego i cechowała je żywotność większa niż 95%.



Viable Cells / mL :	1.79E+06
Viability % :	99.10 %
Total Cells / mL :	1.80E+06
Events Acquired :	1004
Dilution Factor :	20.00

Rycina 8. Przykładowy pomiar żywotności przy użyciu Muse Cell Analyzer.

Na rycinie widoczna jest analizowana populacja (wykres po stronie lewej) oraz odsetek komórek żywych oraz martwych (wykres po stronie prawej).

7.4.2. Warunki hodowli poszczególnych linii

7.4.2.1 K562

Linia komórkowej K562 CCL-243™ (BCR-ABL +) została zakupiona w ATCC® (Manassas, VA, USA). Kompletne medium hodowlane stanowiło RPMI 1640 z dodatkiem buforu HEPES, 2 mM GlutaMAX, 10% FBS oraz 1% penicyliny/streptomycyny. Komórki wysiewane były w gęstości 1 – 2 x 10⁵ komórek/ml w 10ml pożywki oraz pasażowane, kiedy hodowla osiągała gęstość 0,8 – 1 x 10⁶ komórek/ml, to jest co dwa-trzy dni. Nie dopuszczano do przekroczenia gęstości 10⁶ komórek/ml zgodnie z zaleceniami dystrybutora (ATCC). Doświadczenia wykonywane były na komórkach pochodzących z wczesnych pasażów, tj. od pasażu 4 do 25. Komórki były mrożone

przy użyciu 90% FBS+10% DMSO, trzymane do miesiąca w -80°C, a następnie w ciekłym azocie w -196°C.

Linia komórkowa K562 pochodzi od 53 letniej pacjentki i została wyprowadzona z wysięku opłucnowego w trakcie kryzy blastycznej¹⁹⁴. Jest linią pozbawioną funkcjonalnego TP53 na skutek insercji i przesunięcia ramki odczytu¹⁹⁵. W linii komórkowej brakuje również białka p16 (informacja ze strony dystrybutora).

7.4.2.2 Linia K562 (MDR1+)

W komórkach linii K562 indukowano fenotyp oporności wielolekowej przy użyciu winkrystyny, zgodnie z protokołem opisanym w literaturze przez dra Takashi'ego Tsuruo¹⁹⁶. Komórki K562 wysiewano w optymalnej gęstości, a następnie dodawano do nich winkrystynę. Po osiągnięciu dwukrotnej konfluencji (tj. osiągnięcia gęstości około 0,8 – 1 x 10⁶ komórek/ml), stężenie winkrystyny podnoszono dwukrotnie.

Stężenie wyjściowe winkrystyny wynosiło 3 nM (co w teście żywotności MTT odpowiadało wartości IC₅₀), a stężenie końcowe 0,1 μM. Pozytywny fenotyp MDR1 potwierdzono przy użyciu *RealTime* qPCR oraz cytometrii przepływowej (opisane odpowiednio w punkcie 7.8.3 oraz 7.9.1-7.9.3).

7.4.2.3 Hodowla komórek pierwotnych

Komórki CD34⁺ wyizolowane (szczegółowy opis w punkcie 7.6) z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów w fazie chronicznej przewlekłej białaczki szpikowej hodowano w medium StemPro-SFM z dodatkiem 10% FBS, a także 50ng/ml IL-3, 25ng/ml GM-CSF oraz 100ng/ml SCF. Po izolacji komórki inkubowano w pełnym medium 24 godziny przed rozpoczęciem eksperymentu z BK124.

7.5. TEST ŻYWOTNOŚCI MTT (BROMEK 3-(4,5-DIMETYLOTIAZOL-2-YL)- 2,5-DIFENYLOTETRAZOLIOWY)

Nazwa odczynnika	Firma, numer katalogowy
Dodecylosiarczan sodu	Sigma-Aldrich L3771
Kwas chlorowodorowy (stężony)	Sigma-Aldrich H1758
MTT (Thiozyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma-Aldrich M2128

Tabela 8. Lista odczynników używanych w teście MTT

Test MTT jest oparty o aktywność enzymu – dehydrogenazy mitochondrialnej, który katalizuje reakcję przekształcenia żółtej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej do formazanu,

wytrącanego w postaci kryształków w pożywce hodowlanej¹⁹⁷. Aktywność metaboliczna pozwala oszacować żywotność i proliferację komórek, a także cytotoksyczność badanych związków. Rozpuszczenie kryształków formazanu pozwala na odczytanie absorbancji przy długości fali 492–570 nm. Wartość absorbancji jest tym większa, im większa jest aktywność metaboliczna komórek.

7.5.1. Przygotowanie odczynników

7.5.1.1 MTT

Sproszkowany związek MTT (250mg) rozpuszczono w 50 ml PBS Ca²⁺ i Mg²⁺ uzyskując stężenie 5 mg/ml. Roztwór następnie przefiltrowano przez filtr o średnicy 0,22 µm i poporcjowano do sterylnych probówek. Rozpuszczony związek przechowywano w temperaturze -20°C do czasu użycia.

7.5.1.2 Bufor do lizy

Powstające w aktywnych metabolicznie komórkach kryształki formazanu nie są rozpuszczalne w wodzie. Do rozpuszczenia używano 10% dodecylosiarczanu sodu zakwaszonego 0,01M kwasem solnym. Mieszanina ta umożliwia rozkład komórek znajdujących się na płytce, uwalniając z nich pozostałe kryształki formazanu oraz ich rozpuszczenie pod wpływem silnego detergentu (SDS). Użycie kwasu solnego niweluje efekt tła przy odczycie absorbancji.

7.5.2. Przebieg eksperymentu

Komórki wysiewano w 50 µl kompletnej pożywki. Po 24 godzinnej preinkubacji do komórek dodawano 1 µl rozcieńczenia roboczego związku BK124, taksolu, winkrystyny, doksorubicyny albo DMSO w 49 µl kompletnej pożywki. Końcowe stężenie DMSO wynosiło w każdym wariancie 1% w przypadku komórek K562 i K562-MDR1 oraz 0,1% w przypadku komórek CD34⁺. W tabeli 9 przedstawiono szczegółowo przygotowanie roztworów roboczych z 0,1 mM, 1 mM i 10mM roztworu podstawowego BK124.

A:

Końcowe stężenie BK124 [μ M]	Końcowe stężenie DMSO (v/v) [%]	Rozcieńczenie robocze [μ M]	Objętość roztworu podstawowego BK124 [μ l]	Roztwór podstawowy	DMSO [μ l]
0	1	-	-	-	20
0,1	1	10	2	0,1 mM	18
1	1	100	10	1mM	90
2	1	200	20		80
4	1	400	40		60
6	1	600	60		40
8	1	800	80		20
10	1	1000	100		-

B:

Końcowe stężenie BK124 [μ M]	Końcowe stężenie DMSO (v/v) [%]	Rozcieńczenie robocze [mM]	Objętość roztworu podstawowego BK124 [μ l]	Roztwór podstawowy	DMSO [μ l]
0	0,1	-	-	-	100
0,1	0,1	0,1	5	1 mM	45
0,5	0,1	0,5	20		20
1	0,1	1	5	10 mM	45
1,5	0,1	1,5	7,5		42,5
2	0,1	2	10		40
5	0,1	5	25		25

Tabela 9. Stężenia robocze BK124 użyte w testach cytotoksyczności.

Tabele przedstawiają szczegółowo przygotowanie roztworów roboczych do badania cytotoksyczności BK124 w komórkach K562 i K562-MDR1 (A) oraz CD34+ (B).

Po 48 godzinach inkubacji z badanym związkiem do dołków dodawano 20 μ l roztworu 5mg/ml MTT, a następnie komórki umieszczono z powrotem w inkubatorze na dwie godziny. Po tym czasie do dołków dodawano bufor do lizy, rozkładający komórki oraz umożliwiający rozpuszczenie kryształków formazanu. Po całonocnej inkubacji w temperaturze 37°C kryształki rozpuszczały się, co umożliwiało odczytanie absorbancji.

Wyniki przeżywalności analizowano odnosząc wartości absorbancji próby badanej do wartości absorbancji kontroli, którą stanowiły komórki z dodatkiem 1% lub 0,1% DMSO. Dane umieszczano w programie DrFit (ver. 1.042, licencja MIT¹⁹⁸), który pozwala na dopasowanie odpowiedniej krzywej teoretycznej do wyznaczonych punktów i precyzyjne oszacowanie parametru EC₅₀. Przy użyciu programu GraphPad Prism liczono również absolutną wartość parametru IC₅₀. EC₅₀ to stężenie badanej substancji, przy którym efekt stanowi połowę

maksymalnej odpowiedzi. Parametr IC₅₀ natomiast mówi o dawce inhibitora, przy której hamuje on czynnik albo proces biologiczny o 50% (np. proliferację komórki nowotworu, aktywność enzymu, namnażanie mikroorganizmów itp.). W przypadku badanej substancji oba te parametry mają zbliżoną wartość, ponieważ efektem jest śmiertelność komórek nowotworu (czynnik biologiczny). W wynikach autorka posługuje się pojęciem IC₅₀.

7.6. POZYSKIWANIE KOMÓREK CD34⁺ Z KRWI OBWODOWEJ PACJENTÓW CHORYCH NA PRZEWLEKŁĄ BIAŁACZKĘ SZPIKOWĄ

Nazwa odczynnika	Firma, numer katalogowy
Anhydrous D-glucose	Sigma-Aldrich G5767
CaCl ₂ · 2H ₂ O	VWR 22317.297
DPBS	Gibco 14190144
EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit II	StemCell Technologies
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare 17-1440-03
KCl	VWR 26764.298
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	VWR 25108.295
NaCl	VWR 153274V
Probówka na krew	EDTA-K2 Vacutainer tubes, Becton Dickinson
Tris-HCl	Sigma-Aldrich 648317

Tabela 10. Odczynniki użyte do selekcji komórek CD34⁺ z krwi obwodowej.

7.6.1. Zgoda komisji bioetycznej

Zgodę na badanie wyraziła Komisja Bioetyczna przy Centralnym Szpitalu Klinicznym MSWiA w Warszawie (nr referencyjny KB/107/2018). Eksperymenty z udziałem materiału ludzkiego wykonywane były w zgodzie z postanowieniami deklaracji helsińskiej, a także regulacjami polskimi, regulacjami Unii Europejskiej oraz kodeksem etycznym badań medycznych (ang. *the Code of Ethical Medical Research*) stworzonym przez członków *World Medical Association*. Każdy pacjent podpisem wyraził świadomą zgodę na użycie jego materiału w projekcie.

7.6.2. Izolowanie komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej

Po uzyskaniu świadomej zgody, pobierano krew żylną od nowoprzyjętych pacjentów w fazie przewlekłej przewlekłej białaczki szpikowej (n=8). Próbkę oznaczono jako CML 1-8. Krew pochodziła od 6 mężczyzn i 2 kobiet w wieku 39-79 lat zdiagnozowanych w Katedrze i klinice hematologii, onkologii i chorób wewnętrznych Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (tabela 11).

ID pacjenta	Wiek	Płeć	Faza	BCR-ABL1 transkrypt	Czystość wyizolowanej populacji CD34 ⁺ [%]
CML1	42	K	Przewlekła	b3a2	b/d
CML2	79	M	Przewlekła	obecne	67,44
CML3	64	M	Przewlekła	b3a2	95,3
CML4	56	K	Przewlekła	b3a2	91,64
CML5	46	M	Przewlekła	b3a2	76,7
CML6	39	M	Przewlekła	b2a2	92,5
CML7	68	M	Przewlekła	b3a2	b/d
CML8	Brak	M	Przewlekła	b/d	87,24

Tabela 11. Lista pacjentów, których materiału użyto w niniejszej pracy.

Tabela zawiera informacje odnośnie wieku, płci, fazy choroby, rodzaju transkryptu BCR-ABL1, a także czystości wyizolowanych komórek CD34⁺. Adnotacja „b/d” oznacza brak danych.

Próbki krwi rozcieńczono w stosunku 1:1 w roztworze BSS (ang. *Balanced salt solution*), zawierającym 0,01% D-glukozę, 5 μ M CaCl₂ · 2H₂O, 98 μ M MgCl₂ · 6 H₂O, 0.54 mM KCl, 14.5 mM Tris pH 7.6 w 0.9% soli fizjologicznej, a następnie nakładano ostrożnie na warstwę Fikolu. Tak przygotowane próbki wirowano przez 40 minut przy prędkości 400 x g. Po zwirowaniu zbierano komórki jednojądrzaste, tzw. PBMC, znajdujące się w białym pierścieniu pomiędzy warstwami. Komórki te następnie przepłukiwano trzykrotnie przy użyciu buforu BSS. Po ustaleniu ilości wyizolowanych komórek PBMC do etapu selekcji pobierano 100 milionów komórek jednojądrzastych.

7.6.3. Selekcja komórek CD34⁺ z populacji komórek PBMC.

Komórki zawieszano w 1 ml buforu do izolacji (DPBS z dodatkiem 2% FBSu i 1 mM EDTA) i przenoszono do sterylnej polistyrenowej probówki o zaokrąglonym dnie. Dodawano koktajlu przeciwciał do selekcji w ilości 100 μ l/ml próbki. Inkubowano kwadrans w temperaturze pokojowej. Następnie, do probówki dodawano kulek magnetycznych w ilości 50 μ l/ml próbki. Inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Próbkę umieszczano w magnesie na 5 minut, a następnie zdecydowanym ruchem wylewano supernatant, zawierający komórki pozbawione antygenu CD34⁺. Krok ten powtarzano cztery razy. Hodowlę uzyskanych w ten sposób komórek opisano w punkcie 7.4.2.3.

7.7. CYTOMETRIA PRZEŁYWOWA

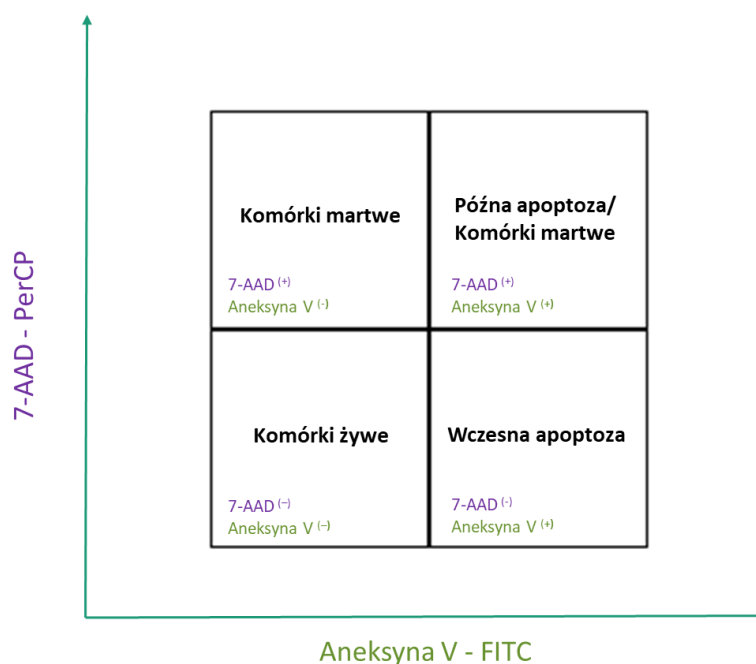
Nazwa odczynnika	Firma, numer katalogowy
FITC Annexin V Apoptosis detection kit with 7 AAD	Biologend, 640922
FITC Annexin V Apoptosis detection kit II	BD Biosciences, 556570
Jodek propidyny	Sigma P4170
RNaza wolna od DNaz	ThermoFisher Scientific EN0521

Tabela 12. Odczynniki używane do cytometrii przepływowej.

Eksperymenty przy użyciu cytometru przepływowego wykonywane były w Pracowni Cytometrii w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie.

7.7.1. Badanie apoptozy

Analizowano cytometrycznie odsetek komórek apoptotycznych pod wpływem związku BK124 w komórkach K562, K562-MDR1 oraz CD34⁺. Klasyfikacji dokonywano przy pomocy barwnika 7-AAD albo jodku propidyny (PI), wnikających do komórek martwych oraz aneksyny V, która posiada silne powinowactwo do fosfatydyloseryny. W zdrowej komórce fosfatydyloseryna zlokalizowana jest po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej, jednak w trakcie apoptozy obserwuje się jej uzewnętrznienie¹⁹⁹. Po dodaniu do komórek aneksyny V połączonej z fluorochromem (np. fluoresceiną) możliwa jest detekcja i ocena stopnia apoptozy w żywej populacji komórkowej. Ponadto, błona komórki apoptotycznej traci swoją integralność i przepuszcza substancje takie jak jodek propidyny czy 7-AAD, które oddziałują ze strukturą DNA komórki. W ten sposób można odróżnić komórki żywe (7-AAD/PI⁽⁻⁾ Aneksyna V⁽⁻⁾), we wczesnej apoptozie (7-AAD/PI⁽⁻⁾ Aneksyna V⁽⁺⁾), w późnej apoptozie lub martwe (7-AAD/PI⁽⁺⁾ Aneksyna V⁽⁺⁾), a także komórki martwe/nekrotyczne (7-AAD/PI⁽⁺⁾ Aneksyna V⁽⁻⁾). Lokalizację poszczególnych populacji przedstawiono na rycinie 9.



Rycina 9. Analiza apoptozy przy użyciu aneksyny V/7-AAD.

Wybarwione komórki analizowane były przy użyciu cytometru przepływowego. Komórki żywe zlokalizowane były w lewym dolnym kwadrancie, umierające we wczesnej apoptozie w prawym dolnym rogu, a komórki w późnej apoptozie albo martwe w kwadrancie górnym prawym. Komórki w kwadrancie lewym górnym były martwe lub nekrotyczne. Oś y, podpisana jako „7-AAD PerCP” może być też rozumiana jako „jodek propidyny-PE) w zależności od użytego do detekcji reagentu.

7.7.1.1 Analiza apoptozy w komórkach K562, K562-MDR1, uodpornianych na BK124 komórkach K562 oraz komórkach CD34⁺

Komórki preinkubowano 24 godziny w kompletnej pożywce. Następnie, do dołków dodawano DMSO (do stężenia końcowego 0,1%), a także BK124 w stężeniu 2,5 μM oraz 5 μM . Po kolejnych 24 godzinach inkubacji komórki z BK124 zbierano i barwiono zgodnie z zaleceniami producenta, używając zestawu do detekcji apoptozy. Wybarwione komórki były niezwłocznie analizowane na cytometrze BD FACSCalibur używając programu CellQuest software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

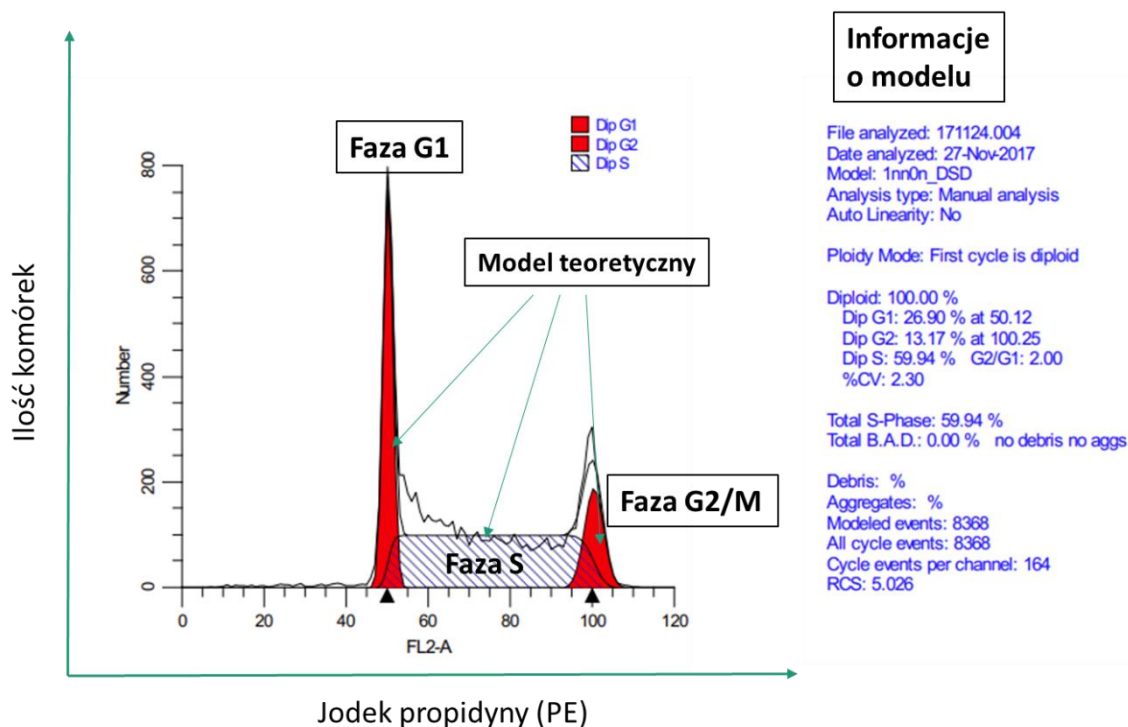
7.7.1.2 Analiza apoptozy w komórkach CD34⁺ CD38⁻

Po preinkubacji do komórek CD34⁺ dodawano DMSO (do stężenia końcowego 0,1%), a także BK124 w stężeniu 2,5 μM oraz 5 μM . Po 24 godzinach komórki zbierano, dodawano do nich przeciwciał skierowanych przeciwko CD34 oraz CD38 (punkt 7.2, tabela 5), a następnie barwiono zgodnie z protokołem producenta aneksyną V i jodkiem propidyny. Uwzględniono odpowiednie kontrole izotypowe. Wybarwione komórki były niezwłocznie analizowane przy użyciu cytometru BD LSRFortessa, a następnie przy użyciu oprogramowania FlowJo.

7.7.2. Analiza cyklu komórkowego

7.7.2.1 Przebieg barwienia

Cykl komórkowy analizowano przy użyciu jodku propidyny. Jodek propidyny posiada zdolność do interkalacji w strukturę DNA, dając barwny produkt w zakresie odczytywanym przez urządzenie w kanale fosfoerytryny (PE). W ten sposób uzyskuje się histogram, pozwalający na odczytanie etapu cyklu mitotycznego komórki. Przykładowy histogram przedstawiono na rycinie 10.



Rycina 10. Przykładowy wynik analizy cyklu komórkowego z programu ModFit.

Na podstawie danych z cytometru przepływowego, program modfit dopasowuje model teoretyczny podziałów, co pozwala dokładnie określić odetek komórek w poszczególnych fazach cyklu. Na rycinie zaznaczono najważniejsze elementy modelu.

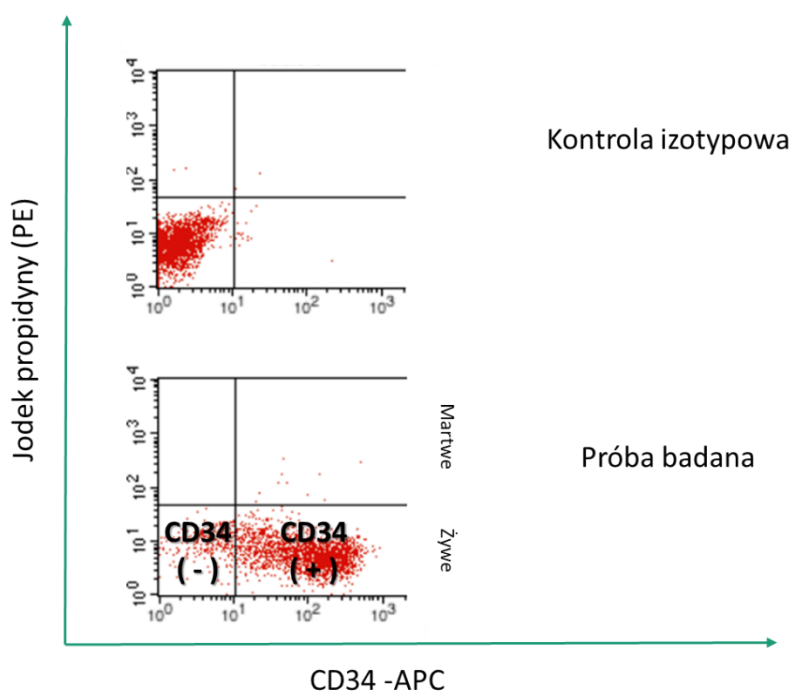
Po 24 godzinach preinkubacji do dołków dodawano DMSO do stężenia końcowego 1% albo BK124 w DMSO. Komórki były następnie inkubowane 24 godziny oraz 48 godzin. Po inkubacji komórki przepłukiwano zimnym PBSem (bez jonów Mg^{2+} oraz Ca^{2+}), a następnie zawieszono w zimnym 70% etanolu i umieszczono w $-20^{\circ}C$ na 24 godziny. Po tym czasie etanol odplukano, a komórki zawieszono w 50 $\mu g/mL$ jodku propidyny i 50 $\mu g/mL$ DNAzy wolnej od RNaz w PBSie i inkubowano 30 minut w $37^{\circ}C$. Cykl komórkowy analizowano na cytometrze BD FACSCalibur używając programu CellQuest software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), a następnie przy pomocy programu ModFit LT (3.2 software, Verity Software House, Topsham, ME, USA).

7.7.3. Analiza ekspresji glikoproteiny-P przy użyciu cytometrii przepływowej

Po 24 godzinach preinkubacji do dołków dodano DMSO (stężenie końcowe 1%) albo badanych związków. Komórki (K562, K562-MDR1) inkubowane były następnie 24 godziny. Po tym czasie komórki zebrano, przepłukano przy użyciu 0,5% BSA w PBSie i barwiono 30 minut na lodzie przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko MDR1 albo odpowiedniej kontroli izotypowej. Po inkubacji komórki przepłukiwano, a następnie dodawano do nich jodku propidyny i analizowano na cytometrze BD FACSCalibur przy użyciu CellQuest software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

7.7.4. Pomiar czystości populacji komórek CD34⁺ izolowanych z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej

Po izolacji komórek CD34⁺ analizowano czystość selekcji (tj. odsetek komórek CD34-pozytywnych w populacji). $2,5 \times 10^4$ komórek CD34⁺ przepłukiwano PBSem z dodatkiem 0,5% BSA (V_m/V_v) i rozdzielano na dwie próbówki typu Eppendorf (barwienie i kontrola IgG). Pellety zawieszano w buforze PBS z dodatkiem 0,5% BSA (jw.), a następnie dodawano odpowiedniego przeciwciała (punkt 7.2, tabela 5). Próbki krótko wortexowano i inkubowano na lodzie 30 minut. Po inkubacji komórki przepłukiwano PBSem, a następnie, żeby odróżnić populację żywą i martwą, dodawano do nich jodek propidyny i analizowano na cytometrze BD FACSCalibur przy użyciu CellQuest software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Przykładowe barwienie i czystość próbek poszczególnych pacjentów widoczna na rycinie 11. Odsetek komórek CD34-pozytywnych dla każdego pacjenta został przedstawiony wcześniej w tabeli 11 (punkt 7.6.2).



Rycina 11. Przykładowy wynik pomiaru czystości populacji komórek CD34+ pochodzących z komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej pacjentów CML.

7.8. UODPARNIANIE KOMÓREK NA BK124 (EKSPERYMENT SZEŚCIOMIESIĘCZNY)

Prowadzono hodowlę komórek K562 na płytce 18-dółkowej z oraz bez dodatku DMSO (do stężenia końcowego 0,1%), a także z 1 μ M lub z 2 μ M BK124 w 0,1% DMSO. Medium wymieniano co 2-3 dni. Komórki pasażowano po osiągnięciu stężenia około 10^6 komórek/ml (konfluencja). Po sześciu miesiącach komórki zebrano na analizę cytotoksyczności MTT (opisane w punkcie 7.5), a także analizę ekspresję glikoproteiny-P na poziomie zarówno białka (opisane w punkcie 7.7.3), jak i RNA. Warunki eksperymentalne były analogiczne jak dla linii K562 bez modyfikacji.

7.8.1. Izolowanie RNA

Nazwa odczynnika/materiału zużywalnego	Firma, numer katalogowy
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
High-Capacity RNA-to-cDNA™	Applied Biosystems
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fischer Scientific, 4346906
MicroAmp™ Optical Adhesive Film Kit	Thermo Fischer Scientific, 4313663
Sonda ABCB1	Hs00184500_m1, Applied Biosystems™ TaqMan™ Expression Assay probes
Sonda GAPDH	Hs02786624_g1, Applied Biosystems™ TaqMan™ Expression Assay probes
TaqMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, PN4370048

Tabela 13. Odczynniki użyte do izolacji RNA i RT qPCR

Izolowanie RNA przeprowadzone było przy użyciu High Pure RNA Isolation Kit zgodnie z instrukcją producenta. Około milion komórek zawieszono w 200 μ l buforu PBS, a następnie dodawano do nich 400 μ l dołączonego buforu do lizy (Lysis/-Binding Buffer) i worteksowano przez 15 sekund. Tak zlizowane komórki nakładano na dołączoną do zestawu kolumnkę i wirowano 15 sekund przy prędkości $8,000 \times g$. Przesącz odrzucano. Następnie, do próbki na kolumnie dodano 90 μ l buforu do inkubacji z DNazą i 10 μ l DNazy. Całość inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę wirowano następnie ($8,000 \times g$) i pługano przy użyciu dołączonych do zestawu buforów: Wash Buffer 1 oraz Wash Buffer 2. Przesącz na tym etapie odrzucano. W końcu na kolumnę nakładano 50 μ l buforu do elucji, co pozwalało wypłukać z kolumnki związane i oczyszczone RNA. Następnie mierzono stężenie i czystość RNA przy użyciu spektrofotometru (BioSpectrometer, Eppendorf).

7.8.2. Odwrotna transkrypcja

Do odwrotnej transkrypcji używano zestawu High-Capacity RNA-to-cDNA™. Najpierw przygotowywano 10 μ l/próbkę roztworu 2 x Master Mix, składającego się z buforu do odwrotnej transkrypcji, mieszanki deoksynukleotydów (dNTPs), losowych primerów, inhibitora RNazy i odwrotnej transkryptazy MultiScribe®. W 10 μ l wody zawieszano 1 μ g wyizolowanego RNA, a następnie dodawano do dołków zawierających roztwór Master Mix. Probówki wstawiano następnie do termocyklera, na którym ustawiano program:

Step 1 (25°C, 10 minut) → Step 2 (37°C, 120 minut) → Step 3 (85°C, 5 minut) → Step 4 (4°C, ∞)

Powstałe po reakcji cDNA z próbek przechowywano w -20°C do momentu analizy na RT qPCR.

7.8.3. RT qPCR

Do analizy ekspresji badanych genów używano specyficznych sond Taqman w reakcji qPCR w czasie rzeczywistym (*Real Time*). Do probówek przenoszono 1 ng cDNA, dodawano specyficzną względem genu sondę TaqMan oraz reagent TaqMan Gene Expression Master Mix. Dopełniano do 10 μ l wodą (składnik zestawu). Reakcję przeprowadzano używając RT Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Uzyskane w ten sposób wartości C_t analizowano używając metody $\Delta\Delta C_t$.

7.9. ELEKTROFOREZA SDS PAGE I WESTERN BLOTTING

Nazwa odczynnika	Firma, numer katalogowy
10x bufor Tris-Glicyna-SDS(TGS)	Biorad 161-0772
4x Bufor Laemmliego	Biorad 161-0737
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma-Aldrich A3678

BSA (albumina z surowicy bydłej)	Sigma-Aldrich A3294
Bufor do lizy i ekstrakcji RIPA	Sigma-Aldrich R0278
EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy	Sigma-Aldrich 03620
EGTA	Sigma-Aldrich E3889
Etanol	POCH 396480111
HEPES (1M)	Gibco 15630080
Inhibitor fosfataz (10x PhosSTOP™, Roche)	Roche 04 906 845 001
Inhibitor proteaz (10x cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail)	Roche 11 697 498 001
Marker molekularny	Biorad 161-0377
Membrany nitrocelulozowe	AppliChem A5239,3030R
Papier absorbujący Extra Thick Blot Filter Paper	Biorad 1703965
Potasu Chlorek	Sigma-Aldrich P9541
Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards	Biorad 1610377
Sodu chlorek	POCH 794121116
Substrat Clarity™ Western ECL Substrate	Biorad 1705060
TEMED (N, N,N,N – Tetrametyloetylenodiamina)	Sigma-Aldrich T9281
TGX Stain-Free FastCast	Biorad 161-0183
TRIZMA base	Sigma-Aldrich T1503
Tween-20	Sigma-Aldrich P9416
Odczynniki do SDS PAGE i Western Blot	
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma-Aldrich A3678
BSA (albumina z surowicy bydłej)	Sigma-Aldrich A3294
Bufor Tris-Glicyna-SDS (TGS) 10x	Biorad 161-0772
Etanol	POCH 396480111
Glicyna	Sigma-Aldrich G889
Marker molekularny (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards)	Biorad 161-0377
Membrany nitrocelulozowe	AppliChem A5239,3030R
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Biorad 1703930
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Biorad 1658007FC
Papier absorbujący Extra Thick Blot Filter Paper	Biorad 1703965
Substrat Clarity™ Western ECL Substrate	Biorad 1705060
TEMED (N, N, N, N – Tetrametyloetylenodiamina)	Sigma-Aldrich T9281
TGX Stain-Free FastCast	Biorad 161-0183
Tween-20	Sigma-Aldrich P9416

Tabela 14. Odczynniki do izolacji białka oraz analizy SDS PAGE Western Blot

7.9.1. Ekstrahowanie białka z komórek

Po 24 godzinach od wysiania komórek do dołków dodano DMSO (stężenie końcowe 0,1%) albo BK124 w stężeniu 2,5 μ M i 5 μ M. Następnie, w określonych punktach czasowych odpłukiwano medium hodowlane przy użyciu zimnego buforu PBS i wirowano 5 minut 1000 x *g*.

7.9.1.1 Izolowanie całkowitego białka z komórki

Pellet komórkowy zawieszano w buforze do lizy RIPA z dodatkiem koktajlu inhibitorów proteaz oraz fosfataz. Ekstrakcję białka prowadzono pół godziny w 4°C. Po tym czasie próbki wirowano z prędkością 15 000 x *g* przez 15 minut, a supernatant przenoszono do nowej probówki.

7.9.1.2 Izolowanie białka z podziałem na frakcję cytoplazmatyczną i jądrową

Pellet zawieszano w świeżo przygotowanym buforze hipotonicznym (10 mM HEPES pH=7.9; 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA pH=8; 0.1 EGTA pH=8) z dodatkiem koktajlów inhibitorów proteaz i fosfataz. Inkubowano 15 minut w temperaturze 4°C. Następnie, do komórek dodawano 5% NP-40 i worteksowano intensywnie przez 10 sekund. Próbki niezwłocznie wirowano 1,000 × g przez 15 minut w 4 °C. Supernatant był zbierany jako frakcja cytoplazmatyczna. Pellet przemywano dwukrotnie buforem hipotonicznym, a następnie zawieszano w buforze hipertonicznym (20 mM HEPES pH=7.9; 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA pH=8; 1 mM EGTA pH=8). Po 30 minutach inkubacji na lodzie, próbki wirowano 10,000 × g przez 15 minut w 4 °C. Nadsącz zbierano jako frakcję jądrową, a pozostały osad wyrzucano.

Wszystkie lizaty białkowe przechowywano w -80°C do momentu pomiaru stężenia i dalszej analizy. Stężenie białka w próbce mierzono za pomocą testu Pierce BCA Protein Assay Kit.

7.9.2. Przygotowanie próbek do analizy typu Western Blotting

Próbki przygotowywano, dodając do każdej z nich tę samą ilość białka. Dla lizatów zawierających białko całkowite oraz lizatów zawierających frakcję cytoplazmatyczną była to objętość odpowiadająca 20 µg białka, dla lizatów zawierających frakcję jądrową ilość białka wynosiła co najmniej 10 µg. Próbki dopełniano buforem RIPA do końcowej objętości 15µl. Następnie, do próbek dodawano buforu Laemmliego i inkubowano 10 minut w 95°C.

7.9.3. Żel poliakrylamidowy

Żele poliakrylamidowe o grubości 1,5mm i stężeniu końcowym akrylamidu 10% (żel rozdzielający) i 4% (żel zagęszczający) uzyskano korzystając z zestawu TGX Stain-Free FastCast. Do inicjacji i katalizowania procesu polimeryzacji, do mieszaniny odczynników dodawano TEMED oraz 10% APS. Żele przygotowywano na świeżo albo przechowywano do tygodnia w 4°C.

7.9.4. Elektroforeza SDS-PAGE

Żel umieszczano w aparacie do elektroforezy, który wypełniano buforem 1xTGS. Po ostrożnym wyjęciu grzebienia i przepłukaniu kieszonek, na żel nanoszono próbki. Elektroforezę prowadzono około 90 minut przy stałym napięciu **80 V** podczas migracji białek w żelu zagęszczającym i przy **120 V** podczas migracji przez żel rozdzielający. Postęp elektroforezy śledzono przy użyciu markera molekularnego.

Transfer białek na membrany.

Po zakończonej elektroforezie żel, membranę do immunoblottingu oraz papier absorbujący inkubowano w schłodzonej buforze do transferu (bufor Towbina: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% (v/v) etanol). Następnie, składano transfer w kolejności – biała okładka, gąbka, jeden gruby papier absorbujący, membrana nitrocelulozowa, żel i drugi papier absorbujący, gąbka, czarna okładka. Aby wypuścić ewentualne pęcherzyki powietrza, które mogłyby zakłócać transfer, całość rolowano kilkakrotnie przy użyciu próbówki typu Falcon. Kasetkę umieszczano w pudełku do transferu, następnie umieszczano w nim wkład chłodzący i całość zamykano. Transfer prowadzony był przez godzinę w chłodni, przy stałym napięciu 100V.

7.9.5. Blokowanie i inkubacja membran z przeciwciałami

Po zakończeniu transferu membrany inkubowano 5 minut w buforze TBS-T (1% (v/v) Tween-20, 140mM NaCl, 25mM Trizma, pH = 7,4 ustalone stężonym kwasem solnym), a następnie miejsca niespecyficznego wiązania blokowano przez godzinę w 5% odtłuszczonego mleku w TBS-T. Po inkubacji, membranę płukano 5 minut w TBS-T, a następnie inkubowano w chłodni przez noc z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym. Niezwiązane przeciwciało odpłukiwano pięciokrotnie przy użyciu TBS-T, a następnie membranę inkubowano godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciała drugorzędowego sprzężonego z enzymem - peroksydazą chrzanową. Wywoływano 1-3 minuty używając substratu ECL. Detekcji dokonywano przy użyciu urządzenia ChemiDoc XRS+ (Biorad). Czas ekspozycji nie przekraczał 5 minut. Intensywność prążków ustalano, używając oprogramowania ImageJ (1.47v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

7.9.6. Badanie fosforylacji kinaz JNK, p38 oraz ERK1/2

Nazwa odczynnika	Firma, numer katalogowy
Anizomycyna	Bioshop
Inhibitor ERK1/2	Cell Signalling Technology, PD98059
Inhibitor Jnk	Cell Signalling Technology, SP600125
Inhibitor P38	Cell Signalling Technology, SB203580
Staurosporyna	Sigma

Tabela 15. Odczynniki użyte do badania fosforylacji kinaz JNK, p38 oraz ERK1/2.

Po preinkubacji, do komórek K562 dodano inhibitorów kinaz JNK, p38 oraz ERK1/2. Alternatywnie, komórki inkubowano z 1% (v/v) DMSO, ze związkiem BK124 stężeniu 3 μ M albo ze staurosporyną w stężeniu 1 μ M przez 18 godzin. Komórki eksponowane na staurosporynę stanowiły pozytywną próbę kontrolną w eksperymentach dotyczących ERK1/2, natomiast kontrolę pozytywną w eksperymentach dotyczących JNK i p38 stanowiła

anizomycyna w stężeniu 20 μ M, którą dodawano na 30 minut. Zarówno izolowanie białka, jak i kolejne kroki związane z techniką Western Blot były analogiczne do tych opisanych w punktach 7.9.1 -7.10.6. Intensywność prążków mierzono przy pomocy Image Quant 5.0 software.

7.10. EKSPERYMENTY *IN VIVO*

7.10.1. Zgoda komisji bioetycznej

Na eksperymenty w modelu zwierzęcym uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa (nr referencyjne 784/2015; 25/2015; 227/2016; 641/2018; 726/2018). Badania przebiegały zgodnie z regulacjami obowiązującymi w Polsce i Unii Europejskiej odnośnie projektowania i wykonywania eksperymentów na zwierzętach.

7.10.2. Zwierzęta

Modelami w badaniach były myszy z defektem odporności:

1. Balb/cOlaHsd-Foxn1nu (Balb/c mysz naga, brak limfocytów T)
2. NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (mysz NSG, brak limfocytów T oraz B).

Myszy pochodziły z Janvier laboratories (Francja) oraz Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Hodowla prowadzona była w izolowanej zwierzętarni w Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marecelego Nenckiego PAN w Warszawie, zgodnie ze standardami SPF (ang. *Specific Pathogen Free*), z nieograniczonym dostępem do wody oraz pożywienia.

7.10.3. Farmakokinetyka i badanie toksyczności

Model szczurzy:

Związek BK124 rozpuszczony w mieszaninie 10% Solutol HS/ 10% etanol w dawce 5 i 10 mg/kg masy ciała podano pięciu szczurom Wistar. Po podaniu związku, pobierano krew od każdego szczura w punktach czasowych czasu: 5, 15, 30 minut oraz 1, 2, 6 i 24 godziny. Stężenie związku BK124 ustalono przy użyciu spektrometrii mas.

Model mysi:

Ośmiomiesięczne samice myszy Balb/c podzielono na grupy i podawano BK124 dożylnie (20 mg/kg) albo dootrzewnowo (w dawce 20 mg/kg albo 40 mg/kg). Po podaniu związku poświęcano cztery myszy w każdym punkcie czasowym: po 15 minutach oraz 6, 12 i 24

godzinach po podaniu związku. Krew, pochodzącą od kilku myszy mieszano razem i mierzono stężenie związku przy użyciu spektrometrii mas.

Toksyczny wpływ związku BK124 na narządy oceniano na podstawie zmian fizjologicznych i morfologicznych w miejscu wkłucia oraz na podstawie wyglądu narządów wewnętrznych (wątroby, serca, nerek, śledziony), wyników morfologii, pomiarów masy ciała zwierzęcia oraz jego zachowania.

7.10.4. Eksperymenty w modelu ksenotransplantacyjnym CML

Model ksenotransplantacyjny stanowiły ośmiotygodniowej samicy myszy NSG, którym podawano podskórną do fałdu grzbietowego 1×10^6 komórek K562 (ludzka przewlekła białaczka szpikowa). Końcowa objętość podawanych komórek wynosiła 100 μ l, co stanowiło 0,5% masy ciała myszy. Po trzech dniach, myszy dzielono losowo na grupy (**tabela 16**), a od czwartego do siedemnastego dnia podawano, w zależności od grupy, nośnik (kontrola wzrostu guza), związek BK124, imatinib albo hydroksymocznik. Poza imatinibem podawanym doustnie, leki (w tym związek BK124) podawano dootrzewnowo. W eksperymencie wyznaczono również kontrolę intaktową, tj. taką, w której myszom nie podawano ani związków, ani nośnika.

Codziennie monitorowano masę ciała zwierząt, a także mierzono wzrost guzów przy użyciu suwmiarki. Teoretyczną objętość guza ustalano przy użyciu równania $(a^2 \times b) \times 0,5$ [mm^3], gdzie „a” oznacza krótszą oś [mm], a „b” oś dłuższą [mm] guza. Dnia dwudziestego szóstego eksperyment kończono i pobierano krew na oznaczenie podstawowych parametrów biochemicznych oraz morfologicznych. Izolowano guzy, które następnie ważono.

Grupa	Transplant	Dawka, sposób podania	Rozpuszczalnik	Częstotliwość dawkowania	Ilość zwierząt
BK124	K562	20 mg/kg, IP	10% Solutol HS 15/ 10% etanol	1 x dziennie	8
BK124	K562	30 mg/kg, IP	10% Solutol HS 15/ 10% etanol	1 x dziennie	8
Imatinib	K562	100 mg/kg, O	Brak	1 x dziennie	12
Hydroksymocznik	K562	500 mg/kg, IP	<i>Aqua pro injectione</i>	1 x dziennie	8
BK124 + Imatinib	K562	20 mg/kg, IP 100 mg/kg, O	10% Solutol HS 15/ 10% etanol 100 mg/kg	1 x dziennie	7
Rozpuszczalnik (kontrola nośnika)	K562	400 µl/kg, IP	10% Solutol HS 15/ 10% etanol	1 x dziennie	4
Kontrola wzrostu guza	K562	-	-	-	15
Kontrola intaktowa	-	-	-	-	4

Tabela 16. Grupy eksperymentalne w badaniu cytotoksyczności związku BK124 przeciwko komórkom CML *in vivo*. Myszy NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) podzielono losowo na grupy, a następnie podawano 1 x 10⁶ ludzkich komórek linii K562 (kryza blastyczna CML) do grzbietowego fałdu skórniego. Poczynając od czwartego dnia od podania komórek, w zależności od grupy, myszy leczono przy użyciu odpowiedniego związku albo samego nośnika. W eksperymencie włączono również grupę intaktową.
Skróty: IP – podanie dootrzewnowe; O – podanie doustne

7.11. ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną wykonano używając programu GraphPad Prism wersji 9.1.0. Wszystkie eksperymenty *in vitro* wykonano w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach, a wyniki analizy przedstawiono w postaci średnia ± odchylenie standardowe lub ± błąd standardowy średnich (SEM, tam, gdzie wskazano). Eksperymenty w modelu zwierzęcym przedstawiono w postaci średnia ± błąd standardowy średniej (SEM). W badaniach przy udziale pacjentów sprawdzano normalność rozkładu przy użyciu testu Shapiro-Wilk'a, a analiza statystyczna była wykonana przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z post testem Dunnett'a. Wartości prawdopodobieństwa: * p < 0.05, ** 0.05 > p > 0.001, *** 0.001 > p > 0.0001, **** p < 0.0001.

Parametr inhibicji wzrostu guza (TGI, ang. *tumor growth inhibition*) pozwala oszacować, jaki procent guzów otrzymanych w danym wariancie jest mniejsza od guzów obserwowanych w grupie kontrolnej. TGI dla każdego wariantu eksperymentalnego liczono przy użyciu wzoru:

$$\text{TGI} = 100\% \times [1 - (\text{średnia objętość guza w grupie badanej} / \text{średnia objętość guza w kontroli wzrostu guza})]$$

W modelu szczurzym (**rycina 18**) wyliczono również 95% przedział ufności (zaznaczony na szaro) przy użyciu metody samowspornej (ang. *bootstrap resampling*) dla każdego pomiaru stężenia związku w krwi szczura w każdym punkcie czasowym.

III. Wyniki

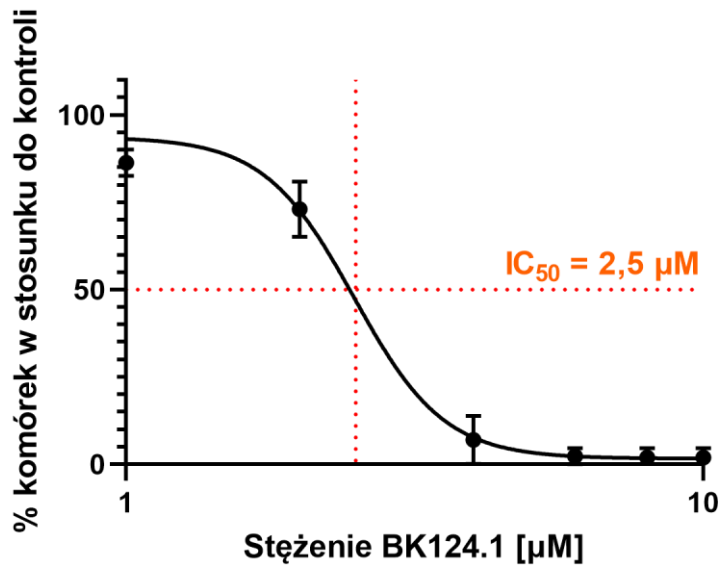
Rozdział 8. Badanie cytotoksyczności związku BK124 w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej.

W pierwszym etapie badań nad aktywnością związku BK124 wykorzystywałam głównie linię K562, pochodzącą od pacjenta w fazie kryzy blastycznej przewlekłej białaczki szpikowej. Białaczka szpikowa jest nowotworem dość homogennym i dobrze opisanym pod względem molekularnym²⁰⁰. Ponadto, linia K562 pochodzi z kryzy blastycznej, a więc etapu, na którym przewlekła białaczka staje się białaczką ostrą, a leczenie przy użyciu inhibitorów kinaz tyrozynowych staje się nieskuteczne. Te dwie cechy sprawiają, że linia komórkowa K562 stanowi dobrze scharakteryzowany model agresywnego nowotworu i może służyć jako dobry pierwszy model dla badań nad nowymi lekami.

8.1. EFEKT CYTOTOKSYCZNY ZWIĄZKU BK124 W KOMÓRKACH PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ

8.1.1. Przeżywalność komórek K562 w zależności od stężenia związku BK124

Pierwszym krokiem w moich badaniach było zweryfikowanie wcześniejszych doniesień, a także wyników wstępnych uzyskanych w trakcie badań opisanych w mojej pracy magisterskiej, dotyczących cytotoksyczności związku BK124 w komórkach K562 dla nowosyntetyzowanej partii BK124. W celu weryfikacji tych wcześniejszych danych i wyznaczenia wartości parametru IC_{50} , komórki linii K562 hodowałam w obecności BK124, we wzrastających stężeniach związku, w zakresie 0,1 – 10 μ M przez 48 godzin. Następnie średnie wartości absorbancji w poszczególnych próbkach odniosłam do kontroli zawierającej 1% DMSO (**rycina 12**). Największy efekt cytotoksyczny zaobserwowałam pomiędzy stężeniem 2 μ M ($73\% \pm 3\%$ żywych komórek) a 4 μ M ($7\% \pm 7\%$). Na podstawie pomiarów wyznaczyłam parametr IC_{50} , który wyniósł 2,5 μ M. Zaobserwowałam również, że komórki K562 potraktowane związkiem BK124 w stężeniach większych niż 4 μ M charakteryzowała bardzo niska przeżywalność (mniej niż 4%), a jej spadek był gwałtowny.

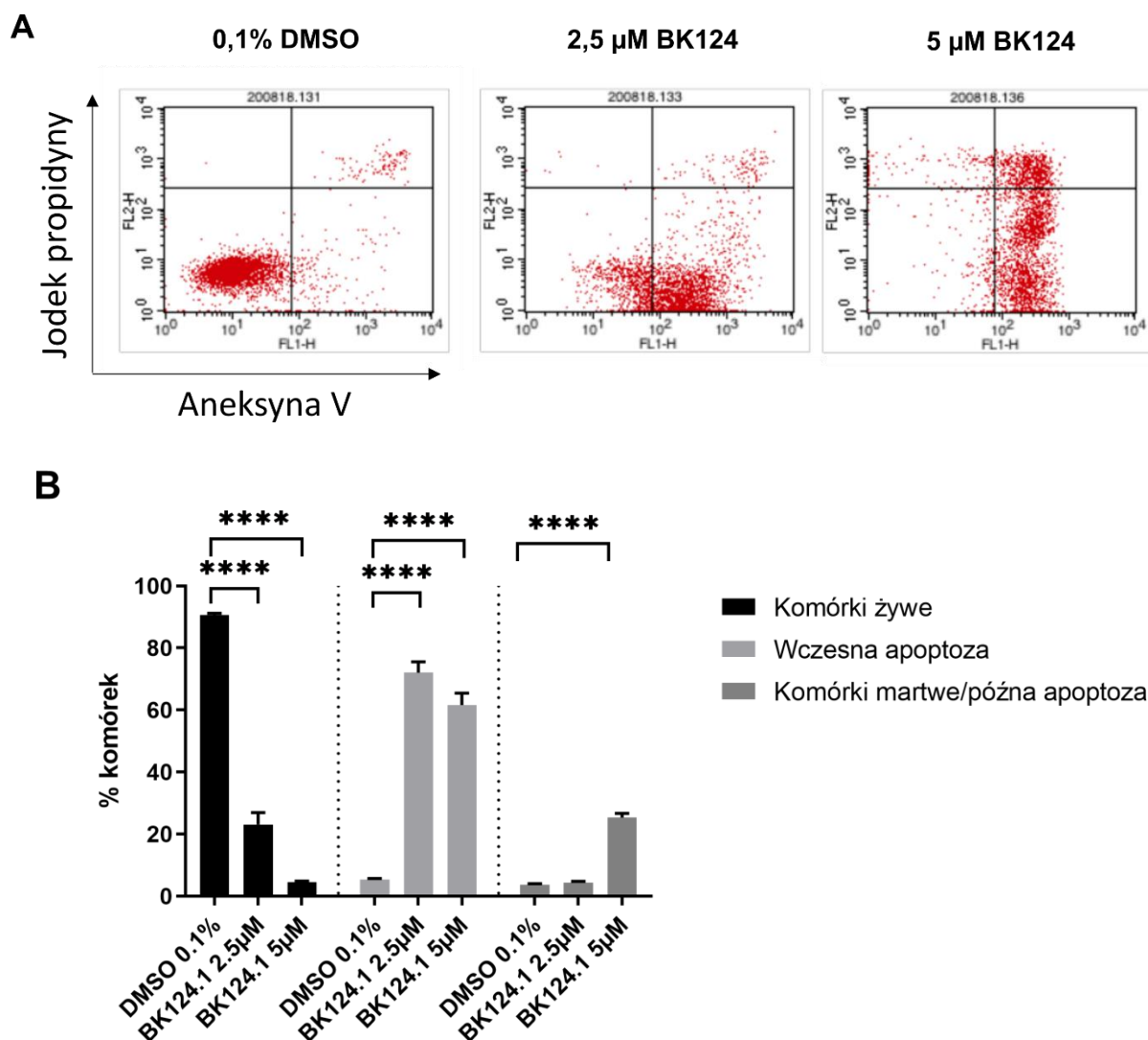


Rycina 12. Przeżywalność komórek K562 w zależności od stężenia BK124.

Komórki K562 wysiano w gęstości 5×10^3 komórek/dolek na płytce 96-ciodotkowej. Po 24 godzinach dodano różne stężenia związku BK124 rozpuszczonego w DMSO (końcowe stężenie w pożywce 1%) w zakresie od 0,1 do 10 µM. Po 48 godzinach dodawano związek MTT (jak opisano w rozdziale 6.5) i mierzano absorbancję. Uzyskane wartości wyrażono w stosunku do kontroli traktowanej samym DMSO w postaci procentowej. Dane przedstawione na wykresie obrazują zmianę przeżywalności komórek K562 w zależności od stężenia związku BK124 [µM] (ciągła czarna linia). Czerwoną przerywaną linią zaznaczono przeżywalność na poziomie 50%, odpowiadającą wartości parametru IC_{50} . Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Nazwa „BK124.1” jest tożsama z nazwą BK124.

8.1.2. Analiza apoptozy w komórkach K562

Wyniki wstępne uzyskane w pracy magisterskiej wskazywały także, że związek BK124 może indukować apoptozę w komórkach K562. W niniejszej pracy przeprowadziłam pogłębioną analizę cytometryczną i ustaliłam odsetek komórek apoptotycznych w populacji traktowanej związkiem BK124 w oparciu o barwienie komórek aneksyną V i jodkiem propidyny. Do badania użyłam związku BK124 w stężeniu 2,5 µM (odpowiadającemu stężeniu IC_{50} po 48 godzinach) oraz w stężeniu 5 µM, ponieważ dawka ta zapewniała szybką odpowiedź i wysoką śmiertelność komórek (rycina 13).



Rycina 13. Odsetek komórek na poszczególnych etapach apoptozy.

Komórki K562 wysiano jak opisano w rozdziale 6.7.1. Po 24 godzinach dodano związku BK124 w stężeniu końcowym w pożywce 2,5 i 5 μ M. Inkubowano przez 24 godziny, po czym barwiono zgodnie z zaleceniami producenta przy użyciu Aneksyny V i jodku propidyny. Na rycinie A przedstawiono reprezentatywne dot-ploty z programu CellQuest. Na grafie B przedstawiono odsetek komórek apoptotycznych jako średnią \pm SEM z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów, każdy w technicznym duplikacie. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, istotność na poziomie $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$. Nazwa „BK124.1” jest tożsama z nazwą BK124.

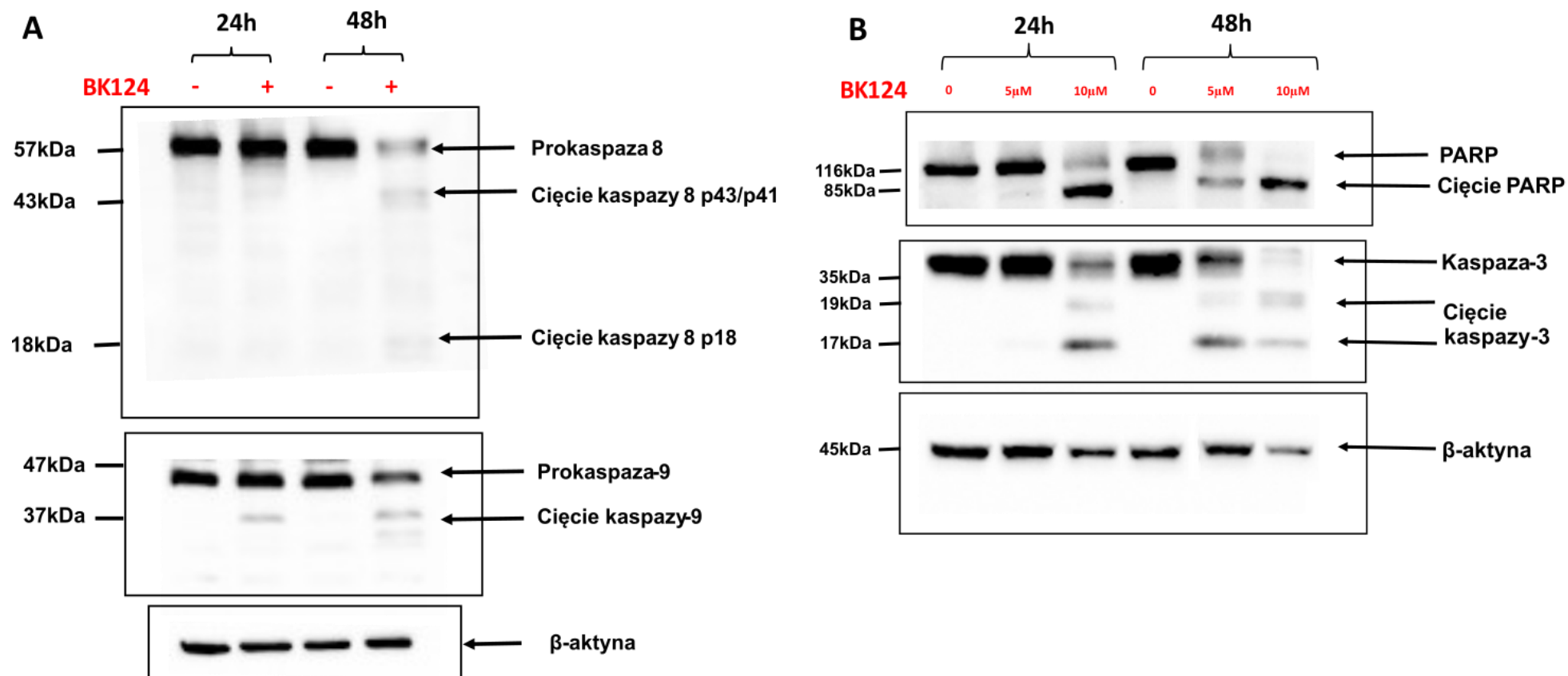
Analiza pokazała, że przy stężeniu BK124 na poziomie 2,5 μ M, po 24 godzinach jest już widoczny znaczny spadek odsetka komórek żywych (90% \pm 1% w kontroli 0,1% DMSO vs 23% \pm 4% w próbie badanej z dodatkiem 2,5 μ M BK124), wyższy niż ujawniony w teście MTT. W komórkach traktowanych 5 μ M BK124 po 24 godzinach spadek odsetka komórek żywych przekraczał 90% (4,4% \pm 0,5%).

8.2. BADANIE PROTEOLIZY PROKASPAZ 3, 8 I 9

W zdrowej komórce prokaspazy inicjatorowe 8 i 9 są ekspresowane konstytutywnie w formie monomerów. Indukcja apoptozy powoduje ich dimeryzację i powstanie aktywnych proteaz cysteinowych (kaspaz)²⁰¹. Kaspazy inicjujące poprzez cięcie proteolityczne aktywują następnie kaspazy efektorowe (kaspaza 3, 7, 6). W zależności od tego jaka izoforma prokaspazy inicjatorowej ulega proteolizie, można z pewnym prawdopodobieństwem ustalić, czy apoptoza jest indukowana zewnątrz - szlakiem receptorowym (cięcie prokaspazy 8²⁰²) czy szlakiem wewnętrznym - mitochondrialnym (cięcie prokaspazy-9²⁰³).

Wyniki mojej pracy magisterskiej wskazały na aktywację prokaspazy 3 pod wpływem związku BK124. Rozszerzając tę analizę, przeanalizowałam zatem dodatkowo cięcie proteolityczne prokaspazy 8 oraz 9 w przebiegu apoptozy wywołanej związkami BK124. Wyniki przedstawione na **rycinie 14 A** pokazują, że podczas gdy cięcie prokaspazy-9 jest widoczne już po 24 godzinach od podania związku, cięcie prokaspazy-3 oraz prokaspazy 8 jest widoczne dopiero po 48 godzinach (**rycina 14 A i B**). W tym przypadku aktywacja kaspazy 8 jest widoczna w fazie efektorowej apoptozy, co sugeruje, że nie jest to mechanizm aktywowany pierwotnie. O zaawansowaniu procesu świadczy cięcie prokaspazy-3 oraz polimerazy poli(ADP-rybozy), oznaczonej na **rycinie 14 B** jako PARP. PARP jest enzymem zaangażowanym przede wszystkim w naprawę DNA. Podczas apoptozy aktywowana kaspaza-3 hamuje aktywność naprawczą enzymu, skutkując skierowaniem maszynerii molekularnej komórki w kierunku śmierci komórkowej.

Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z poprzednimi obserwacjami pochodzącymi z testu MTT oraz analizy cytometrycznej. BK124 w stężeniu 5 μ M już po 24 godzinach doprowadza w komórkach do zaburzeń integralności błony, na co wskazuje eksternalizacja fosfatydyloseryny, wykrywana przez aneksynę V, a kaspaza-9 ulega cięciu. Oznacza to, że apoptoza została zainicjowana, chociaż nie jest to jeszcze w pełni widoczne w spadku aktywności metabolicznej (wyniki testu MTT). Po 48 godzinach inkubacji ze związkiem BK124, komórki znajdują się w zaawansowanym stanie apoptozy, co odzwierciedla się w aktywacji kaspazy-8 oraz 3, a także cięciu polimerazy PARP (**rycina 14**).



Rycina 14. Cięcie kaspaz pod wpływem BK124.

Komórki K562 były inkubowane 24 i 48 godzin ze związkiem BK124 w stężeniu 5 μM lub 10 μM. Następnie wyizolowano białko i przeprowadzono analizę typu Western blotting (WB). Na reprezentatywnej membranie WB reakcja ze specyficznymi przeciwciałami uwidoczniała kaspazę 8 lub 9 (A) oraz kaspazę 3 (B) wraz z ich formami ciętymi, świadczącymi o aktywacji obu kaspaz. Zbadano również proteolityczne cięcie enzymu PARP (B) jako wskaźnika zaawansowanej apoptozy. Jako kontrolę ilości nakładanego białka zastosowano β-aktynę. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych. Nazwa „BK124.1” jest tożsama ze związkiem „BK124” omawianym w niniejszej pracy. Immunoblot na rycinie B pochodzi z pracy magisterskiej **I. Stukan** i jest zamieszczony dla kompleksowej analizy mechanizmu apoptozy indukowanej przez BK124.

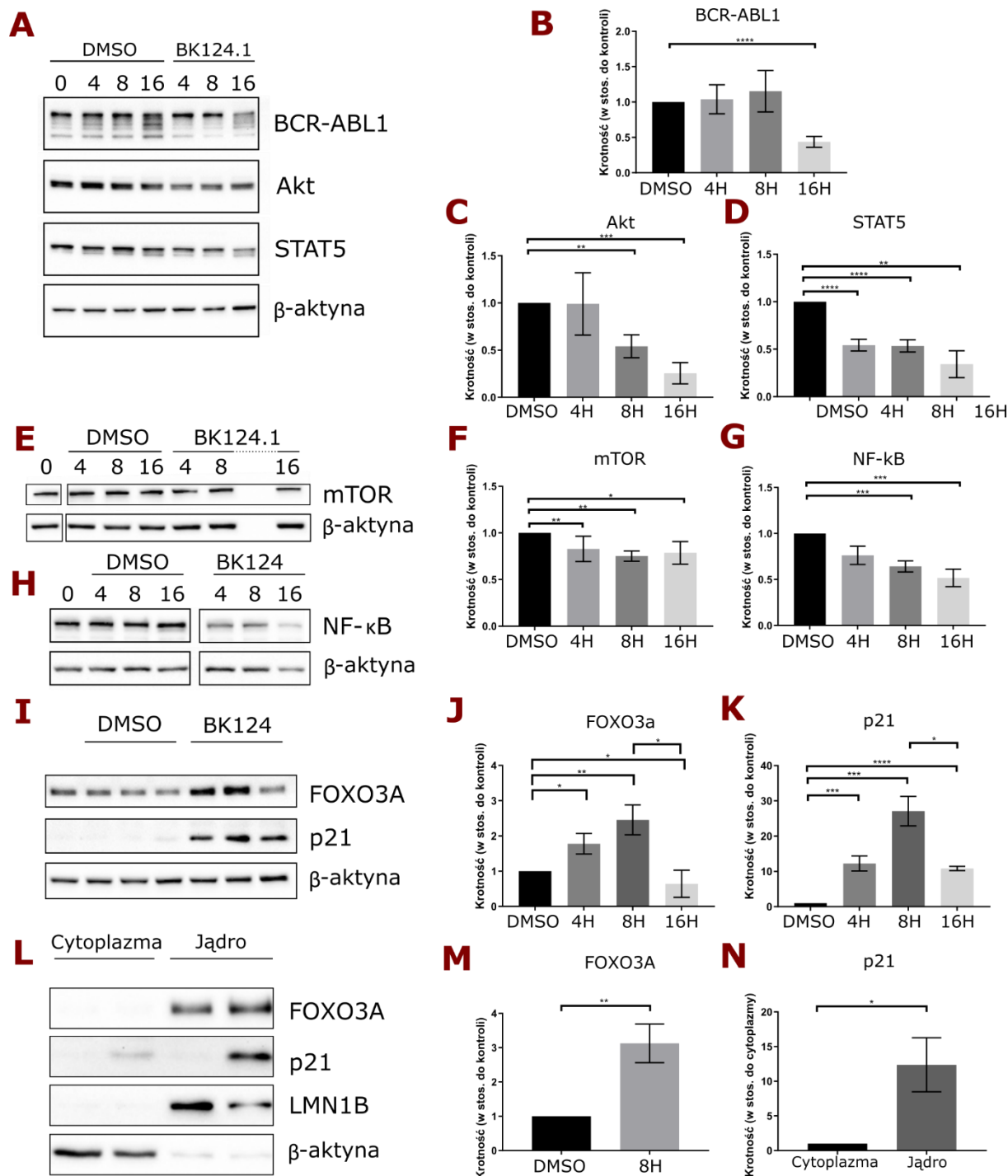
8.3. BADANIE BIAŁEK SYGNAŁOWYCH WARUNKUJĄCYCH PRZEŻYCIE KOMÓEK NOWOTWOROWYCH

8.3.1. Poziom białek szlaków onkogennych związanych z kinazą BCR/ABL1

Mechanizmy odpowiedzialne za przeżycie komórki nowotworowej są kluczowe dla przetrwania terapii nowotworowej oraz indukcji fenotypu lekoopornego. W komórce przewlekłej białaczki szpikowej są to przede wszystkim szlaki aktywowane przez kinazę BCR-ABL1, takie jak JAK/STAT, PI3K/AKT oraz mTOR/NF- κ B. Ich aktywność prowadzi do nawrotu choroby. Wyższa aktywność tych białek związana jest m.in. z ich podwyższonym poziomem w komórce.

Dlatego następnie zbadalam wpływ związku BK124 na poziom białek ważnych dla przeżycia komórki białaczki. Ponieważ we wcześniejszych eksperymentach z użyciem BK124 w stężeniu 5 μ M obserwowałam indukcję apoptozy po 24 godzinach, założyłam, że aktywacja szlaków decydujących o przeżyciu lub śmierci komórkowej musi mieć miejsce wcześniej. W związku z powyższym, lizaty komórkowe zbierałam we wcześniejszych punktach czasowych, po 4, 8 i 16 godzinach inkubacji z BK124. Wybranie kilku, następujących po sobie punktów czasowych, pozwoliło na obserwację zmiany poziomu białek w czasie traktowania związkiem.

Pierwsze zmiany w poziomie białek były widoczne już po 4 i 8 godzinach od rozpoczęcia inkubacji z BK124 - istotny statystycznie spadek poziomu białek sprzyjających przeżyciu komórki takich jak BCR-ABL1, STAT5, AKT, mTOR i NF- κ B (**rycina 15 A-G**). Spadkowi temu towarzyszył wzrost poziomu białek związanych z apoptozą takich jak p21 oraz czynnika transkrypcyjnego FOXO3a (**rycina 15I-K**). Najwyższy poziom FOXO3a oraz p21 obserwowałam po 8 godzinach od rozpoczęcia inkubacji ze związkiem, czyli właśnie w tym czasie, gdy dochodzi do indukcji apoptozy (**rycina 15 I-K**). Po 16 godzinach traktowania komórek związkiem BK124, poziom tych białek zmniejszał się, chociaż pozostawał podniesiony w stosunku do kontroli.



Rycina 15. Poziom białek związanych z przeżyciem komórki nowotworowej.

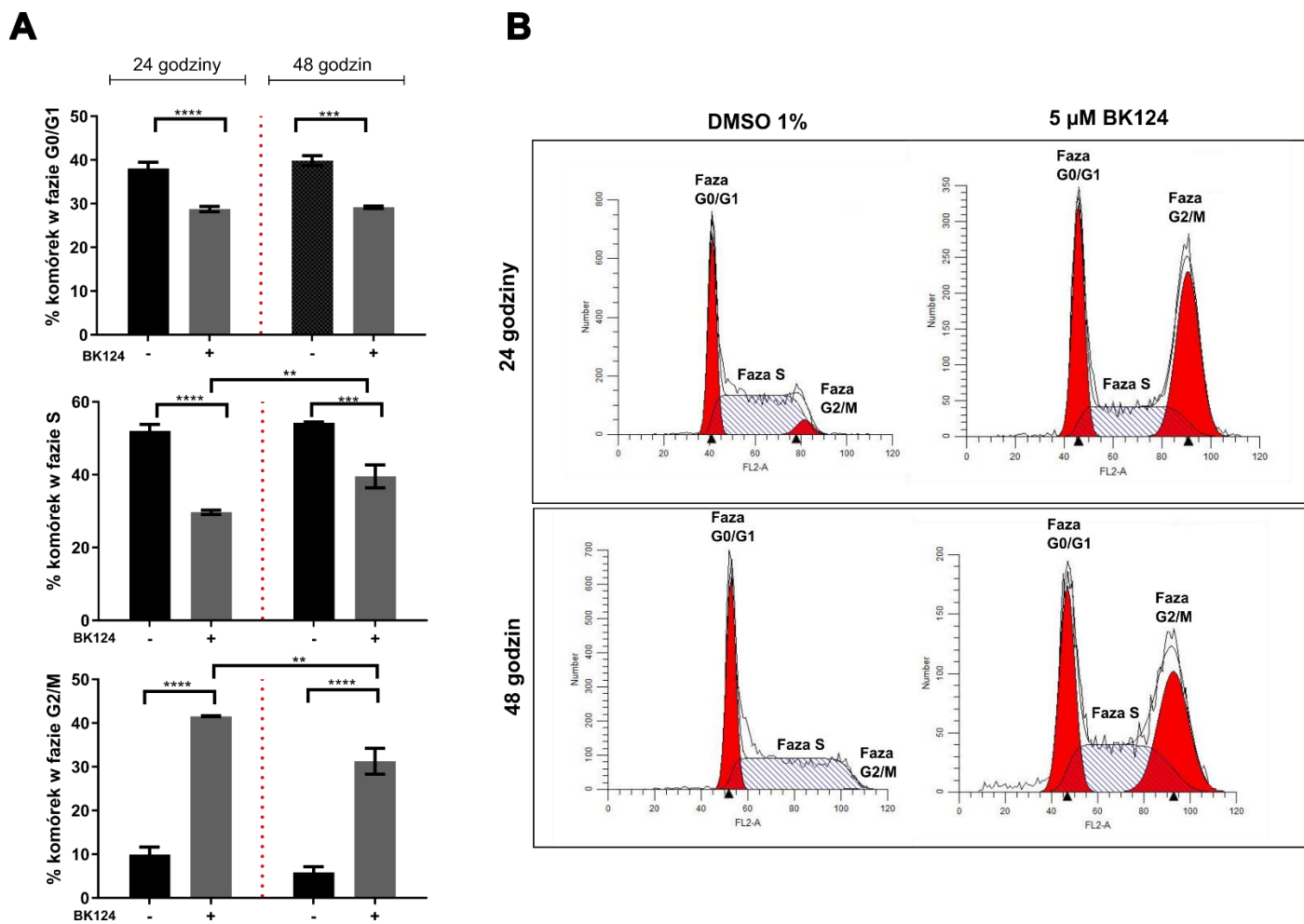
Komórki K562 inkubowano ze związkiem BK124 w stężeniu 5 μ M przez 4, 8 i 16 godzin. Po tym czasie z komórek wyizolowano białko całkowite (A-K) albo przeprowadzono subfrakcjonowanie i wyizolowano białko z frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej (M-N). Reprezentatywne immunobloty (A,E,H,I i L) pokazują poziom białek BCR-ABL1, Akt, STAT5, mTOR, NF- κ B (p65), FOXO3a i p21 zależnie od czasu inkubacji z BK124. Immunobloty poddano analizie densytometrycznej przy użyciu programu ImageJ, a wyniki przedstawiono na grafach B,C,D,F,G,J,K,M i N). Na podstawie uzyskanych wartości dokonano analizy statystycznej przy użyciu dwustronnego testu T w programie GraphPad Prism * P<0.05, ** 0.001<P<0.05, *** 0.0001<P<0.001, **** P<0.0001. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych. Nazwa „BK124.1” jest tożsama ze związkiem „BK124” omawianym w niniejszej pracy.

8.3.2. Badanie lokalizacji białka p21 oraz czynnika FOXO3a w komórce

Zarówno białko p21, jak i czynnik transkrypcyjny FOXO3a odgrywają podwójną rolę w komórkach nowotworu, zależną od lokalizacji w komórce. Przeprowadziłam zatem subfrakcjonowanie komórkowe i izolowanie białka z frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej, aby zbadać wzrost poziomu FOXO3a oraz p21 w obu frakcjach i na tej podstawie wysnuć wnioski odnośnie ich lokalizacji. Lizaty komórkowe zbierałam po 8 godzinach inkubacji ze związkiem BK124. Analiza pokazała, że wzrost poziomu białka p21 w komórkach K562 traktowanych związkiem BK124 nastąpił przede wszystkim w jądrze komórkowym (**rycina 15 L i N**). Lokalizacja jądrowa pozwala p21 na oddziaływanie między innymi z cyklinozależnymi kinazami oraz z cyklinami, co hamuje proliferację komórek. Jądrowa obecność p21 związana jest również z indukcją śmierci apoptotycznej, chociaż mechanizm nie jest do końca wyjaśniony. W jądrze komórkowym stwierdziłam również wzrost poziomu FOXO3a (**rycina 15 L i M**), który może być czynnikiem transkrypcyjnym dla związanych z apoptozą białek takich jak BIM, FasL, PUMA i TRAIL²⁰⁴. Może również inicjować transkrypcję p21. Jako że pod wpływem związku BK124 poziom AKT jest obniżony, niższy jest tym samym poziom sekwestrowania p21 i FOXO3a w cytoplazmie, dzięki czemu białka te mogą spełniać swoją antyonkogenną rolę w jądrze komórkowym.

8.3.3. Badanie cyklu komórkowego

Żeby sprawdzić, czy faktycznie p21 hamuje proliferację komórek przewlekłej białaczki szpikowej, wykonałam analizę cytometryczną przy użyciu jodku propidyny. Związek ten łączy się z DNA i umożliwia identyfikację komórek na poszczególnych etapach mitozy. Wyniki pokazały, że pod wpływem związku BK124 po 24 godzinach następuje blokada komórek na etapie G2/M cyklu komórkowego (**rycina 16**), utrzymująca się po 48 godzinach. Po tym czasie odsetek komórek w fazie G2/M okazał się niższy niż w pierwszej dobie, wzrósł natomiast odsetek komórek w fazie S. Sugerowałoby to, że część komórek w czasie 24-48 godzin mogła przejść z fazy G1 do fazy S oraz, że komórki najprawdopodobniej wchodziły w apoptozę w fazie G2/M. Rozkład faz cyklu zbadany cytometrycznie odpowiada wzrostowi poziomu jądrowego p21, widocznego w immunoblotingu, co sugeruje, że p21 faktycznie pełni swoją funkcję i hamuje proliferację komórek nowotworu.



Rycina 16. Odsetek komórek K562 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po traktowaniu związkiem BK124.

Komórki K562 były inkubowane z 5 μ M BK124 przez 24 i 48 godzin. Po tym czasie komórki utwalono przy użyciu etanolu (99%) i barwiono jodkiem propidyny, a następnie analizowano używając cytometru przepływowego oraz programu ModFit. Średni odsetek \pm SEM komórek w fazie G0/G1, S oraz G2/M przedstawiono na wykresie słupkowym (A) oraz w postaci reprezentatywnych histogramów (B). Próbkę pochodziły z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów, każdy w duplikacji technicznej. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie GraphPad Prism, używając jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z posttestem Tukey'a * $p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.05$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

8.3.4. Badanie aktywacji kinaz MAPK przez fosforylację

Kinazy JNK, p38 oraz ERK1/2 należą do grupy kinaz serynowo-treoninowych aktywowanych mitogenami. Jako że regulują odpowiedź komórkową na sygnały zewnętrzne, są często aktywowane poprzez fosforylację w odpowiedzi na stres komórkowy. W szczególności p38 i JNK odpowiadają na stres związany z obecnością cytokin, promieniowaniem ultrafioletowym, szokiem cieplnym i szokiem osmotycznym. W ramach badań przedklinicznych związku BK124 w czasie realizacji grantu NCN OPUS 8 (nr 2014/15/B/NZ7/00966) dr Karolina Królewska wykonała analizę typu Western Blotting aktywacji kinaz MAPK takich jak ERK1/2, JNK oraz p38MAPK w komórkach K562 pod wpływem dikarboksymidu BK124 w stężeniu 3 μ M (**rycina 17**). Moim zadaniem było przeanalizowanie i opracowanie uzyskanych wyników.

Kinazy MAP aktywowane są podwójną fosforylacją w obrębie motywu treonina-prolina-tyrozyna. Użyte przeciwciała rozpoznawały:

- Fosforylację na reszcie aminokwasowej w pozycji 202 (treonina) i 204 (tyrozyna) kinazy ERK1 oraz na reszcie treoniny w pozycji 185 i tyrozyny w pozycji 187 kinazy ERK2
- Fosforylację na reszcie treoniny w pozycji 183 i tyrozyny w pozycji 185 kinazy JNK
- Fosforylację na reszcie treoniny w pozycji 180 i tyrozyny w pozycji 182 kinazy p38

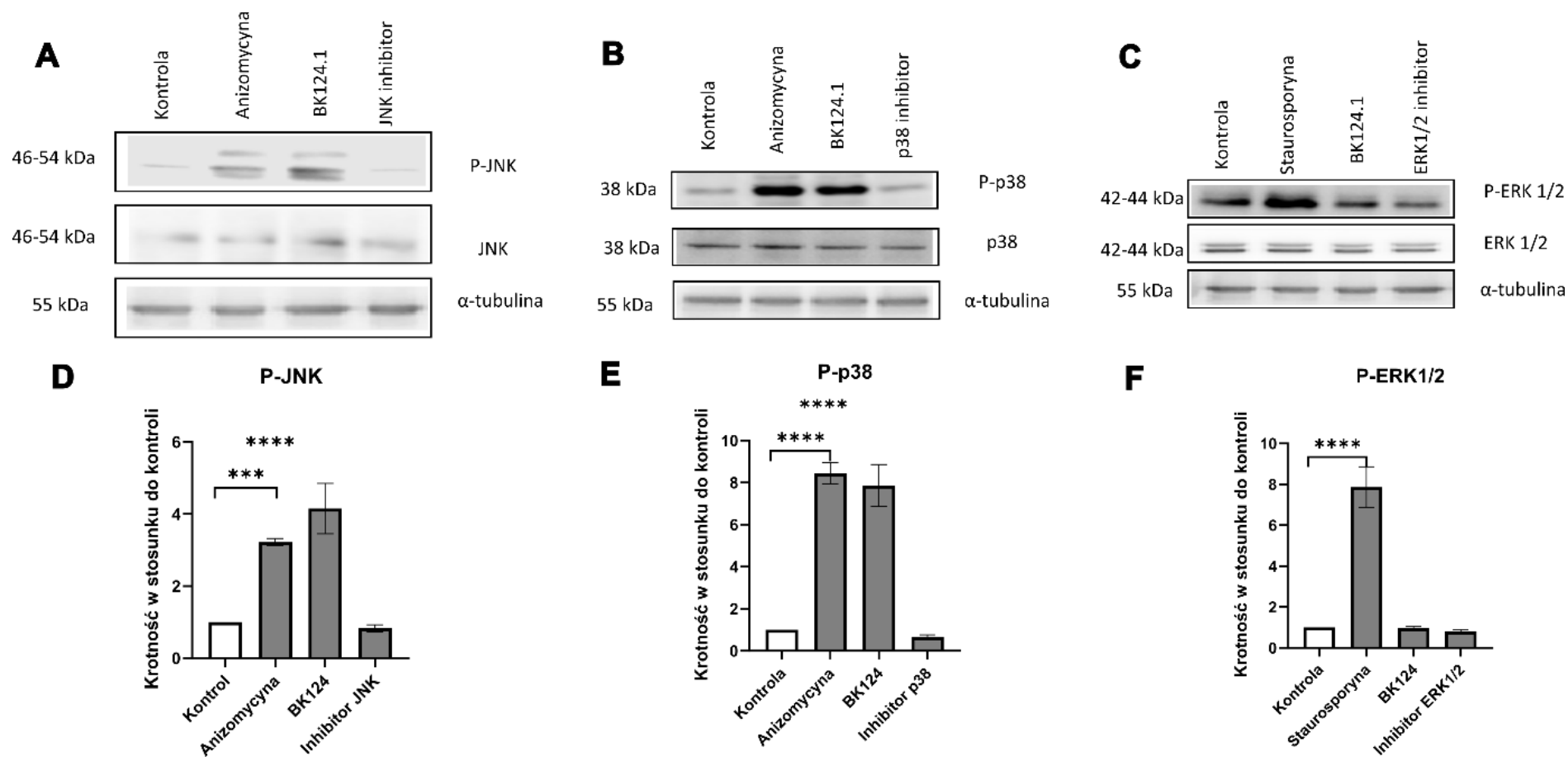
W eksperymencie jako kontroli negatywnej użyto inhibitorów poszczególnych kinaz oraz kontroli pozytywnej w postaci staurosporyny (ERK1/2) albo anizomycyny (JNK i p38). Anizomycyna jest aktywatorem p38 oraz JNK²⁰⁵. Wiąże się do podjednostki 60S rybosomu, hamując aktywność transferazy peptydylowej i wywołując w ten sam sposób stres rybotoksyczny, co skutkuje zahamowaniem translacji²⁰⁶. Staurosporyna natomiast jest niespecyficznym inhibitorem kinaz białkowych. Jako że posiada silne powinowactwo do domeny wiążącej ATP w kinazie, uniemożliwia wiązanie substratu, a w konsekwencji indukuje apoptozę w komórce²⁰⁷. Związek ten jest też silnym inhibitorem białka PKC (ang. *protein kinase C*, kinaza białkowa C), który reguluje fosforylację ERK1/2²⁰⁸.

Inhibitory, użyte w eksperymencie, to jest SP600125 (selektywny inhibitor JNK) oraz SB203580 (selektywny inhibitor p38) w inhibicji kompetycyjnej blokują miejsca wiązania ATP^{209,210}. PD98059 jest wysoce selektywnym inhibitorem MEK1 oraz MEK2. Poprzez oddziaływanie z ERK1/2 uniemożliwia fosforylację.

Komórki K562 inkubowano 24 godziny w zależności od wariantu: z dodatkiem DMSO w stężeniu końcowym 1% (kontrola), z dodatkiem odpowiednio anizomycyny albo

staurosporyny (kontrola pozytywna), z dodatkiem inhibitora (kontrola negatywna) albo z dodatkiem BK124 w stężeniu 3 μ M (stężenie końcowe DMSO 1% v/v).

W obecności związku BK124 zaobserwowano istotny statystycznie wzrost fosforylacji kinazy JNK (wzrost ponad 4-krotny; **rycina 17 A i D**) i p38 (prawie 8-krotny; **rycina 17 B i E**), podobnie jak w kontroli pozytywnej z dodatkiem anizomycyny (odpowiednio 8,5-krotny oraz ponad 3-krotny). Pod wpływem związku BK124 nie zmieniła się natomiast fosforylacja ERK1/2 (**rycina 17 C i F**). Sugeruje to, że aktywacja kinaz p38 i JNK bierze udział w indukcji apoptozy w komórkach K562. Aktywne kinazy ERK1/2 stymulują proliferację i różnicowanie się komórek, zatem, zgodnie z przewidywaniami, inkubacja z BK124 nie powoduje wzrostu poziomu fosforylowanej formy tych kinaz.



Rycina 17. Wpływ związku BK124 na aktywację szlaków MAPK.

Komórki K562 były inkubowane przez 24 godziny z dodatkiem 1% DMSO v/v (kontrola), BK124 w stężeniu 3 μ M, anizomycyną (aktywator kinaz JNK oraz p38; kontrola pozytywna) albo staurosporyną (aktywator ERK1/2; kontrola pozytywna), a także (w zależności od badanej kinazy) z inhibitorem JNK, p38 albo ERK1/2 (kontrola negatywne). Następnie, izolowano białko całkowite i wykonywano analizę typu Western Blot. Reprezentatywne immunobloty obrazują poziom fosforylacji kinazy JNK (A), p38 (B) oraz ERK1/2 (C). Wszystkie wyniki poddano analizie densytometrycznej zobrazowanej na grafach D-E. Próbkę pochodziły z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów, każdy w duplikacie technicznym. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie GraphPad Prism, używając jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA * $p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.05$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Rozdział 9. Badanie podstawowej farmakokinetyki i cytotoksyczności związku BK124 w modelu zwierzęcym

9.1. BADANIE FARMAKOKINETYKI ZWIĄZKU BK124 W MODELU SZCZURZYM ORAZ MYSIM

Kontynuując badania nad efektywnością związku BK124 w przewlekłej białaczce szpikowej, postanowiono zbadać aktywność związku w modelu zwierzęcym. Pierwszym krokiem było ustalenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych związku, a tym samym optymalnej dawki, częstości oraz drogi podania związku. Farmakokinetyka pozwala ocenić możliwość dotarcia badanej substancji w wymaganym stężeniu i czasie do komórek nowotworowych, a także absorpcję, dystrybucję, metabolizm i wydalanie związku w organizmie. Wartości poszczególnych parametrów zależą od rodzaju substancji, ale również metabolizmu oraz indywidualnych cech pacjenta takich jak wiek, a także ogólny stan zdrowia, w szczególności stan nerek i wątroby.

Skupiono się na ustaleniu następujących parametrów farmakokinetycznych:

- Stężenie **C₀ (ng/mL)** – parametr ten określa maksymalne stężenie związku w surowicy; wartość ekstrapolowana do t₀ na podstawie wykresu utworzonego z zebranych pomiarów.
- Okres **t_{1/2} (h)** – okres półzycia lub półtrwania związku we krwi; czas, w jakim stężenie danego związku w organizmie spada o połowę w stosunku do początkowego stężenia. Parametr ten pozwala przewidzieć jak długo badana substancja będzie działała w organizmie, jest zatem kluczowy, żeby ustalić optymalne dawkowanie oraz częstość podawania. Im dłuższy okres półtrwania, tym rzadziej trzeba podawać badaną substancję.
- Średni czas przebywania w organizmie **MRT_{last} (h)** – wskaźnik ten odnosi się do średniego czasu, jaki substancja pozostaje we krwi po podaniu ostatniej dawki leku. Na podstawie tego parametru można ocenić, jak długo działa lek po podaniu ostatniej dawki. Jest szczególnie cenny dla związków, które posiadają długi okres półtrwania.
- Klirens **CL (L/h/kg)** – klirens odnosi się do zdolności organizmu do całkowitego usunięcia substancji z krwi (efektywnej eliminacji) w określonym czasie. Pozwala zatem

przewidzieć, jak szybko badana substancja zostanie usunięta. Niska wartość $Cl_{oznacza}$, że eliminacja substancji jest powolna (do eliminacji trzeba dużej objętości krwi), a w konsekwencji dawkowanie może wymagać dostosowania u pacjenta z zaburzeniami czynności nerek lub wątroby.

- Objętość dystrybucji w stanie równowagi **V_{ss} (L/kg)** – jest to parametr określający pozorny objętościowy rozkład leku w organizmie, gdy osiągnięta zostaje równowaga między stężeniem leku we krwi a stężeniem leku w tkankach i płynach ustrojowych. Oznacza to, że V_{ss} jest miarą, jak rozległe (teoretyczna przestrzeń w litrach) lek rozprzestrzenia się w organizmie po podaniu dawki. Im wyższe V_{ss} , tym wyższa tendencja do rozprzestrzeniania się poza krążeniem. Na przykład, średnia wartość V_{ss} dla imatinibu to 1,3 l/kg, paklitakselu to 2,7 – 4,3 l/kg²¹¹, a 5-fluorouracylu 0,6 – 0,8 l/kg²¹².
- Obszar pod krzywą **AUC** - parametr AUC odnosi się do obszaru pod krzywą stężenia od czasu dla badanej substancji, pozwala ocenić ekspozycję na lek. Wartość AUC można obliczyć na podstawie pomiarów stężenia leku we krwi lub innym płynie ustrojowym, które są wykonywane w określonych punktach czasowych po podaniu leku. Obliczenie AUC opiera się na interpolacji między punktami czasowymi pomiarów i może być dokonywane za pomocą różnych metod, takich jak metoda trapezowa.
 - **AUC_{last} (h·ng/mL)** – parametr mierzy całkowitą ekspozycję na lek od momentu podania do ostatniego pomiaru stężenia związku w surowicy.
 - **AUC_∞ (h·ng/mL)** - parametr odnosi się do obszaru pod krzywą stężenie-czas dla leku do „nieskończoności”, tj. czasu, gdy stężenie leku jest praktycznie niewykrywalne w surowicy. Oznacza to, że AUC_∞ mierzy całkowitą ekspozycję na badaną substancję.
 - **AUC_{last} (h·kg·ng/mL/mg)** oraz **AUC_∞ (h·kg·ng/mL/mg)** – parametry znormalizowane do dawkę nominalną w mg związku na kg masy ciała zwierzęcia. Normalizacja AUC przez dawkę nominalną w mg/kg pozwala na porównanie ekspozycji na lek między zwierzętami o różnych masach ciała, biorąc pod uwagę stosowaną dawkę leku na jednostkę masy. Normalizacja odbywa się poprzez podzielenie uzyskanych wartości AUC przez dawkę nominalną badanej substancji podanej zwierzęciu, wyrażoną w miligramach i podzielić przez masę ciała zwierzęcia w kilogramach (AUC/mg/kg).

BK124 nie może być podany myszy w DMSO. W wyniku pracy naszego zespołu, a w szczególności dra Mikołaja Zdioruka oraz dra Marka Gryzika zbadano rozpuszczalność i stabilność BK124 w roztworach wodnych i opracowano formułę związku (tabela 17), umożliwiającą dalsze badania w modelu zwierzęcym. Związek BK124 okazał się być rozpuszczalny i stabilny między innymi w nietoksycznej mieszance 10% Solutolu HS oraz 10% etanolu w soli fizjologicznej.

Rozpuszczalnik	Formulacja	Komentarz
Woda	0.9% NaCl	nierozpuszczalne
	10% etanol w 0.9% NaCl (aq)	nierozpuszczalne
Cyklodekstryna	α -cyklodekstryna w wodzie	nierozpuszczalne
	β - cyklodekstryna w wodzie	nierozpuszczalne
	γ - cyklodekstryna w wodzie	nierozpuszczalne
DMSO	DMSO 100%	rozpuszczalne/stabilne
	DMSO < 100% w wodzie	nierozpuszczalne
Surfaktant	20% Solutol HS 15 w 0.9% NaCl	nierozpuszczalne
	20% Solutol HS 15 w PBS	nierozpuszczalne
	20% Solutol HS 15, 10% etanol w 0.9% NaCl (aq)	rozpuszczalne/stabilne
	10% Solutol HS 15, 10% etanol w 0.9% NaCl (aq)	rozpuszczalne/stabilne

Tabela 17. Badanie rozpuszczalności i stabilności związku BK124 w roztworach wodnych.

Ze względu na niewielką rozpuszczalność w wodzie, w trakcie syntezy oraz w badaniach w modelu komórkowym, związek BK124 był rozpuszczalny w DMSO. Aby przejść do badań w modelu zwierzęcym, należało zatem znaleźć odpowiednią formułę, umożliwiającą nietoksyczne podanie związku BK124 zwierzęciu. W tym celu rozpuszczano związek w różnych rozpuszczalnikach. Tabela przedstawia rozpuszczalniki, formułę i efekt (rozpuszczalny/nierozpuszczalny). Pogrubieniem zaznaczono te mieszanki, w których związek okazał się być rozpuszczalny/stabilny.

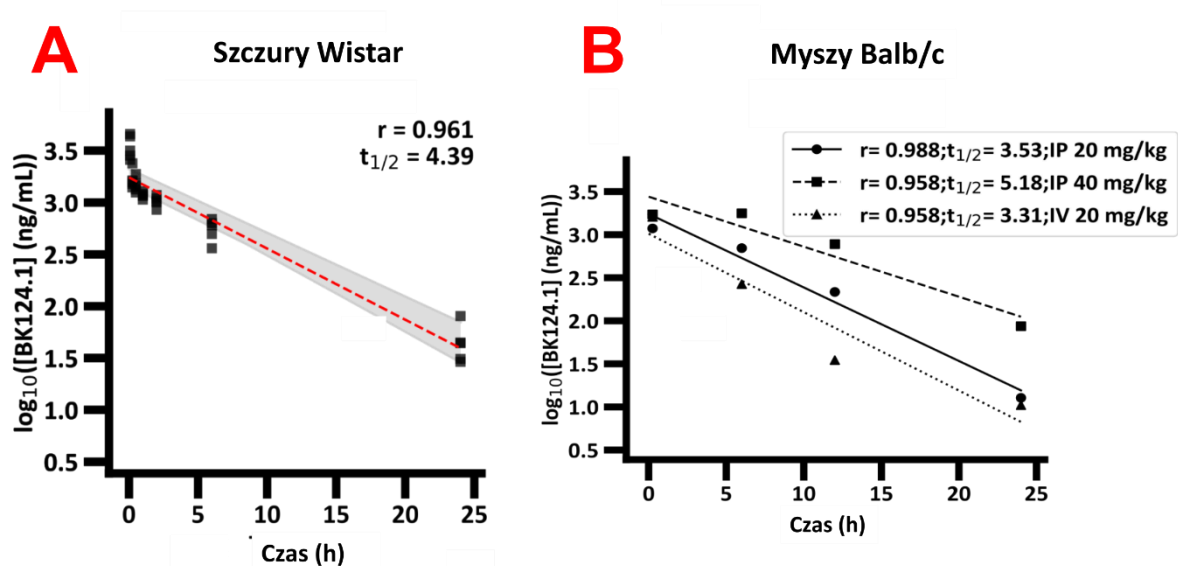
W celu ustalenia drogi podania, farmakokinetyki związku we krwi oraz nietoksycznego stężenia związku do dalszych testów *in vivo*, BK124 podano dożylnie szczurom Wistar oraz myszom Balb/c (odpowiednio **rycina 18 A i B**). Eksperymenty w modelu zwierzęcym były wykonane przez dra Marka Gryzika, analizę wyników farmakokinetycznych wykonał dr Andrew Want, natomiast ja uczestniczyłam w analizie i końcowym opracowaniu tych wyników.

Analiza farmakokinetyczna w modelu szczurzym wykazała, że po podaniu dożylnym BK124 w stężeniu 10 mg/kg związek jest wykrywany we krwi obwodowej przez 24 godziny, a dynamika spadku jego stężenia jest stała. Sugeruje to, że związek jest stabilny we krwi i usuwany z organizmu stopniowo. Okres półtrwania związku $t_{1/2}$ we krwi wyniósł 4 godziny 23 minuty u szczura (**rycina 18 A**), przy czym nie stwierdzono symptomów toksyczności związku.

W modelu mysim jednak dożylnie podanie związku BK124 w stężeniu 20 mg/kg powodowało lokalne podrażnienie w okolicy ogona. W związku z tym w kolejnym eksperymencie zbadano, czy związek może być podawany dootrzewnowo w dawce 20 mg/kg masy ciała oraz 40 mg/kg masy ciała (**rycina 18 B**). Przy tak podanym związku obie dawki wykazywały okres półtrwania

($t_{1/2}$) odpowiednio 3 godziny 32 minuty oraz 5 godzin 11 minut (**tabela 18**). Wyższa dawka związku podana myszy dootrzewnowo wywoływała jednak efekt toksyczny, stwierdzony na podstawie znacznego ubytku masy ciała oraz zmienionego wyglądu organów wewnętrznych. Postanowiono zatem w dalszych badaniach stosować niższą dawkę związku BK124 (tj. 20 mg/kg masy ciała) i podania dootrzewnowe.

U myszy związek BK124 pozostawał wykrywalny we krwi (parametr MRT) zarówno po podaniu dożylnym w dawce 20 mg/kg, jak i dootrzewnowym w dawce 20 mg/kg średnio prawie pięć godzin (odpowiednio 4 godziny 47 minut oraz 5 godzin 5 minut). W przypadku podania dootrzewnowego BK124 w stężeniu 40 mg/kg, związek był wykrywany we krwi po ponad siedmiu godzinach (dokładnie 7 godzin 29 minut).



Rycina 18. Profil farmakokinetyczny związku BK124 w modelu szczurzym (A) oraz mysim (B).

Związek BK124 podany był dożylnie (10 mg/kg) szczurom rasy Wistar (A) oraz dożylnie (20 mg/kg) albo dootrzewnowo (40 mg/kg lub 20 mg/kg) myszom szczepu Balb/c (B). Pomiar stężenia związku we krwi prowadzono przy użyciu spektrometrii mas.

Na wykresie A każdy punkt odpowiada pomiarom z $n=3$ szczurów. Od każdego osobnika pobierano krew po 5 min., 15 min., 30 min., 1 godzinie, 2 godzinach, 6 godzinach i 24 godzinach po jednorazowym podaniu zatrzyku.

Na wykresie B pojedynczy punkt oznacza pomiar pochodzący z jednej myszy. Po 15 min, 6 godzinach, 12 godzinach i 24 godzinach po jednorazowym podaniu BK124 poświęcano mysz (4 myszy na punkt czasowy) i pobierano krew. Linia oznacza średnią wartość \log_{10} (stężenie BK124).

Obszar zaznaczony na szaro (A) obrazuje 95% przedział ufności wyliczony przy użyciu metody samowspornej (ang. *bootstrap resampling*) dla każdego pomiaru stężenia związku we krwi szczura w każdym punkcie czasowym.

Skróty/wyrazy anglojęzyczne: r – współczynnik regresji liniowej; $t_{1/2}$ – okres półzycia; IV - *intravenous*, podanie dożylnie; IP – *intraperitoneal*, podanie dootrzewnowe

Pełna krew, samica myszy Balb/c			
Droga podania →	Dożylna	Dootrzewnowa	Dootrzewnowa
Dawka (mg/kg)	20 ^a	20 ^a	40 ^a
C ₀ (ng/mL)	1024	1740	2759
t _{1/2} (h)	3.31	3.53	5.18
MRT _{last} (h)	4.78	5.09	7.48
CL (L/h/kg)	0.0604	0.0418	0.0341
CL (L/h/m ²)	2,34	1,50	1,23
V _{ss} (L/kg)	0.391	0.23	0.29
AUC _{last} (h·ng/mL)	50.10	64.86	647.26
AUC _∞ (h·ng/mL)	6618	9579	23480
AUC _{last} ^b (h·kg·ng/mL/mg)	2.50	3.24	16.18
AUC _∞ ^b (h·kg·ng/mL/mg)	331	479	587

^a Nośnik: 10% Solutol HS 15/10% ethanol in H₂O
^b Dawka normalizowana poprzez podzielenie parametrów przez dawkę nominalną w mg/kg

Tabela 18. Kluczowe parametry farmakokinetyczne związku BK124 w modelu myszy Balb/c.

Kluczowe parametry farmakokinetyczne w myszy Balb/c wyznaczone po podaniu dożylnym (IV) albo dootrzewnowym (IP) związku BK124 w stężeniu 20 lub 40 mg/kg masy ciała.

Skróty: C₀: maksymalne stężenie surowicy ekstrapolowane do t = 0; t_{1/2}:okres półzycia; MRT_{last}: średni czas, który związek pozostaje w krwioobiegu, kalkulowany na podstawie ostatniego obserwowalnego punktu w czasie; CL: klirens; V_{ss}: objętość dystrybucji w stanie równowagi; AUC_{last}: obszar pod krzywą kalkulowany w stosunku do ostatniego obserwowalnego punktu czasu; AUC_∞: obszar pod krzywą, ekstrapolowany do nieskończoności

Klirens BK124 przy podaniu dożylnym jest większy niż przy podaniu dootrzewnowym. Dzieje się tak najprawdopodobniej, ponieważ przy podaniu dożylnym substancja jest od początku w krwioobiegu, skąd łatwiej ją usunąć z organizmu, np. wraz z moczem. Wartości klirensu wachają się między 2,34 l/h/m² a 1,23 l/h/m², co oznacza, że związek BK124 jest wolno metabolizowany. Dla porównania, klirens winkrystyny wynosi około 5-10 l/h/m², paklitakselu 20-30 l/h/m², a imatinibu 10-20 l/h/m², nie uwzględniając różnic w drodze podania.

Parametr V_{ss} jest dość niski, co świadczy o niewielkiej dystrybucji związku w organizmie. BK124 działa zatem lokalnie w miejscu podania albo w granicach krwioobiegu przy podaniu dożylnym. Przy podaniu dożylnym parametr V_{ss} jest odpowiednio wyższy niż przy podaniu dootrzewnowym (0,391 L/kg vs 0,23 L/kg i 0,29 L/kg odpowiednio dla BK124 w dawce 20 mg/kg oraz 40 mg/kg).

Na podstawie badań ustalono, że optymalnie związek BK124 należy rozpuścić w mieszaninie 10% Solutolu HS oraz 10% etanolu w soli fizjologicznej, a następnie podawać w dawce 20 mg/kg masy ciała podaniem dootrzewnowym. Z uwagi na długi czas MRT, ustaliliśmy częstość podania raz dziennie.

9.2. BADANIE CYTOTOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKU BK124 W MYSIM MODELU KSENOTRANSPLANTACYJNYM

Kolejnym etapem było zbadanie cytotoxycznosci związku w modelu *in vivo*, uzysknym poprzez przeszczepienie zastrzykiem podskórnym ludzkich komórek K562 do myszy NSG (ang. NOD scid gamma). Mysz NSG charakteryzuje się brakiem funkcjonalnego układu odpornościowego (brak dojrzałych limfocytów T i B oraz komórek NK), nie odrzuca zatem międzygatunkowego przeszczepu podskórnego.

Kontrolą leczenia w eksperymencie były dwa leki stosowane w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej – imatinib (lek pierwszej linii) oraz hydroksymocznik (podstawowy lek cytoredukcyjny w leczeniu białaczek przed pełną diagnozą). Opis grup eksperymentalnych zwierząt, ich liczebność oraz schemat podań zostały zawarte w sekcji Materiały i Metody (punkt 7.3.1 oraz 7.10.1-7.10.4).

Poza kontrolą leczenia, w eksperymencie użyliśmy trzech rodzajów kontroli – myszy bez guza i bez leczenia, myszy nastrzykniętych komórkami K562 (kontrola wzrostu guza) oraz myszy nastrzykniętych komórkami K562 i nośnikiem związku (tj. mieszaniną 10% Solutol HS/10% etanol; kontrola nośnika).

Po podskórnym podaniu 10^6 komórek K562, guz rósł eksponencjalnie w myszach kontrolnych (kontrola wzrostu guza), osiągając maksymalne rozmiary 25-tego dnia po inokulacji. Dnia 26 zakończono eksperyment. W odpowiednich grupach podawano związki podawano od czwartego do siedemnastego dnia po inokulacji.

Między kontrolą intaktową a kontrolą nośnika nie znaleziono istotnych statystycznie różnic w rozmiarze guza, co oznaczało, że sama mieszanina 10% Solutol HS/10% etanol nie działa cytotoxycznie na komórki guza.

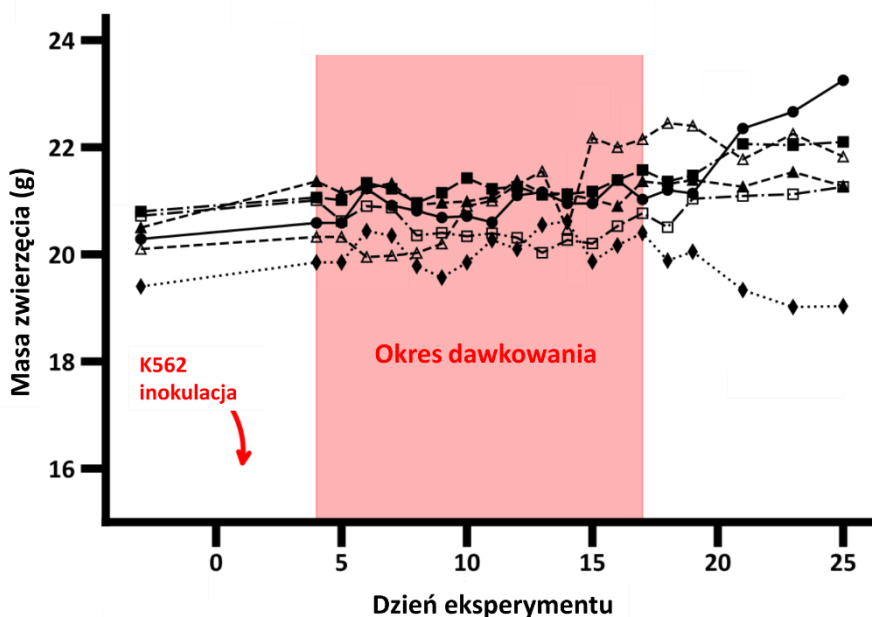
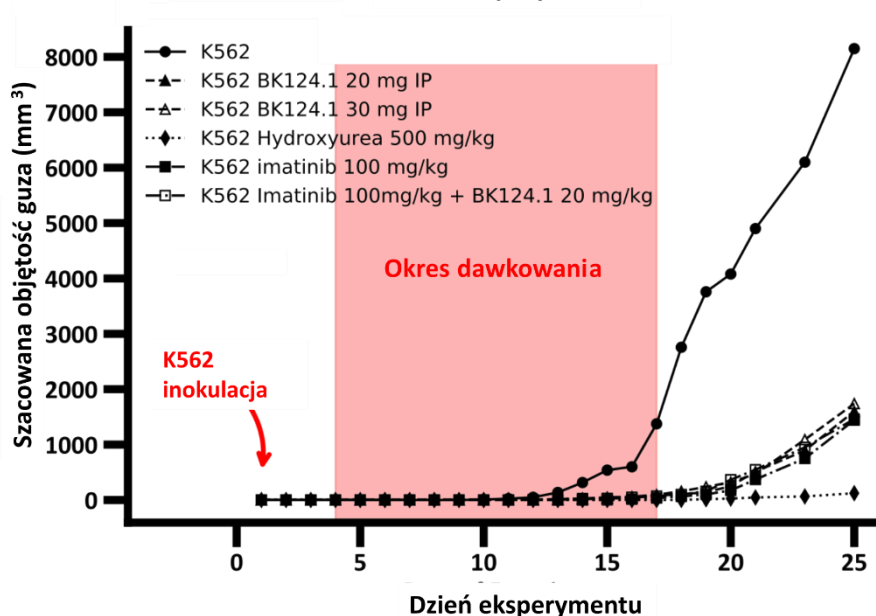
Natomiast podawanie związku BK124 w dawce 20 mg/kg masy ciała skutkowało istotnym zmniejszeniem rozmiarów ksenotransplantu, porównywalnym z efektem uzyskanym w myszach leczonych samym imatinibem albo hydroksymocznikiem. Zastosowanie związku BK124 i imatinibu jednocześnie nie poprawiało efektu terapeutycznego w stosunku do monoterapii (**rycina 19B**).

Efekt zmniejszenia guza widać również na wykresie masy zwierząt – myszy w grupach kontrolnych stawały się w trakcie eksperymentu coraz cięższe, podczas gdy takiego wzrostu nie widać było u myszy leczonych imatinibem i BK124. W przypadku hydroksymocznika, zwierzęta zaczęły intensywnie tracić na masie począwszy od dnia 19 (**rycina 19A**). Jako że

utrata masy przekraczała spodziewaną redukcję rozmiarów nowotworów, najprawdopodobniej był to efekt toksyczny działania hydroksymocznika. Dawka hydroksymocznika użyta w eksperymencie przekraczała dawki stosowane klinicznie u pacjentów (500 mg/kg w eksperymencie i 40 mg/kg u pacjentów), ponieważ celem było uzyskanie maksymalnych efektów terapeutycznych w krótkotrwałej terapii (szybko rosnący guz), a hydroksymocznik stanowił kontrolę pozytywną.

Zwierzęta potraktowane związkiem BK124 nie wykazywały istotnych zmian w morfologii czy wadze narządów wewnętrznych takich jak wątroba, śledziona, nerki, płuca i serce (**tabela 19**).

Także wyniki badania morfologii ich krwi nie odbiegały od normy (**tabela 20**).

A**B**

Rycina 19. Wyniki badania cytotoksyczności związku BK124 w mysim modelu ksenotransplantacyjnym.

Myszy NSG zaszczepiono ludzkimi komórkami kryzy blastycznej przewlekłej białaczki szpikowej K562. Trzy dni po nastryknięciu komórkami, rozpoczęto podawanie związków: BK124 (20 i 30 mg/kg), hydroksymocznik (500 mg/kg), imatinib (100 mg/kg) albo mieszaniny BK124 (20 mg/kg) z imatinibem (100 mg/kg). Poza imatinibem, który był podawany doustnie, związki podawano zastrzykiem dootrzewnowym. Różowym tłem oznaczono dni, w których myszy były nastrykiwane związkami. Po 26 dniach myszy poświęcono i zebrano materiał. **Wykres A** przedstawia średnie masy ciała zwierząt w trakcie trwania eksperymentu, podczas gdy **wykres B** przedstawia średnie teoretyczne objętości guzów w poszczególnych wariantach eksperymentalnych. Wzór na obliczenie szacowanej masy guza został opisany w materiałach i metodach punkt 7.10.4.

Skróty/wyrazy angielskie: IP – podanie dootrzewnowe;

Parametr	Kontrola intaktowa	Kontrola wzrostu guza	BK.124		Imatinib	BK.124 + imatinib	HU
Dawka (mg/kg)	-	-	20	30	100	20 + 100	500
Wątroba (g)	1.21±0.13	1.07±0.16	1.09±0.10	1.27±0.11	1.12±0.21	1.12±0.09	1.16±0.13
Mózg (g)	0.47±0.02	0.46±0.02	0.47±0.02	0.47±0.01	0.47±0.02	0.47±0.01	0.46±0.02
Nerki (g)	0.28±0.01	0.26±0.03	0.26±0.03	0.28±0.02	0.29±0.05	0.29±0.06	0.27±0.04
Śledziona (g)	0.01±0.00	0.01±0.00	0.03±0.02	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.05±0.01
Płuca (g)	0.24±0.00	0.28±0.08	0.24±0.10	0.34±0.02	0.27±0.06	0.30±0.08	0.25±0.08
Serce (g)	0.50±0.57	0.10±0.02	0.10±0.00	0.10±0.02	0.11±0.02	0.12±0.01	0.11±0.03
Masa guzów (g)	-	9.2±2.1	1.6±1.6	1.9±1.8	2.5±2.3	2.1±1.6	1.8±0.9
Masa myszy (g)	22.5±0.8	25.4±2.7	22.3±0.8	21.8±1.5	22.5±1.8	20.3±1.4	20.3±1.4

Tabela 19. Masa i rozmiary narządów wewnętrznych myszy w zależności od metody leczenia.

Myszom po ksenotransplantacji komórek K562 podawano leki w sposób ciągły przez 14 dni. Po tym czasie organy wyizolowano i ważono. Wyniki podane w postaci średnia ± odchylenie standardowe. Dane pochodzą od co najmniej czterech zwierząt w każdej grupie. W porównaniu do kontroli, zwierzęta traktowane związkiem BK124 nie wykazywały różnic w morfologii i wadze narządów wewnętrznych. Skrót HU oznacza hydroksymocznik.

Parametr (Zakres normy)	Kontrola intaktowa	Kontrola wzrostu guza	BK.124		Imatinib	BK.124 + Imatinib	Hydroksymocznik
Dawka	-	-	20 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	20 + 100 mg/kg	500 mg/kg
WBC (10 ³ /μL) (3.0-15)	4.7±0.4	17.0±5.2	14.9±4.7	10.5±5.0	4.1±2.4	8.3±5.0	8.1±4.3
RDW (%) (11.5-14.5)	12.9±0.2	13.7±0.2	13.1±0.4	12.9±0.1	12.5±0.3	12.7±0.2	17.3±0.6
RBC (10 ⁶ /μL) (5.0-12)	7.9±0.4	6.9±0.2	7.1±0.4	7.9±0.2	8.3±0.8	8.1±0.5	6.9±0.4
PLT (10 ³ /μL) (140-600)	830±30	1202±19	1658±235	1437±261	1295±277	1619±240	1575.5±606.9
MPV (μm ³) (4.6-7.3)	5.5±0.1	5.1±0.2	5.0±0.2	5.1±0.2	4.9±0.3	5.0±0.2	3.6±4.3
MON (%) (0.0-99.0)	10.0±1.1	16.3±1.9	17.8±2.8	15.4±3.8	17.1±4.1	15.3±1.8	16.0±3.8
MCV (μL) (44-69)	55.5±0.7	53.6±0.5	53.3±0.5	52.8±1.0	54.0±0.8	52.5±0.6	60.0±1.7
MCHC (g/dL) (21.6-42)	32.5±0.2	32.8±0.4	32.4±0.3	32.4±0.6	31.7±0.6	32.3±0.2	31.5±0.3
MCH (pg) (12-24.5)	18.3±0.2	17.6±0.1	17.3±0.3	17.2±0.4	17.1±0.2	16.9±0.3	18.9±0.5
LYMP (%) (0.0-99.0)	63.6±4.9	35.48±9.3	42.9±10.9	41.6±18.5	53.6±7.1	58.5±11.0	58.0±9.9
HGB (g/dL) (1.1-18)	14.2±0.7	12.2±0.3	12.3±0.7	13.5±0.5	14.1±1.2	53.6±7.1	13.1±0.8
HCT (%) (36-52)	43.8±2.0	37.0±1.0	38.0±2.3	41.7±0.9	44.6±4.0	42.6±3.3	41.5±2.4
GRA (%) (0.0-99.0)	26.5±3.8	48.3±8.9	39.3±9.8	43.1±15.7	29.3±5.6	26.3±10.1	26.0±7.6

Tabela 20. Średnie wyniki morfologii krwi myszy w zależności od metody leczenia.

Parametry krwi myszy po ksenotransplantacji komórek K562 oraz po 14 dniach podawania BK124, imatinibu albo hydroksymocznika. Wyniki przedstawiono w postaci średnia ± odchylenie standardowe. Dane pochodzą od co najmniej czterech zwierząt w każdej grupie. Wyniki krwi zwierząt nie odbiegały od zakresu referencyjnego (normy).

Skróty: WBC: białe krwinki; RBC: czerwone krwinki; HGB: hemoglobina; HCT: hematokryt; MCV: średnia objętość erytrocytów; MCH: średnia masa hemoglobiny; PLT: ilość płytek; MPV: średnia objętość płytek; PCT: hematokryt płytkowy; RDW: odchylenie w objętości krwinek czerwonych; MCHC: średnie stężenie krwinki czerwonej; MON: monocyty; GRA: granulocyty. Zakres referencyjny w oparciu o Scil Vet ABC™ Hematology Analyzer (Scil Animal Care Company).

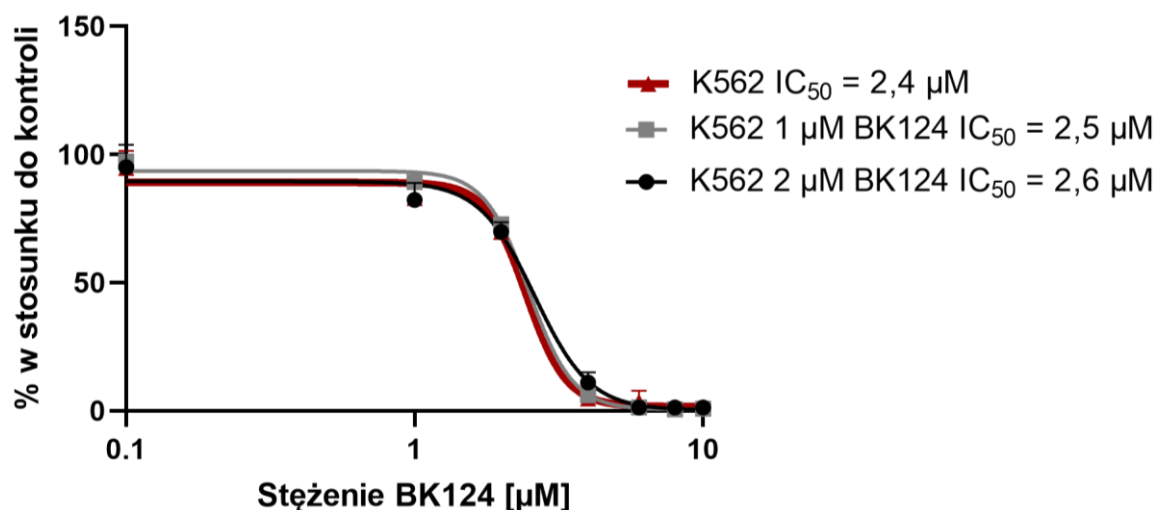
Rozdział 10. BK124 a oporność wielolekowa typu I (MDR1)

Widząc, że związek BK124 wywołuje apoptozę w komórkach K562 zarówno w hodowli komórkowej, jak i w modelu mysim, postanowiłam przetestować ten związek w komórkach charakteryzujących się wysoką opornością na leczenie. Jedną z istotnych właściwości potencjalnego chemoterapeutyku jest jego zdolność do wywołania oporności na leczenie pod wpływem długotrwałego podawania związku. Oporność ta jest często spowodowana ekspresją na powierzchni komórki pompy MDR1. MDR1 powoduje, że wewnątrzkomórkowe stężenie stosowanego leku spada, a w rezultacie jego efektywność. Drugą konsekwencją jest uodpornienie się również na inne chemoterapeutyki, ponieważ pompa MDR1 posiada szerokie spektrum substratów. Zmniejsza to zatem dostępne dla pacjenta możliwości terapeutyczne. Klasycznie, zjawisko oporności na leczenie bada się eksponując komórki nowotworu na chemoterapeutyki w hodowli dłuższy czas albo aż do momentu osiągnięcia widocznej oporności (niska śmiertelność, proliferacja).

10.1. DŁUGOTERMINOWA INKUBACJA K562 ZE ZWIĄZKIEM BK124

W pierwszym podejściu komórki K562 hodowane byłyby w stężeniach związku BK124 bliskich wartościom IC_{50} , tj. w stężeniu 1 oraz 2 μ M BK124. W trakcie uodparniania komórek na daną substancję, często zwiększa się stopniowo jej stężenie w hodowli. Jednak próby analogicznego postępowania w przypadku BK124 prowadziły do wzmożonej śmierci komórek K562, o dużej dynamice.

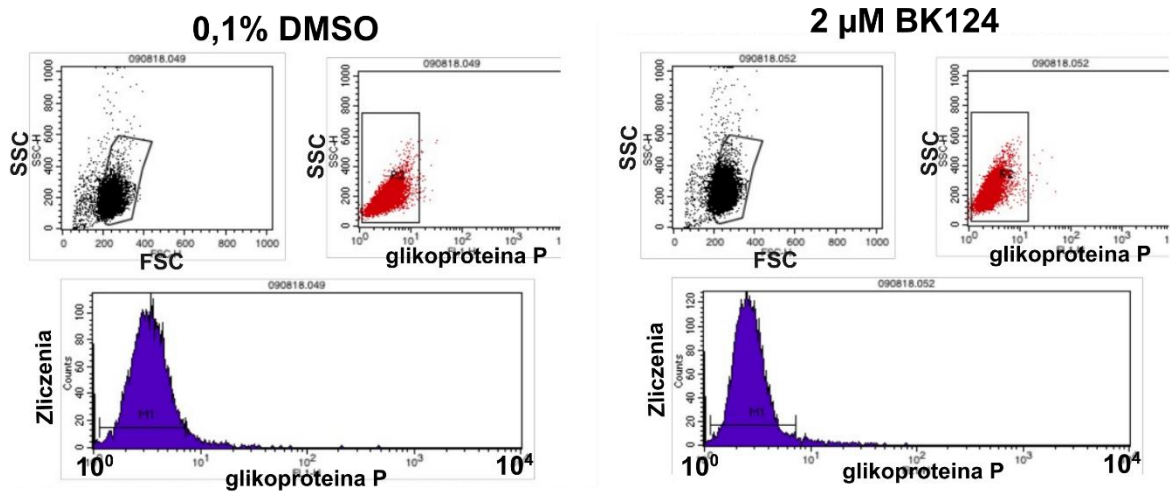
Inną metodą indukcji oporności jest utrzymywanie stałej presji związku w tolerowanym stężeniu. W eksperymencie utrzymywałam stężenie 1 oraz 2 μ M BK124 przez około sześć miesięcy. Obserwowałam spowolniony wzrost komórek w stosunku do kontroli, jednak był on stabilny. Hodowane w ten sposób komórki K562 poddałam testowi cytotoksyczności MTT, żeby sprawdzić, czy uodporniły się one na związek BK124 (**rycina 20**).



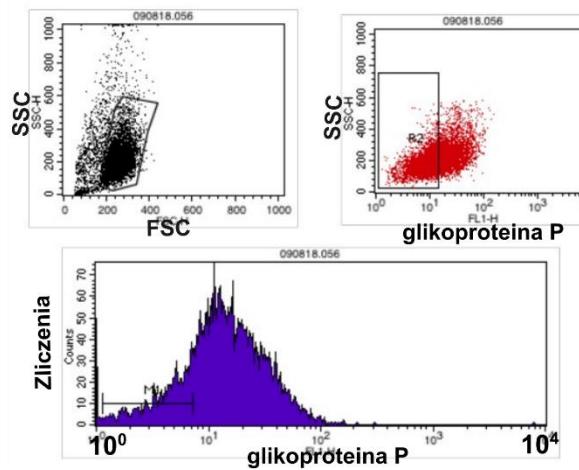
Rycina 20. Przeżywalność komórek K562 w BK124 po sześciu miesiącach inkubacji.

Komórki K562 były hodowane przez sześć miesięcy z dodatkiem 0,1% DMSO v/v (oznaczone jako K562; ciągła czerwona linia i trójkątne punkty) lub dodatkowo w obecności 1 μM BK124 (szara ciągła linia, kwadratowe punkty) lub 2 μM BK124 /9ciągła czarna linia, okrągłe punkty). W obu przypadkach końcowe stężenie DMSO w pożywce wynosiło 0,1% DMSO (v/v). Następnie analizowano przeżywalność komórek w zależności od stężenia związku BK124 przy użyciu testu MTT (jak opisano w punkcie 6.5). Odnosząc wartości absorbancji do wartości absorbancji dołków kontrolnych, uzyskano wartości procentowe. Na podstawie wykresów wyliczono parametr IC_{50} . Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

Parametr IC_{50} nie zmienił się istotnie w komórkach hodowanych z 1 μM BK124 ($\text{IC}_{50}=2,5 \mu\text{M}$) albo 2 μM BK124 ($\text{IC}_{50}=2,6 \mu\text{M}$) w stosunku do kontroli (hodowla z dodatkiem 0,1% DMSO ($\text{IC}_{50}=2,4 \mu\text{M}$)). Świadczy to o tym, że komórki nie uodporniły się na związek w czasie trwania eksperymentu. Ponadto, sprawdziłam ekspresję glikoproteiny P przy użyciu cytometrii przepływowej (**rycina 21 i rycina 22 A**), a także wyizolowałam z komórek RNA i sprawdziłam przy użyciu *Real Time* qPCR ekspresję mRNA dla genu *ABCB1*, odpowiadającego glikoproteinie P, a więc pompie odpowiedzialnej za fenotyp oporności wielolekowej typu 1 (**rycina 22 B**). Zgodnie z oczekiwaniem, nie było istotnych zmian w ekspresji pompy. Transkrypt *ABCB1* (gen kodujący MDR1) był natomiast istotnie obniżony w komórkach traktowanych przewlekle związkiem BK124 w stężeniu 2 μM .



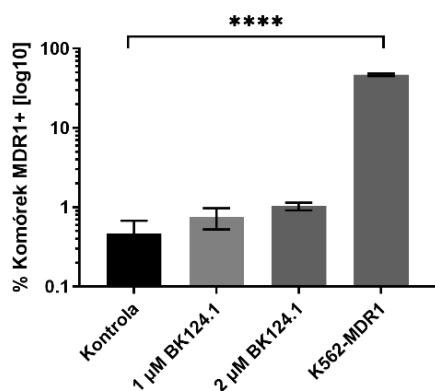
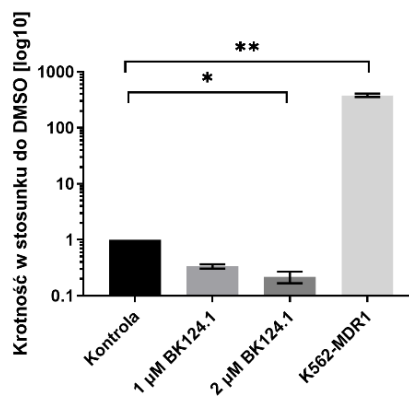
K562-MDR1



Rycina 21. Inkubacja komórek K562 z BK124 przez sześć miesięcy nie powoduje wzrostu odsetka komórek MDR1+. Reprezentatywne wykresy cytometryczne, obrazujące poziom MDR1 w komórkach. W lewym górnym rogu reprezentatywny histogram dla kontroli (0,1% DMSO), w prawym górnym rogu dla komórek po sześciu miesiącach inkubacji w 2 μ M BK124, a na dole dla komórek K562-MDR1, w których ekspresja glikoproteiny wywołana była wzrastającymi stężeniami winkrystyny (kontrola pozytywna). Wyniki pochodzą z trzech niezależnych powtórzeń.

A

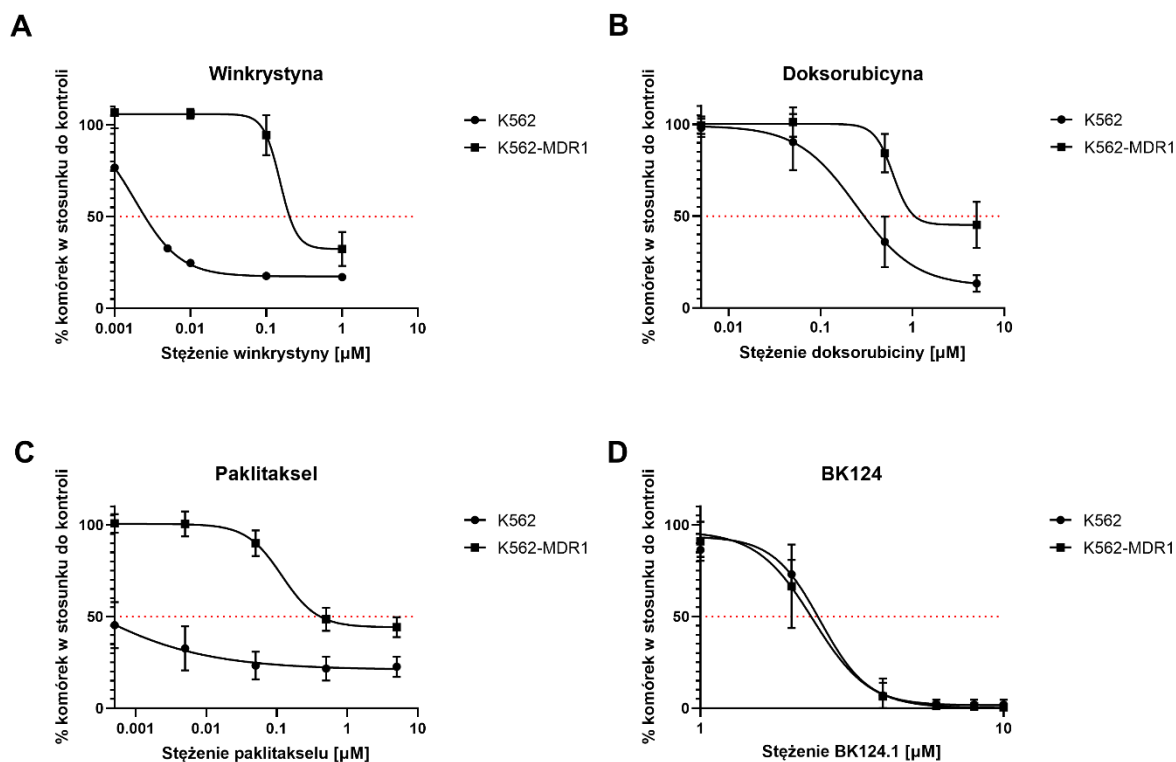
Poziom PgP po 6 miesiącach inkubacji w BK124.1

**B**Poziom *ABCB1* po 6 miesiącach inkubacji w BK124.1**Rycina 22. Poziom ekspresji glikoproteiny P po sześciu miesiącach inkubacji z BK124.**

Po sześciu miesiącach inkubacji ze związkuem BK124 z komórek wyizolowano białko oraz RNA, żeby zbadać ekspresję glikoproteiny P. Wykres A obrazuje poziom PgP na powierzchni komórek (cytometria przepływowa), a wykres B odpowiadającą jej ekspresję mRNA *ABCB1* (RT qPCR) w zależności od warunków eksperymentalnych. Komórki K562-MDR1 oznaczają komórki kontrolne (kontrola pozytywna) z ekspresją MDR1, indukowaną poprzez inkubację ze wzrastającym stężeniem winkrystyny. Kontrolą były komórki hodowane w samym 0,1% DMSO. Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Analiza statystyczna przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA w programie GraphPad Prism. * $p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

10.2. INDUKCJA FENOTYPU MDR1 W KOMÓRKACH K562

Ustaliwszy, że związek BK124 stosowany przez sześć miesięcy nie indukuje pompy MDR1, postanowiłam sprawdzić, czy związek ten będzie również działał cytotoksycznie na komórki, które już posiadają ekspresję pompy. W tym celu hodowałam komórki K562 we wzrastających stężeniach winkrystyny, zgodnie z protokołem opublikowanym w 1983r. przez Toshibę Tsuruo¹⁹⁶ (opisane w Materiałach i Metodach, w punkcie 6.4.2.2). Po około dwóch miesiącach zaobserwowałam prawie 400-krotnie zwiększoną ekspresję transkryptu *ABCB1* (**rycina 22 B „K562-MDR1”**) oraz 50-krotnie zwiększony poziom MDR1 na powierzchni komórek (**rycina 21 „K562-MDR1”, rycina 22 A**). Komórki były zdolne do przeżycia w prawie 100-krotnie wyższym stężeniu winkrystyny niż początkowe IC_{50} (**rycina 23 A, tabela 12**). Ponadto, charakteryzowała je opisywana w literaturze oporność krzyżowa na inne leki cytostatyczne takie jak paklitaksel i doksorubicyna (**rycina 23 B i C, tabela 12**). W przypadku oporności na paklitaksel, parametr IC_{50} wzrósł ponad 2000-krotnie (**tabela 12**).



Rycina 23. Oporność krzyżowa komórek K562-MDR1.

Wykres przedstawia komórki K562 po indukcji fenotypu opornego metodą wzrastających stężeń winkrystyny (K562-MDR1). Dzięki indukcji MDR1 komórki zyskały oporność na winkrystynę (A), doksorubicynę (B) oraz paklitaksel (C). Nie zaobserwowano natomiast wzrostu oporności komórek K562-MDR1 na BK124 (D). Przerwaną linią zaznaczono wartość na osi Y odpowiadającą 50% przeżywalności. Wykresy sporządzono w programie GraphPad Prism. Punkty to uśredniona wartość pochodząca z trzech niezależnych eksperymentów.

Cytostatyk	IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ MDR1+ [µM]	Krotność wzrostu IC ₅₀
Winkrystyna	0,002	0,2	100
Paklitaksel	0,0001	0,22	2200
Doksorubicyna	0,3	0,9	3
BK124	2,50	2,35	-

Tabela 21. Zmiany IC₅₀ w komórkach z indukcją MDR1 (MDR1+).

Komórki K562-MDR1 są odporne na działanie winkrystyny, paklitakselu oraz doksorubicyny, co sugeruje wzrost parametru IC₅₀. W kontraście, w przypadku BK124 obserwuje się spadek IC₅₀. Parametr IC₅₀ wyliczono na podstawie wykresów cytotoksyczności (test MTT) w programie GraphPad Prism.

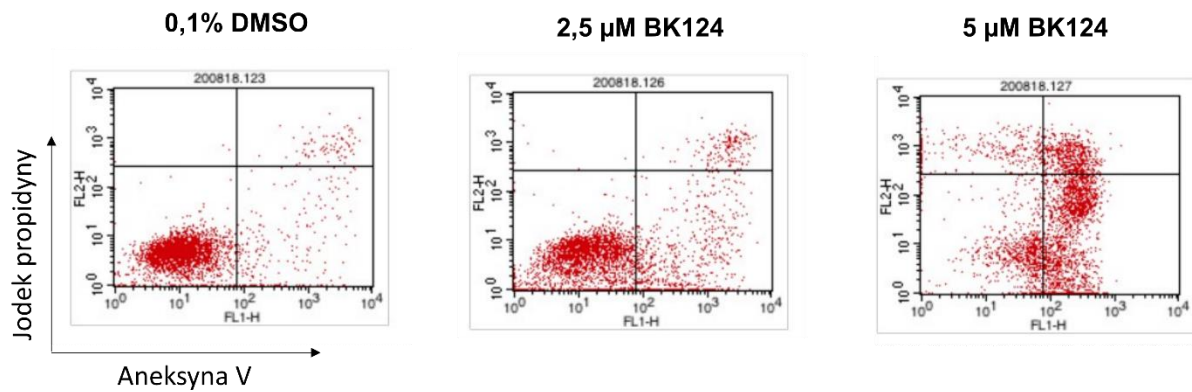
10.3. ANALIZA APOPTOZY W KOMÓRKACH K562-MDR1 POD WPŁYWEM ZWIĄZKU BK124.

Test MTT, w którym badano żywotność komórek K562-MDR1 w zależności od stężenia BK124, nie pokazały istotnej zmiany parametru IC₅₀ w stosunku do macierzystych K562 (odpowiednio IC₅₀ = 2,35 µM vs 2,50 µM). Komórki K562-MDR1 pozostają zatem wrażliwe na związek BK124. Postanowiłam również sprawdzić odsetki komórek apoptotycznych w populacji traktowanej związkiem. Podobnie jak wcześniej komórki K562, komórki K562-MDR1 inkubowałam przez 24 godziny ze związkiem BK124 w stężeniach odpowiadających parametrowi IC₅₀ oraz 2 x IC₅₀.

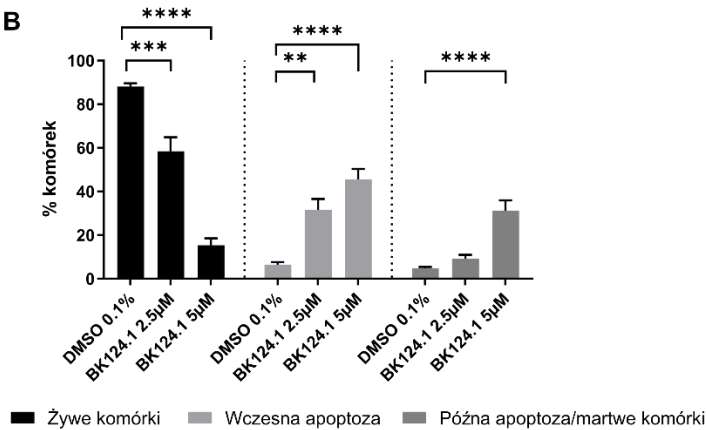
Wyniki analizy apoptozy przedstawiono na **rycinie 24 A-B**. Odsetek żywych komórek po 24 godzinach spadł do średnio $58\% \pm 16\%$ pod wpływem BK124 w stężeniu $2,5 \mu\text{M}$ oraz $15,4\% \pm 7,8\%$ w stężeniu $5 \mu\text{M}$, a odsetek komórek apoptotycznych wzrósł odpowiednio do $31,6\% \pm 2,6\%$ oraz $45,6 \pm 11,7\%$. Procent komórek na późnym etapie apoptozy albo martwych wzrósł istotnie w $5 \mu\text{M}$ BK124, do $34,3\% \pm 9,9\%$.

Wyniki analizy poziomu glikoproteiny P na powierzchni komórki pokazały, że w reakcji na związek BK124 poziom MDR1 na komórkach K562-MDR1 znacznie się zwiększa (**rycina 24 C**). Odsetek komórek pozytywnych pod względem MDR1 pod wpływem związku BK124 wzrósł do $68,2\% \pm 3,1\%$, podczas gdy średni odsetek komórek MDR1-pozytywnych w kontroli traktowanej wyłącznie DMSO wyniósł $33,7 \pm 8,2\%$ i nie różnił się od poziomu w komórkach traktowanych $1 \mu\text{M}$ paklitakselem ($33,8 \pm 6,2\%$) czy w komórkach traktowanych roztworem $1 \mu\text{M}$ winkrystyny ($40\% \pm 6,6\%$). Oznacza to, że komórki K562-MDR1, które mają wyindukowany mechanizm MDR1 oporności na leki przeciwnowotworowe, reagują zwiększoną ekspresją pompy na powierzchni komórki w odpowiedzi na stres wywołany związkiem BK124. Jednak, z informacji na temat odsetka komórek apoptotycznych oraz testu MTT wynika, że nie jest to wystarczające, żeby obronić komórkę przed indukcją apoptozy pod wpływem BK124.

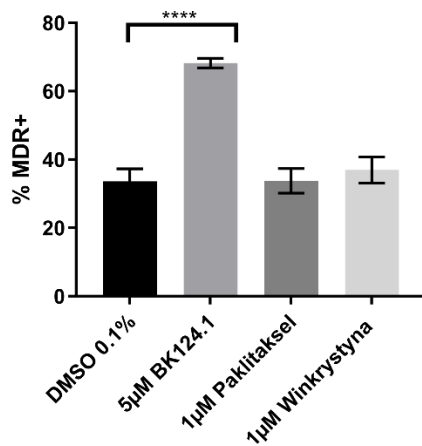
A



B



C



Rycina 24. Wpływ związku BK124 na apoptozę w komórkach MDR1+.

Komórki K562-MDR1 inkubowano 24 godziny z 2,5 μM lub 5 μM BK124, 1 uM paklitaksel, 1 uM Winkrystyną albo samym 0,1% DMSO (kontrola). Następnie komórki analizowano cytometrycznie. Na wykresach powyżej przedstawiono (A) reprezentatywny dotplot obrazujący wzrastający odsetek komórek apoptotycznych, (B) analizę statystyczną uśrednionych wartości uzyskanych w wyniku przeprowadzonych pomiarów cytometrycznych oraz (C) analizę statystyczną uśrednionego odsetka komórek posiadających MDR1 na swojej powierzchni. Średnie przedstawiono w postaci średnia ± odchylenie standardowe po poddaniu analizie statystycznej w programie GraphPad Prism, używając jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA * p < 0.05; ** 0.001 < p < 0.05; *** 0.0001 < p < 0.001; **** p < 0.0001. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

Rozdział 11. Wpływ BK124 na komórki macierzyste białaczki (LSCs)

11.1. IZOLOWANIE KOMÓREK CD34+ Z KRWI OBWODOWEJ PACJENTÓW Z CML

Jak pokazały testy związku BK124 w komórkach K562, związek ten indukuje w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej śmierć apoptotyczną poprzez blokadę na etapie G2/M cyklu komórkowego (**rycina 16A i B**), a także towarzyszącą jej lokalizację jądrową białka p21 oraz czynnika transkrypcyjnego FOXO3a (**rycina 15 L i N**). Związek skutecznie indukował apoptozę również w komórkach o fenotypie oporności wielolekowej MDR1 (**rycina 23 i 24**).

Kolejną grupą komórek szczególnie opornych na aktualnie dostępne terapie są białaczkowe komórki macierzyste, zwane też komórkami inicjującymi nowotwór. Komórki te charakteryzuje zdolność do odbudowy całego nowotworu po epizodzie kompletnej remisji. Ponadto, przyczyniają się one do progresji choroby i rozwoju oporności na leczenie^{213,214}.

W związku z powyższym, postanowiłam sprawdzić działanie związku w komórkach macierzystych białaczki CD34⁺, pochodzących z krwi obwodowej nowo zdiagnozowanych pacjentów z CML, przyjętych w Katedrze i klinice hematologii, onkologii i chorób wewnętrznych Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Każdy z pacjentów uczestniczących w badaniu wyraził świadomą zgodę na użycie materiału. Lista pacjentów, czystości izolacji oraz metodyka badan przedstawione są w punkcie 6.6 w sekcji Materiały i Metody.

11.2. ANALIZA PRZEŻYWALNOŚCI KOMÓREK CD34+ W ZALEŻNOŚCI OD STĘŻENIA BK124

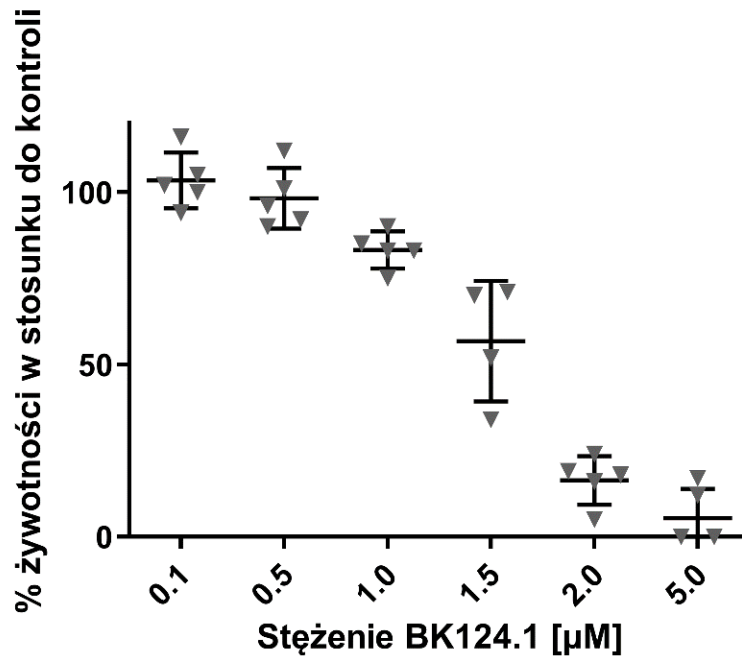
11.2.1. Test MTT

Komórki CD34⁺ po izolacji z krwi obwodowej pacjentów CML (opisane szczegółowo w punkcie **6.6.2 i 6.6.3**) hodowałam przez 24 godziny w pełnym medium. Po tym czasie do dołków dodawałam porcję świeżej pożywki, zawierającą związek BK124. W zależności od wariantu, podawany związek miał inne stężenie (wzrastające stężenia związku BK124), a stężenie końcowe DMSO w każdej próbce wynosiło 0,1% (v/v). Przeżywalność komórek oceniałam w stosunku do kontrolnych komórek hodowanych w medium z dodatkiem samego 0,1% DMSO. Wyniki każdego pacjenta przedstawiłam na **rycinie 25** wraz z uśrednioną wartością i odchyleniem standardowym. Takie zobrazowanie wyników pozwoliło zaobserwować, że

niezależnie od różnic osobniczych, uzyskiwałam odpowiedź na związek BK124 na podobnym poziomie. Zgodnie z oczekiwaniami, największy rozrzut dają wartości przeżywalności komórek w dołku z dodatkiem BK124 w stężeniu 1,5 μM , które to odpowiada wartości IC_{50} . W populacji ma miejsce wtedy intensywny spadek żywotności i wysoka śmiertelność komórek, co ze względu na różnice osobnicze może zachodzić dla każdego pacjenta w innym tempie.

11.2.2. Analiza apoptozy w komórkach CD34^+

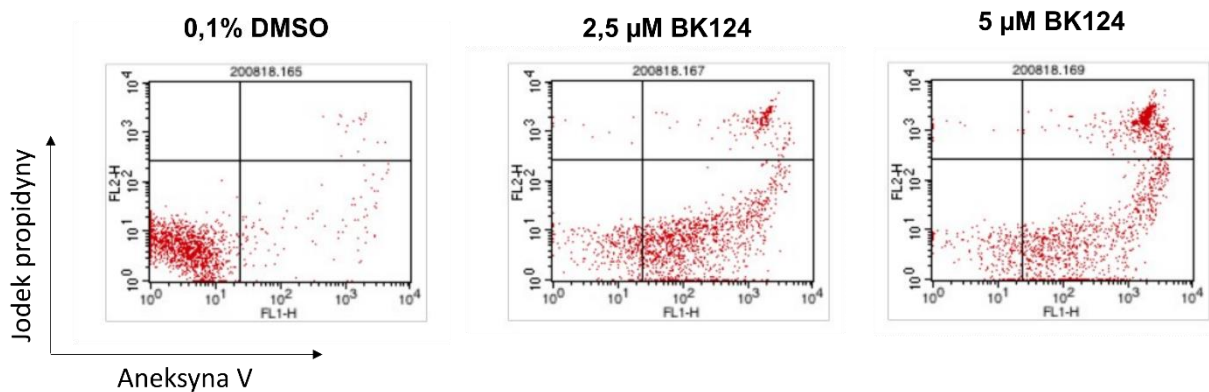
Kolejnym krokiem była dokładniejsza ocena odsetka komórek apoptotycznych w populacji komórek CD34^+ pojawiających się pod wpływem działania związku BK124. Podobnie jak w przypadku poprzednich eksperymentów, testowałam efekt BK124 w stężeniach 2,5 μM i 5 μM . Aby zbadać indywidualne odpowiedzi na związek BK124 w komórkach CD34^+ pochodzących od różnych pacjentów, na wykresie umieściłam wynik analizy dla każdego pacjenta oddzielnie oraz uśrednioną wartość dla wszystkich pacjentów. Procent komórek żywych po 24 godzinach spadł z $93,6\% \pm 2,0\%$ (0,1% DMSO) do poziomu $13,7\% \pm 2,3\%$ oraz $7,9\% \pm 2,5\%$ odpowiednio w 2,5 i 5 μM BK124. Jednocześnie, wzrósł odsetek komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy – w przypadku niższego stężenia związku wyniósł on odpowiednio $60,4\% \pm 8,5\%$ i $24,5\% \pm 10\%$, a w przypadku wyższego stężenia BK124 wyniósł on odpowiednio $30,15\% \pm 13,5\%$ i $60,0\% \pm 15\%$ (**rycina 27**). Można zatem stwierdzić, że odpowiedź na BK124 w komórkach CD34^+ pacjentów zależała od stężenia związku BK124.



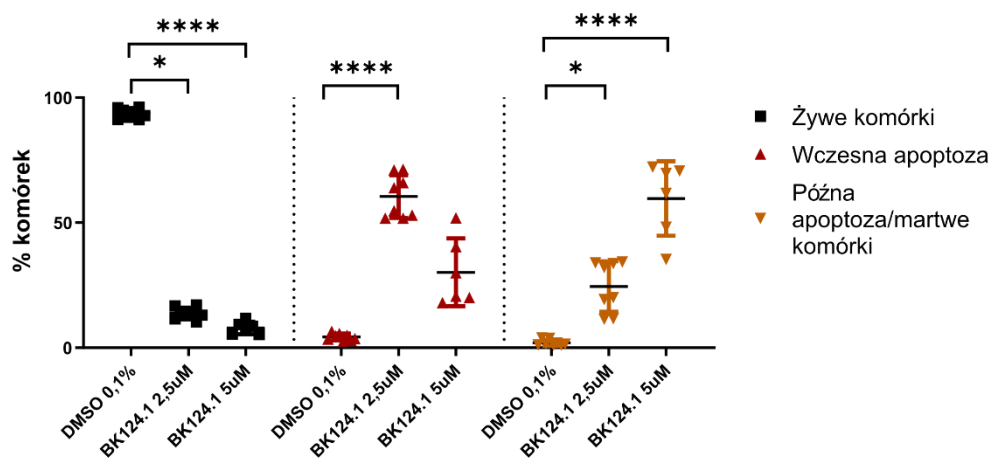
Rycina 25. Przeżywalność komórek CD34⁺ izolowanych od pacjentów z CML w zależności od stężenia BK124.

Na wykresie przedstawiono przeżywalność komórek w poszczególnych stężeniach BK124 w stosunku do przeżywalności w 0,1% DMSO. Każdy punkt (trójkąt) odpowiada odpowiedzi pojedynczego pacjenta. Uśredniona wartość wraz z odchyleniem standardowym została zaznaczona na wykresie czarną, poziomą kreską. Dane pochodzą z n=5 pacjentów. Wykres wykonano przy użyciu programu GraphPad prism.

A



B



Rycina 26. Odsetek komórek CD34⁺ od pacjentów z CML na poszczególnych etapach apoptozy.

Komórki CD34⁺ inkubowano ze związkiem BK124 w stężeniu 2,5 i 5 µM przez 24 godziny, a następnie barwiono i analizowano na cytometrze (wykres A). Każdy punkt na grafie B odpowiada pomiarowi wykonanemu dla komórek pochodzących od jednego pacjenta. Uśrednione wartości wszystkich pomiarów (n=8) przedstawiono czarną, poziomą kreską wraz z odchyleniem standardowym. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA * p<0.05; **** p < 0.0001

11.2.3. Analiza odsetka komórek apoptotycznych w subpopulacji CD34⁺ CD38⁻

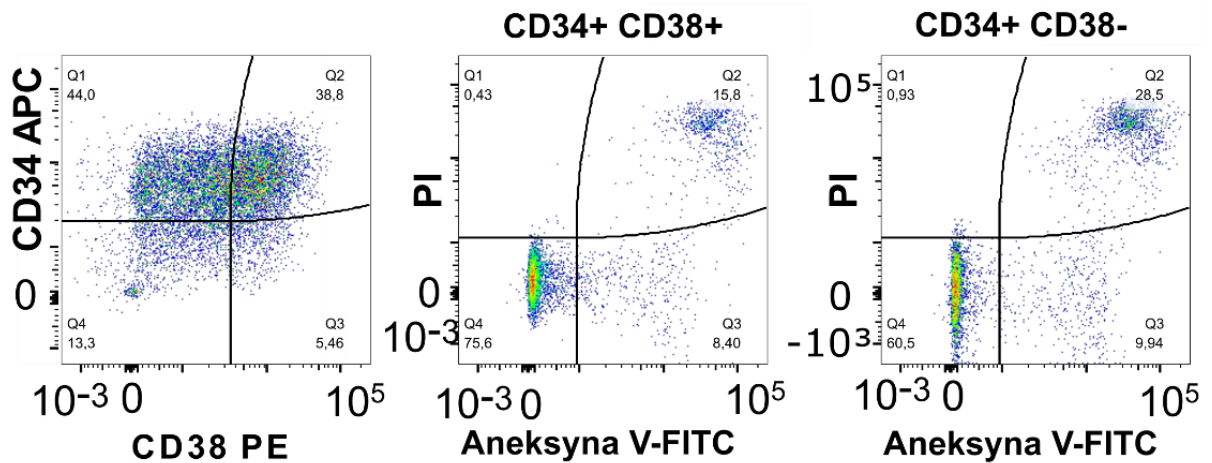
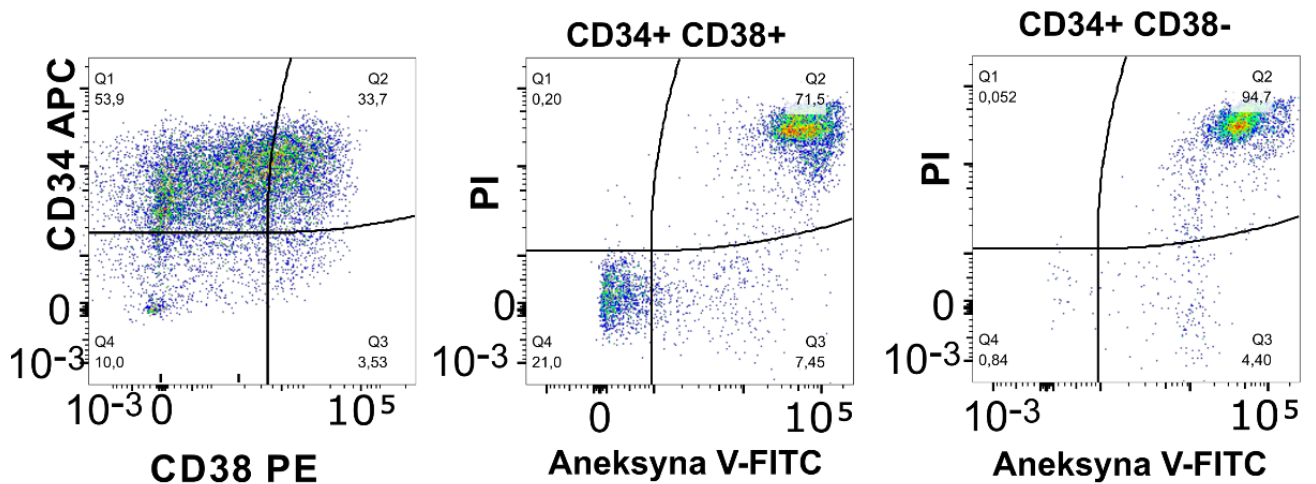
W obrębie populacji komórek macierzystych CD34⁺ występuje również szczególnie rzadka subpopulacja komórek CD34⁺CD38⁻, zdolna do odbudowy nowotworu. Są to zwykle komórki znajdujące się w fazie G0 cyklu komórkowego, nie proliferujące, uśpione (ang. *dormant*), a przez to odporne na standardowe leczenie²¹⁴. Wysoki odsetek komórek tej subpopulacji we krwi świeżo zdiagnozowanych pacjentów z CML prognozuje zwykle ubogą odpowiedź molekularną i wysokie ryzyko transformacji w ostrą białaczkę limfocytarną²¹⁴. W związku z

powyższym, postanowiliśmy pogłębić analizę populacji komórek CD34⁺ o subpopulację CD34⁺CD38⁻.

Aby określić cytotoksyczny wpływ związku BK124 na komórki populacji CD34⁺CD38⁻, komórki CD34⁺ były inkubowane ze związkiem BK124, a następnie barwione przy użyciu przeciwciał anti-CD38, anti-CD34 oraz aneksyny V-FITC i jodku propidyny (**rycina 27**). Eksperyment ten prowadziła dr Wioleta Piotrowska, analizę statystyczną i rycinę przygotował dr Andrew Want, ja brałam udział w planowaniu eksperymentu, a następnie w analizie i opracowaniu uzyskanych wyników.

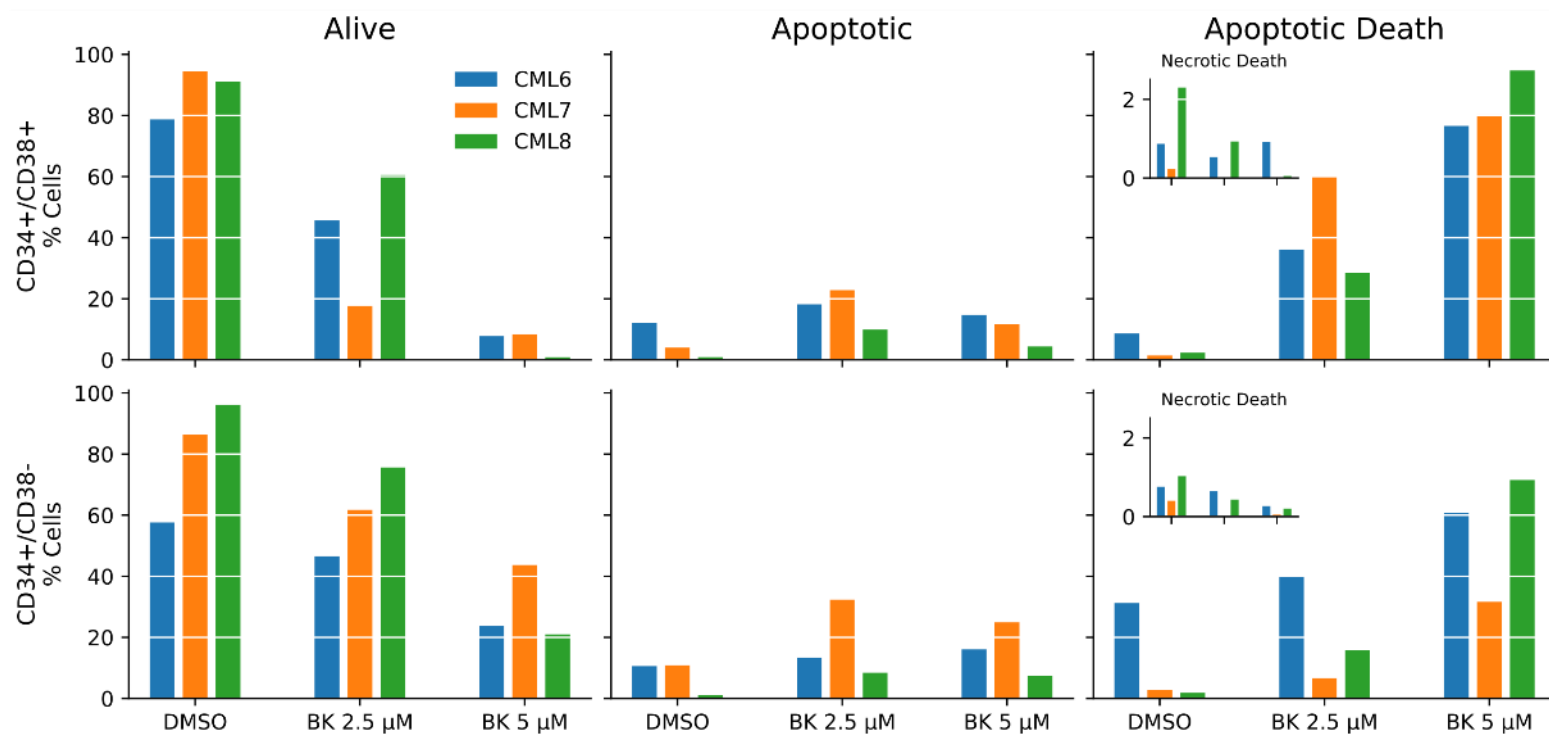
Aby zbadać tę rzadką populację komórek, użyliśmy materiału pochodzącego od trzech pacjentów (opisanych w poprzednim punkcie oraz w punkcie 7.6.3 sekcji Materiały i Metody). U każdego pacjenta sprawdzaliśmy odsetek komórek CD34⁺CD38⁻ przed i po traktowaniu BK124 (pierwszy wykres na **rycinie 27 A** oraz na **rycinie 27 B**). W ciągu 24 godzin, BK124 w stężeniu 2,5 i 5 μM zaindukował apoptozę w badanej grupie komórek LSC u wszystkich pacjentów. Zgodnie z poprzednimi obserwacjami, odsetek komórek apoptotycznych był zależny od stężenia związku (**rycina 27 C**). Komórki CD34⁺ CD38⁻ charakteryzuje znaczna chemiooporność i rzeczywiście, zgodnie z oczekiwaniami obserwowaliśmy wyższy odsetek komórek apoptotycznych w subpopulacji podwójnie pozytywnej (tj. CD34⁺CD38⁺) niż w populacji CD34⁺CD38⁻. Widać też różnice indywidualne pomiędzy pacjentami w odpowiedzi na dikarboksymid BK124. Związane jest to prawdopodobnie z różnorodną odpowiedzią na badany związek przeciwnowotworowy na poziomie molekularnym. Komórek nekrotycznych jest mniej niż 1%.

Podsumowując, wykonane doświadczenia dokumentują, że BK124 przełamuje oporność komórek macierzystych oraz inicjujących białaczkę, w tym subpopulacji CD34⁺CD38⁻.

A**BK124.1 2.5 μ M****B****BK124.1 5 μ M**

Rycina 27. Reprezentatywne wykresy dot-plot, pokazujące odsetek komórek apoptotycznych po inkubacji ze związkiem BK124 w populacji komórek CD34⁺CD38 oraz CD34⁺CD38⁻.

Określenie apoptozy przy użyciu cytometrii przepływowej oraz Aneksyny V-FITC/jodku propidyny w populacji komórek CD34⁺ CD38⁻ oraz CD34⁺CD38⁺ po 24 godzinach traktowania 0,1% DMSO albo związkiem BK124 w stężeniu 2,5 i 5 μ M. Wykres A przedstawia reprezentatywny dot-plot dla komórek traktowanych 2,5 μ M BK124, a wykres B dla komórek traktowanych 5 μ M BK124.



Rycina 28. Odsetek komórek apoptotycznych po inkubacji ze związkiem BK124 w populacji komórek CD34⁺CD38 oraz CD34⁺CD38⁻.

Komórki CD34⁺ zostały wyizolowane z krwi obwodowej nieleczonych pacjentów zdiagnozowanych w fazie chronicznej przewlekłej białaczki szpikowej. Na wykresie pokazano odsetki komórek w subpopulacjach zidentyfikowanych w oparciu o antygen CD34/CD38 oraz aneksynę V/jodek propidyny. Dane pochodzą od indywidualnych pacjentów.

Wyrazy anglojęzyczne: % cells - % komórek; alive – komórki żywe; apoptotic – komórki we wczesnej fazie apoptozy; apoptotic/death – komórki w późnej fazie apoptozy/martwe; necrotic death – komórki nekrotyczne/martwe

IV. Dyskusja

Rozdział 12. BK124 jako potencjalny nowy lek przeciwnowotworowy

Przewlekła białaczka szpikowa (ang. *chronic myelogenous leukemia*, CML) stanowi jeden z nowotworów o wysokim odsetku zaleczalności, a przedłużająca się terapia nie obniża znacząco poziomu życia chorego^{215,216,133}. Jednakże, w co drugim przypadku terapia inhibitorami kinazy tyrozynowej (TKI) nie jest wystarczająca do całkowitej eradykacji choroby. Nowym celem w leczeniu CML jest eliminacja komórek opornych na działanie TKI, w szczególności białaczkowych komórek macierzystych, aby osiągnąć remisję nie wymagającą dalszego leczenia farmakologicznego, tzw. TFR (ang. *Treatment-free remission*)^{109,217}. Badane są zatem różne związki, na przykład inhibitory IRAK 1/4 (ang. *inhibitors of interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4*) w terapii łączonej z imatinibem^{215,218}. Terapie te są jednak na ten moment we wczesnej fazie rozwoju. Trwa poszukiwanie nowych potencjalnych leków, które przewyciężyłyby podstawowe przeszkody związane z osiągnięciem TFR, to jest mechanizmy związane z uodpornianiem się komórek nowotworowych na terapię, a w konsekwencji powrót komórki nowotworu do proliferacji i inhibicji apoptozy.

Dikarboksyimidy, zwłaszcza związki heterocykliczne, są dużą grupą substancji o różnorodnej i wysokiej aktywności biologicznej^{189,192}. Szczególne własności przeciwnowotworowe posiadają ftalimidy i bursztyniany^{219–221}. Wiele z dikarboksyimidów, na przykład mitonafid czy amonafid, było badanych w ramach prób klinicznych, jednak w nietoksycznych dawkach osiągały niezadowalający efekt terapeutyczny. W związku z tym podjęto liczne próby uzyskania pochodnych dikarboksyimidów o pożądanym parametrach, w tym o dużej toksyczności względem guza i niskiej względem tkanek nienowotworowych^{159,222–224}. W niniejszej pracy opisano związek BK124, który w toku wcześniejszych badań został wybrany spośród 39 nowych pochodnych dikarboksyimidów¹⁹¹. W badaniach przesiewowych związek ten wykazywał wysoką aktywność przeciwbiałaczkową, a jednocześnie niską względem nienowotworowych ludzkich komórek endotelialnych^{191,225}.

12.1. BK124 INDUKUJE APOPTOTYCZNĄ ŚMIERĆ W KOMÓRKACH K562

Jak pokazały eksperymenty przedstawione w poniższej pracy, związek BK124 w zakresie stężeń od 1 do 10 μM wykazuje wysoką toksyczność. Śmierć apoptotyczna została potwierdzona przy pomocy cytometrii przepływowej oraz poprzez detekcję cięcia kaspazy 3, 8 oraz 9. Badanie sposobu, w jaki umiera komórka nowotworowa pozwala przewidzieć odległe skutki terapii. Na przykład, jeśli punkty kontrolne mitozy są niesprawne albo stosowane są leki uszkodzające element maszyneryi proliferacyjnej lub DNA, może wystąpić zjawisko katastrofy mitotycznej. Dzieje się tak wtedy, kiedy komórka nowotworu próbuje dokończyć mitozę mimo nieprawidłowości występujących w tym procesie, polegających na rozległym uszkodzeniu DNA, problemami z maszyną mitotyczną (na przykład zablokowanie możliwości polimeryzacji mikrotubul) oraz uszkodzeniem punktów kontrolnych mitozy²²⁶. Może to prowadzić do przewyciężenia terapii i przetrwania niekorzystnych warunków dzięki odblokowaniu ekspresji genów związanych z autofagią albo starzeniem. W tym ostatnim przypadku komórki nie proliferują, jednak mogą modulować niekorzystnie mikrośrodowisko guza, uwalniając białka takie jak metaloproteiny, chemokiny czy cytokiny, które wspierałyby rozwój nowotworu²²⁷. Autofagia natomiast pozwala przetrwać w niekorzystnym otoczeniu, między innymi dzięki pozyskiwaniu energii z trawienia własnych organelli w lizosomach²²⁸. Pozwala to przetrwać terapię i prowadzi do nawrotu nowotworu. Postuluje się zatem użycie inhibitorów autofagii w klinice²²⁸.

W przypadku związku BK124 wiele przesłanek przemawia za tym, że komórki wchodzi w klasyczną apoptozę, co widać w wynikach cytometrii przepływowej. Używając BK124 w stężeniu 2,5 albo 5 μM stwierdzono śmierć niemal całej populacji komórek. Nie obserwuje się morfologicznie nietypowych komórek, jakich można by oczekiwać, gdyby wystąpiła katastrofa mitotyczna, gdyż posiada ona charakterystyczny fenotyp – komórka ulega powiększeniu, występuje też multinukleacja i makronukleacja w następstwie błędów w podziale materiału między komórką-matką a pochodną^{226,229}.

Pod wpływem związku BK124 większość komórek wchodzi w fazę asymetrii błony komórkowej, którą charakteryzuje eksternalizacja fosfatydyloseryny (komórki pozytywne pod względem aneksyny V i negatywne względem jodku propidyny). Widać również postęp procesu apoptozy – po 24 godzinach głównie aktywację kaspazy-9, świadczącej o wewnętrznym źródle stresu, a po 48 godzinach dodatkowo aktywację kaspazy-8, kaspazy-3

oraz produkty proteolitycznego cięcia białka PARP, co świadczy o zaawansowaniu procesu apoptozy. BK124 zatem prawdopodobnie uruchamia w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej mechanizmy związane z klasyczną apoptozą. Taki efekt jest pożądanym terapeutycznie, ponieważ prowadzi do śmierci komórkowej bez wywołania stanu zapalnego. Resztki komórek są wówczas rozpoznawane przez specyficzne receptory na powierzchni komórek fagocytujących, co pozwala ich usunięcie z organizmu²³⁰.

12.2. BK124 OBNIŻA POZIOM BIAŁEK SZLAKÓW ONKOGENNYCH, HAMUJE PROLIFERACJĘ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH I PROMUJE APOPTOZĘ

Chociaż związek ten nie jest bezpośrednim inhibitorem kinazy BCR-ABL1, to dodanie BK124 do komórek K562 powoduje spadek ekspresji BCR-ABL1 oraz związanych z tą kinazą onkogennych szlaków sygnałowych, takich jak JAK/STAT oraz PI3K/AKT. Po 4-8 godzinach od podania związku, wykryty został spadek poziomu białek sprzyjających przeżyciu komórki takich jak BCR-ABL1, STAT5, AKT, mTOR i NF-κB. Dodatkowo, odnotowano wzrost poziomu i translokacji jądrowej dwóch ważnych białek regulujących cykl komórkowy – p21 oraz FOXO3a. W tym samym czasie większość komórek w populacji zatrzymywała się w cyklu komórkowym w fazie G2/M.

Obniżenie poziomu kinazy PI3K oraz AKT może hamować proliferację oraz aktywować szlaki związane z apoptozą. W szczególności kinaza AKT poprzez onkogeną fosforylację p21 oraz FOXO3a może sekwestrować je w cytoplazmie, w której p21 działa antyapoptotycznie²³¹, a FOXO3a nie może pełnić swojej funkcji proapoptotycznego czynnika transkrypcyjnego. W cytoplazmie FOXO3a jest także w sposób przyspieszony degradowane²³² (rycina 3 i 4). P21 w jądrze komórkowym oddziałuje na cyklinozależne kinazy, blokując cykl mitotyczny w fazie G1/S oraz G2/M, a także promując apoptozę. Zwiększone poziomy p21 mogą tłumaczyć obserwowany areszt w fazie G2/M cyklu komórkowego oraz apoptozę komórek nowotworowych⁷³.

Wzrost poziomu p21 jest często związany z aktywacją jego transkrypcji przez fosforylowane białko p53, na przykład na skutek kaskady sygnałowej związanej z odpowiedzią na uszkodzenia DNA. Jednak w komórkach linii 562 istnieje mutacja skutkującą przesunięciem ramki odczytu i degradacją transkryptu *TP53* w cytoplazmie²³³. Brak funkcjonalnego p53 nie oznacza, że związek BK124 nie indukuje uszkodzeń w DNA. Jednakże, jak wynika z poprzednich badań nad

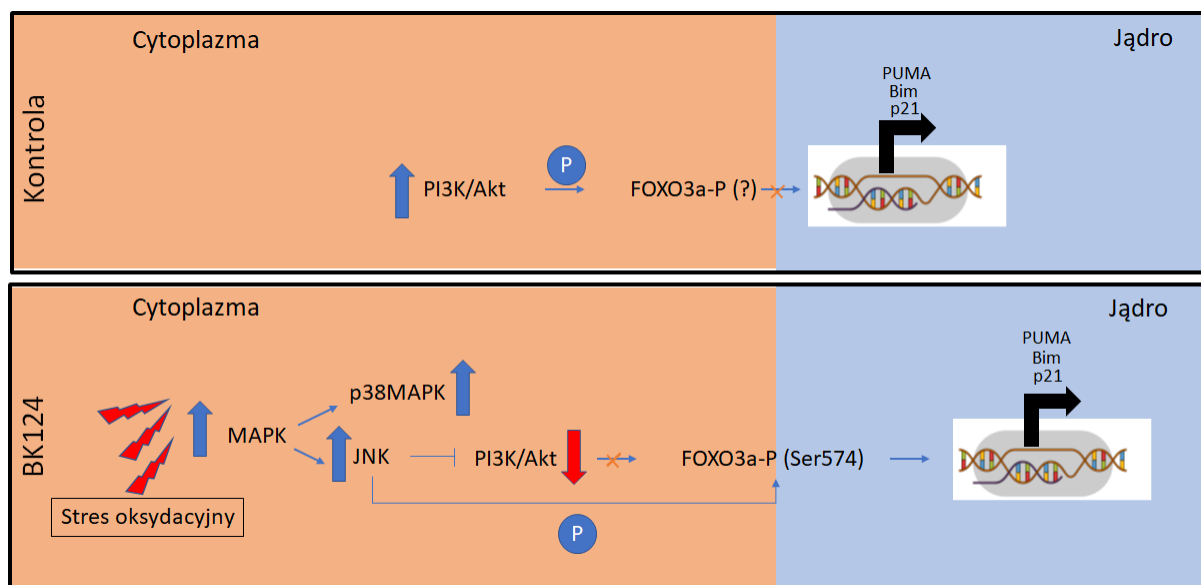
tym związkim, BK124 nie oddziałuje z DNA, zatem wiodący jest prawdopodobnie inny mechanizm wzrostu poziomu p21¹⁹¹. Brak funkcjonalnego p53 jest prawdopodobną przyczyną blokady cyklu na etapie G2/M, nie zaś już na etapie G1/S.

Poziom białka p21 może być również wysoki, kiedy komórka wchodzi w przyspieszone starzenie (opisane w punkcie 12.1)²³⁴, jednak wówczas p21 znajduje się głównie w cytoplazmie, hamując aktywność kaspaz i niektórych czynników apoptotycznych⁷¹. Komórki o fenotypie SASP (*ang. senescence-associated secretory phenotype*, fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem) zachowują na ogół przeżywalność, a pod wpływem związku BK124 wyraźnie widoczny był wzrost odsetka komórek martwych (pozytywnych pod względem aneksyny V i jodku propidyny)²²⁶. Zatem, zwiększony poziom p21 w tym przypadku prawdopodobnie nie był spowodowany indukcją fenotypu związanego ze starzeniem.

12.3. BK124 POWODUJE AKTYWACJĘ P38 ORAZ JNK

Obniżony poziom AKT może odpowiadać za translokację FOXO3a do jądra, jednak nie tłumaczy całkowicie obserwowanego wzrostu poziomu FOXO3a w komórce. Jednym z najlepiej opisanych czynników transkrypcyjnych dla FOXO3A jest HIF α (*ang. Hypoxia-induced factor α*), co mogłoby sugerować, że BK124 indukuje stres związany z hipoksją⁷⁶. Ponadto, FOXO3a jest uznawany za krytyczny regulator homeostazy w trakcie nierównowagi redoks w środowisku i może aktywować transkrypcję genów kluczowych dla odpowiedzi na uszkodzenia oksydacyjne²³⁵. Pod wpływem BK124 obserwujemy zwiększoną fosforylację kinaz MAP, regulujących odpowiedź na stres, w tym stres oksydacyjny, stres genotoksyczny, uszkodzenie DNA, cytokiny prozapalne albo niedobory składników odżywczych²³⁶. W tym przypadku MAPKK aktywuje p38MAPK oraz JNK1-3 (*ang. c-Jun N-terminal kinase 1-3*) (**rycina 29**). Podczas inkubacji z BK124 obserwujemy wzrost fosforylowanej formy p38 oraz JNK. JNK może bezpośrednio aktywować czynność transkrypcyjną FOXO3a poprzez hamowanie szlaku PI3K/AKT, a także fosforylację FOXO3a na Serynie 574, co promuje jego jądrową translokację⁷⁶ (**rycina 29**). Ponadto, fosforylacja ta pozwala FOXO3a hamować aktywność innych czynników transkrypcyjnych i ekspresję regulowanych przez nie genów, na przykład czynnika transkrypcyjnego c-Myc. Kiedy c-Myc jest aktywny, blokuje transkrypcję między innymi *CDKN1A* (p21). FOXO3a obecne w jądrze oddziałuje z c-Myc, co umożliwia ekspresję *CDKN1A* (p21). FOXO3a może też samodzielnie inicjować transkrypcję genu *CDKN1A*⁸¹. Cieślak et al. 2019 opisuje podobną aktywację kinaz MAP w odpowiedzi na inkubację z pochodnymi kwasu bursztynowego innymi

niż BK124²³⁷. Aktywacja kinaz MAP pozwala przypuszczać, że mechanizm działania związku jest podobny do ogólnego mechanizmu działania dikarboksyimidów, w którym apoptoza jest indukowana peroksydacją lipidów poprzez formowanie aldehydu²³⁸. Żeby zbadać dokładną rolę, jaką odgrywa JNK oraz p38 w indukcji apoptozy pod wpływem związku, należałoby w przyszłości przeprowadzić szczegółowe eksperymenty, łączące użycie inhibitora odpowiedniej kinazy i BK124.



Rycina 29. BK124 powoduje powstanie stresu oksydacyjnego i aktywację szlaku MAPK.

Schematyczne odzwierciedlenie szlaków sygnałowych w komórce CML. W górnym panelu: aktywność szlaku PI3K/Akt sekwestruje FOXO3a w cytoplazmie, co uniemożliwia transkrypcję genów związanych z apoptozą. W dolnym panelu: związek BK124 indukuje w komórce stres oksydacyjny, co aktywuje szlak MAPK/JNK oraz MAPK/p38, hamuje aktywność PI3K/Akt i pozwala na fosforylację FOXO3a na Serynie 574 przez kinazę JNK, co umożliwia jądrową translokację i aktywację apoptozy.

12.4. BK124 POSIADA KORZYSTNE PARAMETRY FIZYKOCHEMICZNE

BK124 posiada niską masę molekularną, a badania na zwierzętach pokazały, że odznacza się korzystnymi parametrami farmakokinetycznymi. Po pierwsze, jego klirens jest niski (w zależności od podania między 2,34 l/h/m² a 1,23 l/h/m²), więc ulega on powolnemu metabolizmowi. Po drugie, w konsekwencji, również parametr MRT (średni czas przebywania w organizmie) jest wydłużony. W końcu, stopniowe zmniejszanie stężenia BK124 we krwi sprawia, że okres półtrwania BK124 jest optymalny dla podania pacjentom nie częściej niż raz dziennie.

Wskazane parametry sugerują, że związek jest stabilny we krwi i prawdopodobnie nie kumuluje się w ciele. Jest to korzystne, ponieważ jedną z ważnych cech potencjalnego leku jest zdolność do utrzymania się w tkance docelowej w odpowiednim stężeniu przez

odpowiedni czas. Dla porównania, okres półtrwania winkrystyny waha się między 19 a 155 godzinami, co skutkuje koniecznością odstępów między kolejnymi podaniami, żeby uniknąć toksycznej akumulacji leku²³⁹. Tymczasem, średni okres półtrwania 5-fluorouracylu – antymetabolitu, którego aktywne formy: 5-fluorourydyna i 5-fluorodezoksyurydyna mają właściwości przeciwnowotworowe, w zależności od dawki wynosi zaledwie 10-20 minut²⁴⁰. Parametr V_{ss} , mierzący dystrybucję w organizmie w stanie równowagi, jest dość niski dla związku BK124 (w zależności od drogi podania pomiędzy 0,39 a 0,29; więcej informacji w tabeli 18), co świadczy o działaniu lokalnym. Dla porównania, objętość dystrybucji winkrystyny w stanie równowagi to $8,4 \pm 3,2$ l/kg²³⁹, dla taksolu waha się on od 5,08 do 17,66 l/kg²⁴⁰, co w obu przypadkach świadczy o wysokiej dystrybucji pozanaczyniowej. Przykładem leku o niskiej wartości dystrybucji jest warfaryna, stosowana w leczeniu i zapobieganiu m.in. zakrzepicy żył głębokich. Wiąże się ona w dużym stopniu z białkami osocza, a jej pozorna objętość dystrybucji wynosi 0,14 l/kg²⁴¹. Można przypuszczać zatem, że BK124 działa lokalnie w miejscu podania albo w granicach krwioobiegu przy podaniu dożylnym. Jest to istotnym atutem terapeutycznym, ponieważ zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia efektów ubocznych u pacjentów leczonych związkiem BK124.

12.5. BK124 SKUTECZNIE ZWALCZA LUDZKIE KOMÓRKI KRYZY BLASTYCZNEJ

Eksperymenty *in vivo* pokazały, że związek BK124 skutecznie hamował rozwój guza składającego się z ludzkich komórek K562, pochodzących z kryzy blastycznej. Co ważne, zastosowanie efektywnych antynowotworowo dawek BK124, nie wywoływało toksyczności *in vivo*. Ponadto, użycie imatinibu i BK124 jako ko-terapii nie dawało efektu addytywnego, co mogłoby sugerować podobny (do pewnego stopnia) mechanizm działania obu związków. Związek BK124 nie jest jednak specyficznym inhibitorem kinazy BCR-ABL, zatem wiązanie do niej, jeśli jest obecne, może mieć charakter niespecyficzny.

Jako że związek posiada korzystne parametry farmakokinetyczne, a jego stężenie we krwi opada stopniowo, myszy z ksenotransplantatem komórek K562 były nastrzykiwane raz dziennie. Z eksperymentów w modelu mysim i szczurzym wynika, że związek może być bezpiecznie podany dożylnie (szczur) lub dootrzewnowo (mysz) i skutecznie hamuje wzrost nowotworowego ksenotransplantatu. Nie występowały przy tym objawy toksyczności *in vivo*, takie jak znaczne obniżenie liczby poszczególnych elementów morfotycznych krwi ani

powiększenie się organów kluczowych dla detoksykacji organizmu, takich jak wątroba, śledziona czy nerki.

12.6. BK124 JEST CYTOTOKSYCZNY WZGLĘDEM KOMÓREK OPORNYCH NA CHEMIOTERAPIĘ

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono pogłębioną analizę cytotoksycznego wpływu związku BK124 na komórki białaczki, a także możliwość użycia oraz skuteczność działania związku w modelu zwierzęcym. Pomimo licznych zalet aktualnie dostępnych metod terapeutycznych, problem uodparniania się komórek nowotworu na leczenie nie został przezwyciężony. W związku z faktem, że w przewlekłej białaczce szpikowej powszechnie stosuje się inhibitory kinazy tyrozynowej BCR-ABL1, mechanizmy oporności na leczenie dzielimy na zależne od BCR-ABL1 oraz niezależne od BCR-ABL1 (**rycina 6**). Już podczas pierwszej większej próby klinicznej badającej skuteczność imatinibu, zaobserwowano, że większość pacjentów w zaawansowanych stadiach białaczki szybko uodparnia się na działanie leku.

12.6.1. MDR1

Oporność pierwotna na imatinib jest często spowodowana mechanizmami niezwiązanymi z BCR-ABL1. Jednym z nich jest wzrost poziomu białek transportujących cząsteczki z albo do wnętrza komórki, takich jak MDR1. Inną przyczyną oporności są komórki macierzyste białaczki (LSCs), które bardzo często wykazują pierwotną chemiooporność, ponieważ nie dzielą się tak intensywnie jak komórki nowotworu (tj. znajdują się w stanie wyciszenia, ang. *quiescence*)²⁴² oraz posiadają wyjściowo wysoką ekspresję białek związanych z opornością, takich jak transportery ABC. Wysoką aktywność MDR1, korelującą z chemioopornością, znaleziono przede wszystkim w komórkach CD34⁺CD38⁻²⁴³. Potrzeba zatem terapeutyków, które są skuteczne wobec komórek macierzystych nowotworu, a także nie są wrażliwe na działanie mechanizmów oporności wielolekowej. W tym kontekście, szczególną cechą związku BK124 jest wysoka toksyczność względem lekoopornych komórek, w tym takich, które aktywnie ekspresyjnie MDR1 lub też białaczkowych komórek macierzystych o fenotypie CD34⁺CD38⁻. Żeby zbadać potencjał związku w leczeniu oporności wielolekowej typu 1, wypróbowano dwie strategie stosowane powszechnie w badaniach nad opornością wielolekową²⁴⁴. Hodując komórki w stałym, subletalnym stężeniu związku pokazano, że przedłużona ekspozycja nie powoduje wzrostu poziomu MDR1, a nawet, badany poziom transkryptyu *ABCB1* w komórkach

zmniejszył się po sześciu miesiącach. Drugą metodą było samodzielne wyprowadzenie linii K562-MDR1. Komórki K562 były w związku z tym hodowane we wzrastających stężeniach cytostatyku winkrystyny aż do uzyskania fenotypu opornego. Kiedy zbadałam wpływ związku na komórki K562-MDR1 zauważyłam, że podobnie jak u osób leczonych przewlekłe imatinibem¹⁴¹, związek BK124 zwiększył odsetek komórek MDR1⁺ w populacji. Prawdopodobnie, efekt ten jest związany z wysokim poziomem czynnika transkrypcyjnego FOXO3a w jądrze zaobserwowanym pod wpływem działania BK124. Białko FOXO3a może wiązać się do proksymalnego regionu promotora genu *ABCB1* i regulować jego ekspresję²⁴⁵. Istnieje również druga możliwość. Jako że populacja komórek K562-MDR1 była heterogenna pod względem ekspresji pompy PgP, w populacji nietraktowanej żadnym lekiem przeciwnowotworowym odsetek komórek PgP-pozytywnych wynosił około 40% (rycina 21 „K562-MDR1”). Jest zatem możliwe, że po dodaniu BK124 apoptoza występowała w pierwszej kolejności w komórkach bez ekspresji pompy, w związku z czym w analizowanej populacji sztucznie wzrastał odsetek komórek MDR1⁺. Niezależnie jednak od przyczyn, ekspresja i poziom pompy PgP nie był wystarczający, żeby umożliwić komórkom K562-MDR1 przetrwanie traktowania związkiem BK124. Parametry IC₅₀ dla komórek K562 oraz K562-MDR1 wyznaczone przy użyciu testów MTT nie różniły się od siebie istotnie. Co więcej, przeprowadzona w tej pracy analiza apoptozy przy użyciu aneksyny V i jodku propidyny wykazała, że apoptoza pozostaje na wysokim poziomie, zwłaszcza w komórkach traktowanych BK124 w stężeniu 5 μM. Zatem, związek BK124 prawdopodobnie nie jest substratem dla pompy MDR1, inaczej niż stosowane w tej chwili inhibitory kinazy tyrozynowej¹⁴⁰. Fenotyp MDR1 jest często obserwowany w reakcji na podobne, stosowane powszechnie leki cytostatyczne, takie jak winkrystyna czy doksorubicyna²⁴⁶. Obecność pompy PgP na powierzchni skutkuje zmniejszeniem wewnątrzkomórkowego stężenia leku, a w konsekwencji niepowodzeniem terapii. Aktualnie są badane różne inhibitory pompy PgP i oporności MDR1 takie jak werapamil, valsopodar (PSC833), biricodar (VX710), tariquidar (XR9576) oraz laniquidar (R101933)²⁴⁴. W ramach prób klinicznych związki te były dotąd testowane w różnych rodzajach nowotworów, jednak charakteryzują się stosunkowo niską wydajnością hamowania PgP i wysoką toksycznością dla pacjenta²⁴⁷. Wyniki nieniejszej pracy pokazały, że związek BK124 jest cytotoksyczny względem komórek, które wykazują znaczny poziom pompy PgP (komórki MDR1+), zatem związek ten może być w przyszłości rozpatrywany jako kandydat na lek w tym rodzaju oporności.

Ciekawym przyszłym wątkiem badawczym byłoby zbadanie wpływu BK124 na inne rodzaje oporności wielolekowej. W rozwój takiego fenotypu zaangażowanych jest 11 różnych genów należących do rodziny transporterów ABC; jest to między innymi glikoproteina P, ale również białka związane z opornością wielolekową (MRPs/ABCCs) oraz białko oporności raka piersi (BCRP/ABCG2)^{248,249}. W białaczkach ma często miejsce nadekspresja MPR1, co uodparnia je na wiele różnych leków przeciwnowotworowych takich jak na przykład alkaloidy *vinca* albo antracykliny, a także niektóre inhibitory kinazy tyrozynowej²⁵⁰⁻²⁵².

12.6.2. Komórki LSCs

Z punktu widzenia przyszłego zastosowania terapeutycznego, szczególnie interesującą własnością badanego związku jest wysoka toksyczność względem komórek CD34⁺. Co istotne, wyznaczony w tym przypadku parametr IC₅₀ był niższy niż dla linii komórkowej K562 (odpowiednio IC₅₀ = 1,51 μM oraz IC₅₀ = 2,5 μM). Wyniki tej pracy wskazały też, że szczególnie niebezpieczna subpopulacja komórek LSC o fenotypie CD34⁺ CD38⁻ jest wrażliwa na działanie leku. Ponieważ istnieje ryzyko, że tak wysoka cytotoksyczność BK124 mogłaby zmniejszyć zasób prawidłowych hematopoetycznych komórek macierzystych, należałoby zbadać populację prawidłowych komórek CD34⁺CD38⁻. Jednakże, badania pokazały, że komórki macierzyste białaczki (LSC) oraz prawidłowe hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC) dzielą markery powierzchniowe. Pierwotnie uważano, że odróżnia je brak ekspresji CD38 na komórkach macierzystych nowotworu. Okazało się jednak, że komórki LSC nie są populacją homogeną (inaczej niż HSC) i wykazują się dużą zmiennością^{242,253}. Chociaż badania wyodrębniły obiecujące markery dla komórek LSC, takie jak obecność np. CD25 i CD32, CD96 i CLEC12A na powierzchni komórki, a także różnice funkcjonalne, takie jak na przykład niskie stężenie wolnych rodników w populacji LSC, wciąż nie są one powtarzalnie wykrywane u każdego pacjenta. Zatem, na ten moment, nie ma opracowanych dobrych markerów odróżniających populację komórek LSC od komórek HSC ze względu na duże zróżnicowanie komórek LSC między pacjentami, ale też również w obrębie jednego pacjenta²⁴². Opracowywane są terapie w oparciu o różnicę w biologii molekularnej komórek LSC i HSC, na przykład inhibitory szlaków Wnt/β-*kat*enina²⁵⁴, Hedgehog²⁵⁵, PI3K-AKT²⁵⁶, a także JAK-STAT²⁵⁷. Jednakże na ten moment nie potwierdzono korzystnych efektów terapeutycznych w próbach klinicznych²¹⁵.

Kolejną ważną kwestią jest pochodzenie badanych komórek macierzystych. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy analizowane były komórki pochodzące z krwi obwodowej,

co nie uwzględnia ogromnego wpływu ochronnego mikrośrodowiska szpiku kostnego, w którym komórki macierzyste zazwyczaj rezydują. Zatem, aby w pełni ocenić potencjał związku BK124 w tym aspekcie, w przyszłości należy uwzględnić skuteczność tego związku wobec komórek macierzystych w kontekście wpływu mikrośrodowiska szpiku kostnego.

Aktywność związku BK124 nie ogranicza się do komórek przewlekłej białaczki szpikowej. Charakteryzuje go również wysoka cytotoksyczność względem ostrej białaczki szpikowej (AML)¹⁹¹. Jest to choroba, w której standardowo stosowane leki – cytarbina i daunorubicyna, pozostają nieskuteczne⁹⁵, a komórki nie posiadają zbyt wielu charakterystycznych neoantygenów, co utrudnia dostosowanie terapii celowanej²⁵⁸. Jako że związek BK124 indukuje śmiertelność w komórkach LSC przewlekłej białaczki szpikowej oraz wykazuje wysoką cytotoksyczność względem komórek ostrej białaczki szpikowej, w przyszłości może posłużyć do leczenia również tego rodzaju białaczek.

Aktywność cytotoksyczna BK124 względem komórek białaczki oraz w liniach komórkowych, charakteryzujących się wysoką lekoopornością, jest przedmiotem polskiego patentu o numerze zgłoszenia P.437038 z dnia 17.02.2021r. o tytule „Pochodna dikarboksyimidu do zastosowania w leczeniu nowotworów”, którego współautorką jest autorka niniejszej rozprawy.

12.7. PRZYSZŁOŚĆ ROZWOJU BK124 JAKO LEKU PRZECIWNOWOTWOROWEGO

Chociaż nie udało się ustalić dokładnego molekularnego mechanizmu działania BK124 w komórkach nowotworowych, w niniejszej pracy zbadano cytotoksyczność związku i wyjaśniono wpływ związku na główne szlaki białaczkowe i apoptotyczne, a także na cykl komórkowy komórek przewlekłej białaczki szpikowej. Związek BK124 jest potencjalnym lekiem niecelowanym, nie był zaprojektowany jako czynnik modulujący określoną, wybraną onkogeną kinazę czy szlak sygnałowy. Tego typu związki niecelowane od wielu lat stanowią pierwszą linię leczenia w onkologii. Chociaż przyszłością badań nad nowotworami są terapie specyficzne, które minimalizowałyby ryzyko cytotoksyczności dla innych tkanek, istnieją również perspektywy i potrzeby zastosowania substancji uniwersalnych, o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej. Zmniejszenie toksyczności chemioterapii względem tkanek obwodowych może odbywać się na różne sposoby, na przykład poprzez adsorpcję i stopniowe uwalnianie w czasie leku na biodegradowalnym rdzeniu (na przykład na albuminie); używając specyficznych względem nowotworu antygenów na powierzchni nanocząstek lub w

połączeniu z przeciwciałami; albo wykorzystując cechy mikrośrodowiska lub guza samego w sobie, takie jak zwiększona przepuszczalność jego naczyń krwionośnych (ang. *enhanced permeability and retention, EPR*)²⁵⁹. Efekt EPR sprzyja akumulacji leku w nowotworze litym, pozwalając na jego stopniowe uwalnianie w miejscu, w którym jest najbardziej potrzebny. Niewykluczone zatem, że w przyszłości związek BK124, wykazując się wysoką cytotoksycznością względem komórek nowotworu, będzie dobrym substratem dla syntezy takiej nanocząsteczki.

Badania nad nowymi niespecyficznymi lekami przeciwnowotworowymi wciąż są istotne. Tego typu związki pozwalają na szerokie zastosowanie, zwykle nieograniczone do jednego rodzaju nowotworu ani jednego rodzaju antygenu. Zwiększają również zasób terapeutycznych możliwości, zwłaszcza dla chorych dotkniętych opornością wielolekową – leki przeciwnowotworowe, które nie są substratem dla pompy mogą być dla tej grupy pacjentów niezwykle cenne. BK124 prawdopodobnie jest takim lekiem.

Związek BK124 został przetestowany w liniach pochodzących z ostrej i przewlekłej białaczki szpikowej i limfoidalnej, wykazując wysoką aktywność cytotoksyczną ($IC_{50} < 10 \mu M$). Niniejsza praca opisała działanie związku w linii pochodzącej z przewlekłej białaczki szpikowej, jednakże równie interesujące jest działanie związku w innych nowotworach, na przykład w szpiczaku mnogim. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych w medycynie dikarboksyimidów (leczenie szpiczaka mnogiego oraz zespołu mielodysplastycznego) jest pochodna ftalimidu – talidomid oraz jego analogi - lenalidomid i pomalidomid, zwane zbiorczo jako IMiDs (ang. *Immunomodulatory imide drug*, imidowe leki immunomodulacyjne). Aktywność tych związków na poziomie molekularnym związana jest z obniżeniem aktywności czynników transkrypcyjnych IKZF1 oraz IKZF3, co wywiera efekt cytotoksyczny oraz immunomodulacyjny¹⁵⁸. Dzięki podobieństwu strukturalnemu do talidomidu, BK124 również obniża ekspresję czynników transkrypcyjnych IKZF1 oraz IKZF3 (ang. *ikraros zing finger*)²²⁵. Interesującym pytaniem byłoby zatem, czy BK124 również stymuluje układ odpornościowy (efekt immunomodulacyjny), co mogłoby być alternatywnym leczeniem w szpiczaku mnogim, ale i w innych chorobach, w których aktywacja lub supresja aktywności układu immunologicznego jest cenna.

Rozdział 13. Podsumowanie i wnioski

1. Związek BK124 jest cytotoksyczny dla ludzkich komórek przewlekłej białaczki szpikowej linii K562, pochodzącej z kryzy blastycznej ($IC_{50} = 2,5 \mu M$). Indukuje on śmierć komórkową na drodze apoptozy poprzez aktywację kaspazy-9, a następnie kaspazy-8 i 3 oraz polimerazy PARP.
2. Inkubacja komórek K562 ze związkiem BK124 prowadzi do obniżenia poziomu białek szlaków sygnałowych związanych z przeżyciem i proliferacją komórki, takich jak BCR-ABL1, STAT5, AKT, mTOR, NF- κ B. BK124 aktywuje też kinazy MAP, takie jak p38MAPK oraz JNK. Aktywność tych kinaz może sprzyjać jądrowej lokalizacji białek FOXO3a oraz p21^{Cip1/Waf1} poprzez oddziaływanie z kinazą AKT. Indukowany przez BK124 wzrost poziomu białka p21^{Cip1/Waf1} oraz czynnika transkrypcyjnego FOXO3A w jądrze komórkowym skutkuje zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G2/M.
3. BK124 może być bezpiecznie podany zwierzęciu w nietoksycznej mieszance 10% Solutolu HS oraz 10% etanolu w soli fizjologicznej i wykazuje korzystne z perspektywy terapii parametry farmakokinetyczne (okres półtrwania związku w krwioobiegu wynosił od 3 do 5 godzin). Podanie dootrzewnowe myszy NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ związku BK124 w dawce 20 mg/kg masy ciała nie powoduje widocznej toksyczności i hamuje tworzenie guza z ludzkich komórek K562, co świadczy o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej BK124 *in vivo*.
4. Związek BK124 skutecznie zwalcza komórki K562 z opornością wielolewkową typu 1 (K562-MDR1; $IC_{50} = 2,35 \mu M$) i prawdopodobnie nie jest substratem dla pompy MDR1.
5. Komórki K562 hodowane sześć miesięcy w obecności związku BK124 w stałym, subletalnym stężeniu nie uodporniły się na jego działanie ($IC_{50} = 2,5 \mu M$ dla komórek hodowanych w $1 \mu M$ roztworze BK124; $IC_{50} = 2,6 \mu M$ dla komórek hodowanych w $2 \mu M$ roztworze BK124); co więcej, w komórkach tych spadł poziom ekspresji genu *ABCB1*. Zatem, związek BK124 nie indukuje oporności wielolekowej typu 1 (MDR1).
6. Komórki macierzyste i progenitorowe CD34⁺ wyizolowane z krwi obwodowej pacjentów w fazie chronicznej przewlekłej białaczki szpikowej są wrażliwe na działanie BK124 ($IC_{50} = 1,5 \mu M$). Związek jest też toksyczny dla subpopulacji inicjującej wzrost guza - komórek CD34⁺CD38⁻.

Przedstawione wyniki badań przedklinicznych pokazują szczególne zalety BK124 jako potencjalnego nowego leku przeciwnowotworowego. Przyszły rozwój związku BK124 może przyczynić się do opracowania nowych terapii dla pacjentów onkologicznych, w szczególności chorych dotkniętych przewlekłą białaczką szpikową niewrażliwych albo odpornych na imatinib.

Bibliografia

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA A Cancer J Clinicians*. 2022;72(1):7-33. doi:10.3322/caac.21708
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
3. Wojciechowska U, Barańska K, Michałek I, Olasek P, Miklewska Marta, Didkowska J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku. Published online 2022r. Accessed January 19, 2023. https://onkologia.org.pl/sites/default/files/publications/2023-01/nowotwory_2020.pdf
4. Didkowska J, Wojciechowska U, Olasek P, Caetano dos Santos F, Michałek I. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2019 roku. https://onkologia.org.pl/sites/default/files/publications/2022-05/Nowotwory_2019.pdf
5. Muller HJ. Artificial Transmutation of the Gene. *Science*. 1927;66(1699):84-87. doi:10.1126/science.66.1699.84
6. Hermann J M. Hermann J. Muller – Nobel Lecture. Accessed January 12, 2023. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1946/muller/lecture/>
7. Friedberg EC. *Correcting the Blueprint of Life: An Historical Account of the Discovery of DNA Repair Mechanisms*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
8. Cleaver JE. Defective Repair Replication of DNA in Xeroderma Pigmentosum. *Nature*. 1968;218(5142):652-656. doi:10.1038/218652a0
9. Boveri T. Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of Cell Science*. 2008;121(Supplement_1):1-84. doi:10.1242/jcs.025742
10. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(2):157-162. doi:10.1038/35101031
11. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971;68(4):820-823. doi:10.1073/pnas.68.4.820
12. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 1986;323(6089):643-646. doi:10.1038/323643a0
13. Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979;17(1):43-52. doi:10.1016/0092-8674(79)90293-9
14. Todd R, Wong DT. Oncogenes. *Anticancer Res*. 1999;19(6A):4729-4746.
15. Huebner RJ, Todaro GJ. ONCOGENES OF RNA TUMOR VIRUSES AS DETERMINANTS OF CANCER. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969;64(3):1087-1094. doi:10.1073/pnas.64.3.1087
16. Weinberg RA. Oncogenes and the molecular basis of cancer. *Harvey Lect*. 1984;80:129-136.
17. Shih C, Weinberg RA. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell*. 1982;29(1):161-169. doi:10.1016/0092-8674(82)90100-3
18. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*. 1982;300(5888):149-152. doi:10.1038/300149a0

19. Kufe DW, Holland JF, Frei E, American Cancer Society, eds. *Cancer Medicine* 6. 6th ed. BC Decker; 2003.
20. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers--a review. *Cancer Detect Prev.* 2000;24(1):1-12.
21. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature.* 1983;305(5931):245-248. doi:10.1038/305245a0
22. Rodenhuis S. ras and human tumors. *Semin Cancer Biol.* 1992;3(4):241-247.
23. Siebert R, Matthiesen P, Harder S, et al. Application of interphase fluorescence in situ Hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphomas. *Blood.* 1998;91(3):984-990.
24. Peycheva M, Neumann T, Malzl D, Nazarova M, Schoeberl UE, Pavri R. DNA replication timing directly regulates the frequency of oncogenic chromosomal translocations. *Science.* 2022;377(6612):eabj5502. doi:10.1126/science.abj5502
25. Bisso A, Sabò A, Amati B. MYC in Germinal Center-derived lymphomas: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Immunol Rev.* 2019;288(1):178-197. doi:10.1111/imr.12734
26. Martín-Subero JI, Harder L, Gesk S, et al. Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. *Int J Cancer.* 2002;98(3):470-474. doi:10.1002/ijc.10169
27. The Philadelphia Chromosome and Leukemia. *Can Med Assoc J.* 1961;84(20):1142.
28. The Philadelphia Chromosome. *The Lancet.* 1961;277(7174):433-434. doi:10.1016/S0140-6736(61)90009-5
29. Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* Published online July 1960. doi:10.1093/jnci/25.1.85
30. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960;(132):1497.
31. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561-566. doi:10.1038/nature05945
32. Duyster J, Bai RY, Morris SW. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene.* 2001;20(40):5623-5637. doi:10.1038/sj.onc.1204594
33. Ferrara MG, Di Noia V, D'Argento E, et al. Oncogene-Addicted Non-Small-Cell Lung Cancer: Treatment Opportunities and Future Perspectives. *Cancers.* 2020;12(5):1196. doi:10.3390/cancers12051196
34. Lei Y, Lei Y, Shi X, Wang J. EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2022;24(2):277. doi:10.3892/ol.2022.13397
35. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38(7):867-871. doi:10.1016/s0959-8049(02)00040-0
36. Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science.* 1997;275(5307):1784-1787. doi:10.1126/science.275.5307.1784
37. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, et al. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell.* 2015;161(7):1539-1552. doi:10.1016/j.cell.2015.05.033
38. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 2001;3(4):433-438. doi:10.1038/35070129

39. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):753-762. doi:10.1016/S1470-2045(10)70130-3
40. Smit WL, Spaan CN, Johannes de Boer R, et al. Driver mutations of the adenoma-carcinoma sequence govern the intestinal epithelial global translational capacity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(41):25560-25570. doi:10.1073/pnas.1912772117
41. Adamowicz M, Stukan I, Milkiewicz P, Bialek A, Milkiewicz M, Kempinska-Podhorodecka A. Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. *IJMS.* 2022;23(9):4905. doi:10.3390/ijms23094905
42. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. :29.
43. Whiteley AE, Price TT, Cantelli G, Sipkins DA. Leukaemia: a model metastatic disease. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(7):461-475. doi:10.1038/s41568-021-00355-z
44. Rafiq S, Raza MH, Younas M, et al. Molecular Targets of Curcumin and Future Therapeutic Role in Leukemia. *JBM.* 2018;06(04):33-50. doi:10.4236/jbm.2018.64003
45. Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood.* 2017;129(12):1595-1606. doi:10.1182/blood-2016-09-696013
46. Szczeklik A. *Interna Szczeklika: mały podręcznik 2022/23.* Wydanie XIV. Medycyna Praktyczna : Polski Instytut Evidence Based Medicine; 2022.
47. Braun TP, Eide CA, Druker BJ. Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. *Cancer Cell.* 2020;37(4):530-542. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.006
48. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood.* 1984;63(4):789-799.
49. Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(11):850-858. doi:10.1093/jnci/90.11.850
50. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood.* 2011;118(3):686-692. doi:10.1182/blood-2010-12-319038
51. Pffirmann M, Baccarani M, Saussele S, et al. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2016;30(1):48-56. doi:10.1038/leu.2015.261
52. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243(5405):290-293. doi:10.1038/243290a0
53. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *The American Journal of Medicine.* 1977;63(1):125-130. doi:10.1016/0002-9343(77)90124-3
54. Zhang X, Ren R. Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1998;92(10):3829-3840.
55. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009;113(8):1619-1630. doi:10.1182/blood-2008-03-144790

56. Brehme M, Hantschel O, Colinge J, et al. Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(18):7414-7419. doi:10.1073/pnas.0900653106
57. Dorsey JF, Cunnick JM, Mane SM, Wu J. Regulation of the Erk2-Elk1 signaling pathway and megakaryocytic differentiation of Bcr-Abl(+) K562 leukemic cells by Gab2. *Blood*. 2002;99(4):1388-1397. doi:10.1182/blood.v99.4.1388
58. Gallipoli P, Cook A, Rhodes S, et al. JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2014;124(9):1492-1501. doi:10.1182/blood-2013-12-545640
59. He Y, Wertheim JA, Xu L, et al. The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl. *Blood*. 2002;99(8):2957-2968. doi:10.1182/blood.v99.8.2957
60. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*. 1993;75(1):175-185.
61. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-1630. doi:10.1182/blood-2008-03-144790
62. Sonoyama J, Matsumura I, Ezo S, et al. Functional cooperation among Ras, STAT5, and phosphatidylinositol 3-kinase is required for full oncogenic activities of BCR/ABL in K562 cells. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8076-8082. doi:10.1074/jbc.M111501200
63. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004;18(2):189-218. doi:10.1038/sj.leu.2403241
64. Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*. 2000;95(1):19-29.
65. Grundschober E, Hoelbl-Kovacic A, Bhagwat N, et al. Acceleration of Bcr-Abl+ leukemia induced by deletion of JAK2. *Leukemia*. 2014;28(9):1918-1922. doi:10.1038/leu.2014.152
66. Carrà G, Torti D, Crivellaro S, et al. The BCR-ABL/NF-κB signal transduction network: a long lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias. *Oncotarget*. 2016;7(40):66287-66298. doi:10.18632/oncotarget.11507
67. Vincent AJ, Ren S, Harris LG, et al. Cytoplasmic translocation of p21 mediates NUPR1-induced chemoresistance: NUPR1 and p21 in chemoresistance. *FEBS Lett*. 2012;586(19):3429-3434. doi:10.1016/j.febslet.2012.07.063
68. Koster R, di Pietro A, Timmer-Bosscha H, et al. Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3594-3605. doi:10.1172/JCI41939
69. Héliez C, Baricault L, Barboule N, Valette A. Paclitaxel increases p21 synthesis and accumulation of its AKT-phosphorylated form in the cytoplasm of cancer cells. *Oncogene*. 2003;22(21):3260-3268. doi:10.1038/sj.onc.1206409
70. Maiuthed A, Ninsontia C, Erlenbach-Wuensch K, et al. Cytoplasmic p21 Mediates 5-Fluorouracil Resistance by Inhibiting Pro-Apoptotic Chk2. *Cancers (Basel)*. 2018;10(10):373. doi:10.3390/cancers10100373
71. Kreis NN, Louwen F, Yuan J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9):1220. doi:10.3390/cancers11091220
72. Kreis NN, Louwen F, Yuan J. Less understood issues: p21(Cip1) in mitosis and its therapeutic potential. *Oncogene*. 2015;34(14):1758-1767. doi:10.1038/onc.2014.133

73. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(6):400-414. doi:10.1038/nrc2657
74. Gartel AL. The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. *Leuk Res*. 2005;29(11):1237-1238. doi:10.1016/j.leukres.2005.04.023
75. Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J. Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation. *Cell*. 2004;117(2):211-223. doi:10.1016/S0092-8674(04)00298-3
76. Fasano C, Disciglio V, Bertora S, Lepore Signorile M, Simone C. FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. *Cells*. 2019;8(9):1110. doi:10.3390/cells8091110
77. Tran H, Brunet A, Grenier JM, et al. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*. 2002;296(5567):530-534. doi:10.1126/science.1068712
78. Lim SW, Jin L, Luo K, et al. Klotho enhances FoxO3-mediated manganese superoxide dismutase expression by negatively regulating PI3K/AKT pathway during tacrolimus-induced oxidative stress. *Cell Death Dis*. 2017;8(8):e2972. doi:10.1038/cddis.2017.365
79. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*. 1999;96(6):857-868. doi:10.1016/S0092-8674(00)80595-4
80. Birkenkamp KU, Essafi A, van der Vos KE, et al. FOXO3a Induces Differentiation of Bcr-Abl-transformed Cells through Transcriptional Down-regulation of Id1. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(4):2211-2220. doi:10.1074/jbc.M606669200
81. Liu Y, Ao X, Ding W, et al. Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Mol Cancer*. 2018;17(1):104. doi:10.1186/s12943-018-0856-3
82. Eijkelenboom A, Burgering BMT. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(2):83-97. doi:10.1038/nrm3507
83. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002;12(1):9-18. doi:10.1038/sj.cr.7290105
84. Takenaka K, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science*. 1998;280(5363):599-602. doi:10.1126/science.280.5363.599
85. Dong Y, Xiong M, Duan L, et al. H2AX phosphorylation regulated by p38 is involved in Bim expression and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells induced by imatinib. *Apoptosis*. 2014;19(8):1281-1292. doi:10.1007/s10495-014-0997-9
86. Kuo YH, Wei SH, Jiang JH, et al. Perturbation of p38 α MAPK as a Novel Strategy to Effectively Sensitize Chronic Myeloid Leukemia Cells to Therapeutic BCR-ABL Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12573. doi:10.3390/ijms222212573
87. Akgun-Cagliyan G, Cort-Donmez A, Kilic-Toprak E, Altintas F. Verbascoside potentiates the effect of tyrosine kinase inhibitors on the induction of apoptosis and oxidative stress via the Abl-mediated MAPK signalling pathway in chronic myeloid leukaemia. *Exp Ther Med*. 2022;24(2):514. doi:10.3892/etm.2022.11441
88. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275-292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024
89. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*. 1889;133(3421):571-573. doi:10.1016/S0140-6736(00)49915-0
90. Fidler IJ, Poste G. The "seed and soil" hypothesis revisited. *The Lancet Oncology*. 2008;9(8):808. doi:10.1016/S1470-2045(08)70201-8

91. Phan TG, Croucher PI. The dormant cancer cell life cycle. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(7):398-411. doi:10.1038/s41568-020-0263-0
92. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(5):303-320. doi:10.1038/s41580-019-0103-9
93. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645-648. doi:10.1038/367645a0
94. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
95. Marchand T, Pinho S. Leukemic Stem Cells: From Leukemic Niche Biology to Treatment Opportunities. *Front Immunol*. 2021;12:775128. doi:10.3389/fimmu.2021.775128
96. Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002;99(1):319-325. doi:10.1182/blood.v99.1.319
97. Godavarthy PS, Kumar R, Herkt SC, et al. The vascular bone marrow niche influences outcome in chronic myeloid leukemia *via* the E-selectin - SCL/TAL1 - CD44 axis. *Haematologica*. 2020;105(1):136-147. doi:10.3324/haematol.2018.212365
98. Huh HD, Kim S. History of Radiation Therapy Technology. *Progress in Medical Physics*. 2020;31(3):124-134. doi:10.14316/pmp.2020.31.3.124
99. Galeaz C, Totis C, Bisio A. Radiation Resistance: A Matter of Transcription Factors. *Front Oncol*. 2021;11:662840. doi:10.3389/fonc.2021.662840
100. Krumbhaar EB, Krumbhaar HD. The Blood and Bone Marrow in Yelloe Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning: Changes produced in the Bone Marrow of Fatal Cases. *J Med Res*. 1919;40(3):497-508.3.
101. Goodman LS, Wintrobe MM. Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc*. 1946;132:126-132. doi:10.1001/jama.1946.02870380008004
102. Christakis P. The birth of chemotherapy at Yale. Bicentennial lecture series: Surgery Grand Round. *Yale J Biol Med*. 2011;84(2):169-172.
103. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *N Engl J Med*. 1948;238(23):787-793. doi:10.1056/NEJM194806032382301
104. Maksimovic V, Pavlovic-Popovic Z, Vukmirovic S, et al. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Mol Biol Rep*. 2020;47(6):4699-4708. doi:10.1007/s11033-020-05481-9
105. Miller DR. A tribute to Sidney Farber - the father of modern chemotherapy. *Br J Haematol*. 2006;134(1):20-26. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06119.x
106. Tilsed CM, Fisher SA, Nowak AK, Lake RA, Lesterhuis WJ. Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Front Oncol*. 2022;12:960317. doi:10.3389/fonc.2022.960317
107. Gascoigne KE, Taylor SS. Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell*. 2008;14(2):111-122. doi:10.1016/j.ccr.2008.07.002
108. Joensuu H, Dimitrijevic S. Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) as an anticancer agent for solid tumours. *Ann Med*. 2001;33(7):451-455. doi:10.3109/07853890109002093

109. Cohen P, Cross D, Jänne PA. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(7):551-569. doi:10.1038/s41573-021-00195-4
110. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med.* 2002;346(9):645-652. doi:10.1056/NEJMoa011573
111. Etienne G, Guilhot J, Rea D, et al. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2017;35(3):298-305. doi:10.1200/JCO.2016.68.2914
112. Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood.* 2013;122(4):515-522. doi:10.1182/blood-2013-02-483750
113. Saussele S, Richter J, Guilhot J, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *The Lancet Oncology.* 2018;19(6):747-757. doi:10.1016/S1470-2045(18)30192-X
114. Shah NP, García-Gutiérrez V, Jiménez-Velasco A, et al. Dasatinib discontinuation in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia and stable deep molecular response: the DASFREE study. *Leukemia & Lymphoma.* 2020;61(3):650-659. doi:10.1080/10428194.2019.1675879
115. Flynn KE, Weinfurt KP, Lin L, et al. Patient-Reported Outcome Results from the U.S. Life after Stopping TKIs (LAST) Study in Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Blood.* 2019;134(Supplement_1):705-705. doi:10.1182/blood-2019-126002
116. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020;34(4):966-984. doi:10.1038/s41375-020-0776-2
117. Schürch C, Riether C, Amrein MA, Ochsenbein AF. Cytotoxic T cells induce proliferation of chronic myeloid leukemia stem cells by secreting interferon- γ . *J Exp Med.* 2013;210(3):605-621. doi:10.1084/jem.20121229
118. Pye SM, Cortes J, Ault P, et al. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood.* 2008;111(12):5505-5508. doi:10.1182/blood-2007-10-114900
119. Salem W, Li K, Krapp C, et al. Imatinib treatments have long-term impact on placentation and embryo survival. *Sci Rep.* 2019;9(1):2535. doi:10.1038/s41598-019-39134-0
120. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *CDR.* Published online 2019. doi:10.20517/cdr.2019.10
121. Singh DD, Yadav DK. TNBC: Potential Targeting of Multiple Receptors for a Therapeutic Breakthrough, Nanomedicine, and Immunotherapy. *Biomedicines.* 2021;9(8):876. doi:10.3390/biomedicines9080876
122. Fassi A, Brain C, Abu-Remaileh M, et al. Increased lysosomal biomass is responsible for the resistance of triple-negative breast cancers to CDK4/6 inhibition. *Sci Adv.* 2020;6(25):eabb2210. doi:10.1126/sciadv.abb2210
123. Casaluze F, Sgambato A, Maione P, et al. ALK inhibitors: a new targeted therapy in the treatment of advanced NSCLC. *Targ Oncol.* 2013;8(1):55-67. doi:10.1007/s11523-012-0250-9
124. Lai Y, Kacal M, Kanony M, et al. miR-100-5p confers resistance to ALK tyrosine kinase inhibitors Crizotinib and Lorlatinib in EML4-ALK positive NSCLC. *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications.* 2019;511(2):260-265.
doi:10.1016/j.bbrc.2019.02.016
125. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers. *Sci Transl Med.* 2012;4(120). doi:10.1126/scitranslmed.3003316
 126. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001;293(5531):876-880. doi:10.1126/science.1062538
 127. Alves R, Gonçalves AC, Rutella S, et al. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia—From Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. *Cancers.* 2021;13(19):4820. doi:10.3390/cancers13194820
 128. Kaehler M, Cascorbi I. Pharmacogenomics of Impaired Tyrosine Kinase Inhibitor Response: Lessons Learned From Chronic Myelogenous Leukemia. *Front Pharmacol.* 2021;12:696960. doi:10.3389/fphar.2021.696960
 129. Valent P. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches. *Biologics.* 2007;1(4):433-448.
 130. Eiring AM, Deininger MW. Individualizing kinase-targeted cancer therapy: the paradigm of chronic myeloid leukemia. *Genome Biol.* 2014;15(9):461. doi:10.1186/s13059-014-0461-8
 131. Hoemberger M, Pitsawong W, Kern D. Cumulative mechanism of several major imatinib-resistant mutations in Abl kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(32):19221-19227. doi:10.1073/pnas.1919221117
 132. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, et al. A Phase 2 Trial of Ponatinib in Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias. *N Engl J Med.* 2013;369(19):1783-1796. doi:10.1056/NEJMoa1306494
 133. Saikia T. The Cure of Chronic Myeloid Leukemia: Are We There Yet? *Curr Oncol Rep.* 2018;20(2):12. doi:10.1007/s11912-018-0665-2
 134. Tan FH, Putoczki TL, Stylli SS, Luwor RB. Ponatinib: a novel multi-tyrosine kinase inhibitor against human malignancies. *Onco Targets Ther.* 2019;12:635-645. doi:10.2147/OTT.S189391
 135. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976;455(1):152-162. doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7
 136. White DL, Saunders VA, Dang P, et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood.* 2007;110(12):4064-4072. doi:10.1182/blood-2007-06-093617
 137. White DL, Saunders VA, Dang P, et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood.* 2006;108(2):697-704. doi:10.1182/blood-2005-11-4687
 138. Shoji T. ATP-binding cassette and multidrug and toxic compound extrusion transporters in plants: a common theme among diverse detoxification mechanisms. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2014;309:303-346. doi:10.1016/B978-0-12-800255-1.00006-5
 139. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *IJMS.* 2020;21(9):3233. doi:10.3390/ijms21093233

140. Loscocco F, Visani G, Ruzzo A, et al. Clinical Relevance of ABCB1, ABCG2, and ABCC2 Gene Polymorphisms in Chronic Myeloid Leukemia Patients Treated With Nilotinib. *Front Oncol.* 2021;11:672287. doi:10.3389/fonc.2021.672287
141. Rinaldetti S, Pfirrmann M, Manz K, et al. Effect of ABCG2 , OCT1 , and ABCB1 (MDR1) Gene Expression on Treatment-Free Remission in a EURO-SKI Subtrial. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* 2018;18(4):266-271. doi:10.1016/j.clml.2018.02.004
142. D’Cunha R, Bae S, Murry DJ, An G. TKI combination therapy: strategy to enhance dasatinib uptake by inhibiting Pgp- and BCRP-mediated efflux. *Biopharmaceutics & Drug Disposition.* 2016;37(7):397-408. doi:10.1002/bdd.2022
143. Harivenkatesh N, Kumar L, Bakhshi S, et al. Influence of MDR1 and CYP3A5 genetic polymorphisms on trough levels and therapeutic response of imatinib in newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia. *Pharmacol Res.* 2017;120:138-145. doi:10.1016/j.phrs.2017.03.011
144. Bruckmueller H, Cascorbi I. ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, and ABCC3 drug transporter polymorphisms and their impact on drug bioavailability: what is our current understanding? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2021;17(4):369-396. doi:10.1080/17425255.2021.1876661
145. Watkins DB, Hughes TP, White DL. OCT1 and imatinib transport in CML: is it clinically relevant? *Leukemia.* 2015;29(10):1960-1969. doi:10.1038/leu.2015.170
146. Nies AT, Schaeffeler E, van der Kuip H, et al. Cellular uptake of imatinib into leukemic cells is independent of human organic cation transporter 1 (OCT1). *Clin Cancer Res.* 2014;20(4):985-994. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1999
147. Kim T, Tyndel MS, Zhang Z, et al. Exome sequencing reveals DNMT3A and ASXL1 variants associate with progression of chronic myeloid leukemia after tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leukemia Research.* 2017;59:142-148. doi:10.1016/j.leukres.2017.06.009
148. Branford S, Wang P, Yeung DT, et al. Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. *Blood.* 2018;132(9):948-961. doi:10.1182/blood-2018-02-832253
149. Giotopoulos G, van der Weyden L, Osaki H, et al. A novel mouse model identifies cooperating mutations and therapeutic targets critical for chronic myeloid leukemia progression. *Journal of Experimental Medicine.* 2015;212(10):1551-1569. doi:10.1084/jem.20141661
150. Klümper T, Bruckmueller H, Diewock T, et al. Expression differences of miR-142-5p between treatment-naïve chronic myeloid leukemia patients responding and non-responding to imatinib therapy suggest a link to oncogenic ABL2, SRI, cKIT and MCL1 signaling pathways critical for development of therapy resistance. *Exp Hematol Oncol.* 2020;9(1):26. doi:10.1186/s40164-020-00183-1
151. Litwińska Z, Machaliński B. miRNAs in chronic myeloid leukemia: small molecules, essential function. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(6):1297-1305. doi:10.1080/10428194.2016.1243676
152. Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Buclin T, Decosterd LA. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood.* 2011;117(8):e75-87. doi:10.1182/blood-2010-07-294330
153. Filppula A, Laitila J, Neuvonen P, Backman J. Potent mechanism-based inhibition of CYP3A4 by imatinib explains its liability to interact with CYP3A4 substrates: Imatinib is a

- time-dependent CYP3A4 inhibitor. *British Journal of Pharmacology*. 2012;165(8):2787-2798. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01732.x
154. Gréen H, Skoglund K, Rommel F, Mirghani RA, Lotfi K. CYP3A activity influences imatinib response in patients with chronic myeloid leukemia: a pilot study on in vivo CYP3A activity. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(4):383-386. doi:10.1007/s00228-009-0772-y
 155. Zou Q, Liu M, Liu K, Zhang Y, North BJ, Wang B. E3 ubiquitin ligases in cancer stem cells: key regulators of cancer hallmarks and novel therapeutic opportunities. *Cell Oncol (Dordr)*. Published online February 6, 2023. doi:10.1007/s13402-023-00777-x
 156. van Hagen P, Hulshof MCCM, van Lanschot JJB, et al. Preoperative Chemoradiotherapy for Esophageal or Junctional Cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(22):2074-2084. doi:10.1056/NEJMoa1112088
 157. Krieger RI, Thongsinthusak T. Captan metabolism in humans yields two biomarkers, tetrahydrophthalimide (THPI) and thiazolidine-2-thione-4-carboxylic acid (TTCA) in urine. *Drug Chem Toxicol*. 1993;16(2):207-225. doi:10.3109/01480549309031997
 158. Cippitelli M, Stabile H, Kosta A, et al. Role of Aiolos and Ikaros in the Antitumor and Immunomodulatory Activity of IMiDs in Multiple Myeloma: Better to Lose Than to Find Them. *IJMS*. 2021;22(3):1103. doi:10.3390/ijms22031103
 159. Braña MF, Castellano JM, Roldán CM, Santos A, Vázquez D, Jiménez A. Synthesis and mode(s) of action of a new series of imide derivatives of 3-nitro-1,8 naphthalic acid. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1980;4(1):61-66. doi:10.1007/BF00255461
 160. Braña MF, Ramos A. Naphthalimides as anti-cancer agents: synthesis and biological activity. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2001;1(3):237-255. doi:10.2174/1568011013354624
 161. Nishio A, Uyeki EM. Induction of DNA strand breaks and chromosome abnormalities by an imide derivative of 3-nitro-1,8-naphthalic acid (mitonafide) in Chinese hamster ovary cells. *J Natl Cancer Inst*. 1983;70(6):1097-1102.
 162. Powis G, Kroschel DM, Moore DJ. Sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the antitumor agent benzisoquinolinedione (Nafidimide) employing direct on-column injection of plasma and urine, and its use for pharmacokinetic studies in a dog. *J Chromatogr*. 1985;345(2):402-407. doi:10.1016/0378-4347(85)80179-1
 163. Evans WK, Eisenhauer EA, Cormier Y, et al. Phase II study of amonafide: results of treatment and lessons learned from the study of an investigational agent in previously untreated patients with extensive small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1990;8(3):390-395. doi:10.1200/JCO.1990.8.3.390
 164. Kornek G, Raderer M, Depisch D, et al. Amonafide as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 1994;30A(3):398-400. doi:10.1016/0959-8049(94)90264-x
 165. Scheithauer W, Dittrich C, Kornek G, et al. Phase II study of amonafide in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1991;20(1):63-67. doi:10.1007/BF01833358
 166. Higano CS, Goodman P, Craig JB, et al. Phase II evaluation of amonafide in renal cell carcinoma. A Southwest Oncology Group study. *Invest New Drugs*. 1991;9(4):361-363. doi:10.1007/BF00183582
 167. Linke K, Pazdur R, Abbruzzese JL, et al. Phase II study of amonafide in advanced pancreatic adenocarcinoma. *Invest New Drugs*. 1991;9(4):353-356. doi:10.1007/BF00183580

168. Leichman CG, Tangen C, Macdonald JS, Leimert T, Fleming TR. Phase II trial of amonafide in advanced pancreas cancer. A Southwest Oncology Group study. *Invest New Drugs*. 1993;11(2-3):219-221. doi:10.1007/BF00874159
169. Berger MZ, Kris MG, Gralla RJ, et al. Phase II trial of amonafide in patients with stage III and IV non-small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol*. 1991;14(2):124-126. doi:10.1097/00000421-199104000-00006
170. O'Dwyer PJ, Paul AR, Hudes GR, Walczak J, Ozols RF, Comis RL. Phase II study of amonafide (nafidamide, NSC 308847) in advanced colorectal cancer. *Invest New Drugs*. 1991;9(1):65-67. doi:10.1007/BF00194547
171. Brown TD, Goodman PJ, Fleming T, Macdonald JS, Craig JB, Einstein AB. Phase II trial of amonafide in advanced colorectal cancer: a SouthWest Oncology Group study. *Anticancer Drugs*. 1993;4(1):49-50. doi:10.1097/00001813-199302000-00006
172. Malviya VK, Liu PY, Alberts DS, Surwit EA, Craig JB, Hannigan EV. Evaluation of amonafide in cervical cancer, phase II. A SWOG study. *Am J Clin Oncol*. 1992;15(1):41-44. doi:10.1097/00000421-199202000-00009
173. Perez RP, Nash SL, Ozols RF, Comis RL, O'Dwyer PJ. Phase II study of amonafide in advanced and recurrent sarcoma patients. *Invest New Drugs*. 1992;10(2):99-101. doi:10.1007/BF00873125
174. Gallion HH, Liu PY, Alberts DE, et al. Phase II trial of amonafide in previously treated patients with advanced ovarian cancer: a Southwest Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 1992;46(2):230-232. doi:10.1016/0090-8258(92)90261-g
175. Asbury RF, Blessing JA, Look KY, Clarke-Pearson D, Homesley HD. A Gynecologic Oncology Group phase II study of amonafide (NSC 308847) in epithelial ovarian cancer. *Am J Clin Oncol*. 1993;16(6):529-531. doi:10.1097/00000421-199312000-00015
176. Stone RM, Mazzola E, Neuberg D, et al. Phase III open-label randomized study of cytarabine in combination with amonafide L-malate or daunorubicin as induction therapy for patients with secondary acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2015;33(11):1252-1257. doi:10.1200/JCO.2014.57.0952
177. Machado KE, Oliveira KN de, Santos-Bubniak L, Licínio MA, Nunes RJ, Santos-Silva MC. Evaluation of apoptotic effect of cyclic imide derivatives on murine B16F10 melanoma cells. *Bioorg Med Chem*. 2011;19(21):6285-6291. doi:10.1016/j.bmc.2011.09.008
178. Antonini I, Volpini R, Dal Ben D, Lambertucci C, Cristalli G. Design, synthesis, and biological evaluation of new mitonafide derivatives as potential antitumor drugs. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(18):8440-8446. doi:10.1016/j.bmc.2008.08.027
179. Wu A, Xu Y, Qian X, Wang J, Liu J. Novel naphthalimide derivatives as potential apoptosis-inducing agents: design, synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem*. 2009;44(11):4674-4680. doi:10.1016/j.ejmech.2009.07.011
180. Lv M, Xu H. Overview of naphthalimide analogs as anticancer agents. *Curr Med Chem*. 2009;16(36):4797-4813. doi:10.2174/092986709789909576
181. Machado KE, de Oliveira KN, Andreossi HMS, et al. Apoptotic events induced by maleimides on human acute leukemia cell lines. *Chem Res Toxicol*. 2013;26(12):1904-1916. doi:10.1021/tx400284r
182. Botting J. The History of Thalidomide. *Drug News Perspect*. 2002;15(9):604-611. doi:10.1358/dnp.2002.15.9.840066
183. Miller MT. Thalidomide embryopathy: a model for the study of congenital incomitant horizontal strabismus. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1991;89:623-674.

184. Stirling D, Sherman M, Strauss S. Thalidomide. A surprising recovery. *J Am Pharm Assoc (Wash)*. 1997;NS37(3):306-313.
185. Calabrese L, Resztak K. Thalidomide revisited: pharmacology and clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*. 1998;7(12):2043-2060. doi:10.1517/13543784.7.12.2043
186. Parker PM, Chao N, Nademanee A, et al. Thalidomide as salvage therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 1995;86(9):3604-3609.
187. Fife K, Howard MR, Gracie F, Phillips RH, Bower M. Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma and correlation with HHV8 titre. *Int J STD AIDS*. 1998;9(12):751-755. doi:10.1258/0956462981921512
188. Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999;341(21):1565-1571. doi:10.1056/NEJM199911183412102
189. Zhao Z, Yue J, Ji X, et al. Research progress in biological activities of succinimide derivatives. *Bioorg Chem*. 2021;108:104557. doi:10.1016/j.bioorg.2020.104557
190. Abed HF, Abuwatfa WH, Hussein GA. Redox-Responsive Drug Delivery Systems: A Chemical Perspective. *Nanomaterials*. 2022;12(18):3183. doi:10.3390/nano12183183
191. Kuran B, Napiórkowska M, Kossakowski J, et al. New, Substituted Derivatives of Dicarboximides and their Cytotoxic Properties. *Anticancer Agents Med Chem*. 2016;16(7):852-864. doi:10.2174/1871520616666160223114318
192. Kuran B, Kossakowski J, Cieślak M, et al. Synthesis and biological activity of novel series of heterocyclic compounds containing succinimide moiety. *Heterocyclic Communications*. 2013;19(4):287-296. doi:10.1515/hc-2013-0050
193. Stukan I, Gryzik M, Hoser G, et al. Novel Dicarboximide BK124.1 Breaks Multidrug Resistance and Shows Anticancer Efficacy in Chronic Myeloid Leukemia Preclinical Models and Patients' CD34+/CD38- Leukemia Stem Cells. *Cancers*. 2022;14(15):3641. doi:10.3390/cancers14153641
194. Lozzio BB, Lozzio CB. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res*. 1979;3(6):363-370. doi:10.1016/0145-2126(79)90033-x
195. Law JC, Ritke MK, Yalowich JC, Leder GH, Ferrell RE. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk Res*. 1993;17(12):1045-1050. doi:10.1016/0145-2126(93)90161-d
196. Tsuruo T, Iida H, Nojiri M, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Circumvention of vincristine and Adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. *Cancer Res*. 1983;43(6):2905-2910.
197. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
198. Di Veroli GY, Fornari C, Goldlust I, et al. An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. *Sci Rep*. 2015;5(1):14701. doi:10.1038/srep14701
199. Lee SH, Meng XW, Flatten KS, Loegering DA, Kaufmann SH. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death Differ*. 2013;20(1):64-76. doi:10.1038/cdd.2012.93
200. Gale RP, Apperley J. What Does Chronic Myeloid Leukaemia Tell Us About Other Leukaemias? *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(6):477-479. doi:10.1007/s11899-019-00555-3

201. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 2017;24(8):1380-1389. doi:10.1038/cdd.2017.44
202. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2001;2(1):20-29. doi:10.1002/1439-7633(20010105)2:1<20::AID-CBIC20>3.0.CO;2-X
203. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007;87(1):99-163. doi:10.1152/physrev.00013.2006
204. Nho RS. FoxO3a and disease progression. *WJBC.* 2014;5(3):346. doi:10.4331/wjbc.v5.i3.346
205. Nikaido M, Otani T, Kitagawa N, et al. Anisomycin, a JNK and p38 activator, suppresses cell-cell junction formation in 2D cultures of K38 mouse keratinocyte cells and reduces claudin-7 expression, with an increase of paracellular permeability in 3D cultures. *Histochem Cell Biol.* 2019;151(5):369-384. doi:10.1007/s00418-018-1736-z
206. Macias-Silva M, Vazquez-Victorio G, Hernandez-Damian J. Anisomycin is a Multifunctional Drug: More than Just a Tool to Inhibit Protein Synthesis. *CCB.* 2010;4(2):124-132. doi:10.2174/2212796811004020124
207. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol.* 2008;26(1):127-132. doi:10.1038/nbt1358
208. Zhang J, Tang X, Lu C, et al. Staurosporine aglycone bilaterally regulates ERK1/2 phosphorylation in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008;86(7):424-430. doi:10.1139/y08-061
209. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13681-13686. doi:10.1073/pnas.251194298
210. Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263(3):825-831. doi:10.1006/bbrc.1999.1454
211. Stage TB, Bergmann TK, Kroetz DL. Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel Monotherapy: An Updated Literature Review. *Clin Pharmacokinet.* 2018;57(1):7-19. doi:10.1007/s40262-017-0563-z
212. Jodrell DI, Stewart M, Aird R, et al. 5-fluorouracil steady state pharmacokinetics and outcome in patients receiving protracted venous infusion for advanced colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2001;84(5):600-603. doi:10.1054/bjoc.2000.1664
213. Houshmand M, Simonetti G, Circosta P, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells. *Leukemia.* 2019;33(7):1543-1556. doi:10.1038/s41375-019-0490-0
214. Fathy El-Metwaly N, Aref S, Ayed M, Abdel Hamid M, El-Sokkary A. CD34+/CD38- Stem Cell Burden Could Predict Chronic Myeloid Leukemia Patients' Outcome. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2021;22(10):3237-3243. doi:10.31557/APJCP.2021.22.10.3237
215. Houshmand M, Kazemi A, Anjam Najmedini A, et al. Shedding Light on Targeting Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. *J Clin Med.* 2021;10(24):5805. doi:10.3390/jcm10245805
216. Kwaśnik P, Giannopoulos K. Treatment-Free Remission—A New Aim in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *J Pers Med.* 2021;11(8):697. doi:10.3390/jpm11080697
217. Ito K, Ito K. Leukemia Stem Cells as a Potential Target to Achieve Therapy-Free Remission in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers.* 2021;13(22):5822. doi:10.3390/cancers13225822

218. Tanaka Y, Takeda R, Fukushima T, et al. Eliminating chronic myeloid leukemia stem cells by IRAK1/4 inhibitors. *Nat Commun.* 2022;13(1):271. doi:10.1038/s41467-021-27928-8
219. Luzina EL, Popov AV. Synthesis and anticancer activity evaluation of 3,4-mono- and bicyclosubstituted N-(het)aryl trifluoromethyl succinimides. *J Fluor Chem.* 2014;168:121-127. doi:10.1016/j.jfluchem.2014.09.019
220. Lee JY, Chung TW, Choi HJ, et al. A novel cantharidin analog N-Benzylcantharidinamide reduces the expression of MMP-9 and invasive potentials of Hep3B via inhibiting cytosolic translocation of HuR. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2014;447(2):371-377. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.035
221. Hall I, Wong O, Scovill J. The cytotoxicity of N-pyridinyl and N-quinolinyl substituted derivatives of phthalimide and succinimide. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 1995;49(5):251-258. doi:10.1016/0753-3322(96)82631-X
222. Chen Z, Liang X, Zhang H, et al. A new class of naphthalimide-based antitumor agents that inhibit topoisomerase II and induce lysosomal membrane permeabilization and apoptosis. *J Med Chem.* 2010;53(6):2589-2600. doi:10.1021/jm100025u
223. Xu G, He Q, Yang B, Hu Y. Synthesis and Antitumor Activity of Novel 4-Chloro-3-Arylmaleimide Derivatives. *LDDD.* 2009;6(1):51-55. doi:10.2174/157018009787158490
224. Van Quaquebeke E, Mahieu T, Dumont P, et al. 2,2,2-Trichloro-N-({2-[2-(dimethylamino)ethyl]-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-5-yl}carbamoyl)acetamide (UNBS3157), a novel nonhematotoxic naphthalimide derivative with potent antitumor activity. *J Med Chem.* 2007;50(17):4122-4134. doi:10.1021/jm070315q
225. Cieślak M, Kaźmierczak-Barańska J, Królewska-Golińska K, et al. New Thalidomide-Resembling Dicarboximides Target ABC50 Protein and Show Antileukemic and Immunomodulatory Activities. *Biomolecules.* 2019;9(9):446. doi:10.3390/biom9090446
226. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
227. Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Sikora E. Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence? *Mech Ageing Dev.* 2018;170:13-21. doi:10.1016/j.mad.2017.08.004
228. Das CK, Mandal M, Kögel D. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(4):749-766. doi:10.1007/s10555-018-9727-z
229. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(6):385-392. doi:10.1038/nrm3115
230. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(7):395-417. doi:10.1038/s41571-020-0341-y
231. Al Bitar, Gali-Muhtasib. The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p21cip1/waf1 in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics. *Cancers.* 2019;11(10):1475. doi:10.3390/cancers11101475
232. Nho RS, Hergert P. FoxO3a and disease progression. *World J Biol Chem.* 2014;5(3):346-354. doi:10.4331/wjbc.v5.i3.346
233. Berglind H, Pawitan Y, Kato S, Ishioka C, Soussi T. Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines: a paradigm for cell line cross-contamination. *Cancer Biology & Therapy.* 2008;7(5):699-708. doi:10.4161/cbt.7.5.5712

234. Pezone A, Olivieri F, Napoli MV, Procopio A, Avvedimento EV, Gabrielli A. Inflammation and DNA damage: cause, effect or both. *Nat Rev Rheumatol.* 2023;19(4):200-211. doi:10.1038/s41584-022-00905-1
235. Jin H, Zhang L, He J, Wu M, Jia L, Guo J. Role of FOXO3a Transcription Factor in the Regulation of Liver Oxidative Injury. *Antioxidants.* 2022;11(12):2478. doi:10.3390/antiox11122478
236. Wagner EF, Nebreda ÁR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):537-549. doi:10.1038/nrc2694
237. Cieślak M, Napiórkowska M, Kaźmierczak-Barańska J, et al. New Succinimides with Potent Anticancer Activity: Synthesis, Activation of Stress Signaling Pathways and Characterization of Apoptosis in Leukemia and Cervical Cancer Cells. *IJMS.* 2021;22(9):4318. doi:10.3390/ijms22094318
238. Choi null, Lee null, Cho null. Lipid Peroxidation and Membrane Disruption by Vinclozolin in Dicarboximide-Susceptible and -Resistant Isolates of *Botrytis cinerea*. *Pestic Biochem Physiol.* 1996;55(1):29-39. doi:10.1006/pest.1996.0032
239. Charakterystyka lecznicza produktu leczniczego: Vincristine Teva, 1 mg/ml, roztwór do wstrzykiwań, Pozwolenie nr: 14895. Published online November 2022. <https://rejstrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/>
240. Charakterystyka lecznicza produktu leczniczego: 5-Fluorouracil-Ebewe, 50 mg/ml, roztwór do wstrzykiwań i infuzji, Pozwolenie nr: 4506. Published online January 9, 2013. rejstrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/rpl
241. Charakterystyka lecznicza produktu leczniczego: Warfin, tabletki, Pozwolenie nr: 12463. Published online February 17, 2022. rejstrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/rpl
242. O'Reilly E, Zeinabad HA, Szegezdi E. Hematopoietic versus leukemic stem cell quiescence: Challenges and therapeutic opportunities. *Blood Reviews.* 2021;50:100850. doi:10.1016/j.blre.2021.100850
243. Ho MM, Hogge DE, Ling V. MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology.* 2008;36(4):433-442. doi:10.1016/j.exphem.2007.11.014
244. Wang J, Seebacher N, Shi H, Kan Q, Duan Z. Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget.* 2017;8(48):84559-84571. doi:10.18632/oncotarget.19187
245. Hui RY, Francis RE, Guest SK, et al. Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene *ABCB1* (*MDR1*) in K562 leukemic cells. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(3):670-678. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0397
246. McQuerry JA, Chen J, Chang JT, Bild AH. Tepoxalin increases chemotherapy efficacy in drug-resistant breast cancer cells overexpressing the multidrug transporter gene *ABCB1*. *Transl Oncol.* 2021;14(10):101181. doi:10.1016/j.tranon.2021.101181
247. Chung FS, Santiago JS, Jesus MFMD, Trinidad CV, See MFE. Disrupting P-glycoprotein function in clinical settings: what can we learn from the fundamental aspects of this transporter? *Am J Cancer Res.* 2016;6(8):1583-1598.
248. Liu X, Pan G, eds. *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity.* Vol 1141. Springer Singapore; 2019. doi:10.1007/978-981-13-7647-4
249. Catalano A, Iacopetta D, Ceramella J, et al. Multidrug Resistance (MDR): A Widespread Phenomenon in Pharmacological Therapies. *Molecules.* 2022;27(3):616. doi:10.3390/molecules27030616

250. Nooter K, Westerman AM, Flens MJ, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin Cancer Res.* 1995;1(11):1301-1310.
251. Hegedűs T, Órfi L, Seprődi A, Váradi A, Sarkadi B, Kéri G. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2002;1587(2-3):318-325. doi:10.1016/S0925-4439(02)00095-9
252. Elfadadny A, El-Husseiny HM, Abugomaa A, et al. Role of multidrug resistance-associated proteins in cancer therapeutics: past, present, and future perspectives. *Environ Sci Pollut Res.* 2021;28(36):49447-49466. doi:10.1007/s11356-021-15759-5
253. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34⁻ fraction. *Blood.* 2010;115(10):1976-1984. doi:10.1182/blood-2009-02-206565
254. Zhou H, Mak PY, Mu H, et al. Combined inhibition of β -catenin and Bcr-Abl synergistically targets tyrosine kinase inhibitor-resistant blast crisis chronic myeloid leukemia blasts and progenitors in vitro and in vivo. *Leukemia.* 2017;31(10):2065-2074. doi:10.1038/leu.2017.87
255. Cea M, Cagnetta A, Cirmena G, et al. Tracking molecular relapse of chronic myeloid leukemia by measuring Hedgehog signaling status. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(2):342-352. doi:10.3109/10428194.2012.708752
256. Airiau K, Mahon FX, Josselin M, Jeanneteau M, Belloc F. PI3K/mTOR pathway inhibitors sensitize chronic myeloid leukemia stem cells to nilotinib and restore the response of progenitors to nilotinib in the presence of stem cell factor. *Cell Death Dis.* 2013;4(10):e827. doi:10.1038/cddis.2013.309
257. Patel SB, Nemkov T, Stefanoni D, et al. Metabolic alterations mediated by STAT3 promotes drug persistence in CML. *Leukemia.* 2021;35(12):3371-3382. doi:10.1038/s41375-021-01315-0
258. Gale RP. Can Immune Therapy Cure Acute Myeloid Leukemia? *Curr Treat Options Oncol.* Published online March 22, 2023. doi:10.1007/s11864-023-01066-3
259. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):941-951. doi:10.1038/nbt.3330

Publikacje wchodzące w skład w pracy doktorskiej:

Stukan I, Gryzik M, Hoser G, Want A, Grabowska-Pyrzewicz W, Zdioruk M, Napiórkowska M, Cieślak M, Królewska-Golińska K, Nawrot B, Basak G, Wojda U. Novel Dicarboximide BK124.1 Breaks Multidrug Resistance and Shows Anticancer Efficacy in Chronic Myeloid Leukemia Preclinical Models and Patients' CD34+/CD38- Leukemia Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2022;14(15):3641. Published 2022 Jul 27. doi:10.3390/cancers14153641

Impact Factor (2021): 6.575

Cieślak M, Kaźmierczak-Barańska J, Królewska-Golińska K, Napiórkowska M, **Stukan I**, Wojda U, Nawrot B. New Thalidomide-Resembling Dicarboximides Target ABC50 Protein and Show Antileukemic and Immunomodulatory Activities. *Biomolecules*. 2019 Sep 4;9(9):446. doi: 10.3390/biom9090446.

Impact Factor (2021): 5.88

Wyniki niniejszej pracy stały się podstawą międzynarodowego zgłoszenia patentowego nr PCT/IB2022/051411 pt. "Pochodna dikarboksyimidu do zastosowania w leczeniu nowotworów" [data zgłoszenia (nr zgłoszenia): 17.02.2021 (P.437038), 17.02.2022 (PCT/IB2022/051411)]; twórcy: Grażyna Hoser, **Iga Stukan**, Marek Gryzik, Mikołaj Zdioruk, Marcin Cieślak, Mariola Napiórkowska, Karolina Królewska-Golińska, Barbara Nawrot, Urszula Wojda].

Pozostałe publikacje doktorantki

Adamowicz M, **Stukan I**, Milkiewicz P, Bialek A, Milkiewicz M, Kempinska-Podhorodecka A. Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 28;23(9):4905. doi: 10.3390/ijms23094905.

Impact Factor (2021): 6.208

Fassl A, Brain C, Abu-Remaileh M, **Stukan I**, Butter D, Stepien P, Feit AS, Bergholz J, Michowski W, Otto T, Sheng Q, Loo A, Michael W, Tiedt R, DeAngelis C, Schiff R, Jiang B, Jovanovic B,

Nowak K, Ericsson M, Cameron M, Gray N, Dillon D, Zhao JJ, Sabatini DM, Jeselsohn R, Brown M, Polyak K, Sicinski P. Increased lysosomal biomass is responsible for the resistance of triple-negative breast cancers to CDK4/6 inhibition. *Sci Adv.* 2020 Jun 17;6(25):eabb2210. doi: 10.1126/sciadv.abb2210.

Impact Factor (2021): 14.136

Lai Y, Kacal M, Kanony M, **Stukan I**, Jatta K, Kis L, Norberg E, Vakifahmetoglu-Norberg H, Lewensohn R, Hydbring P, Ekman S. miR-100-5p confers resistance to ALK tyrosine kinase inhibitors Crizotinib and Lorlatinib in EML4-ALK positive NSCLC. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Apr 2;511(2):260-265. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.016. Epub 2019 Feb 18.

Impact Factor (2021): 3.575

Otto T, Candido SV, Pilarz MS, Sicinska E, Bronson RT, Bowden M, **Lachowicz IA**, Mulry K, Fassl A, Han RC, Jecrois ES, Sicinski P. Cell cycle-targeting microRNAs promote differentiation by enforcing cell-cycle exit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Oct 3;114(40):10660-10665. doi: 10.1073/pnas.1702914114. Epub 2017 Sep 18

Impact Factor (2021): 12.779

Spis rycin

RYCINA 1. TYPOWY KARIOTYP OSOBY CHOREJ NA PRZEWLEKŁĄ BIAŁACZKĘ SZPIKOWĄ.....	27
RYCINA 2. BCR-ABL1 AKTYWUJE W SPOSÓB CIĄGŁY ONKOGENNE SZLAKI SYGNAŁOWE, ZWIĄZANE Z PRZEŻYCIEM KOMÓRKI.	29
RYCINA 3. SCHEMATYCZNA ILUSTRACJA UKAZUJĄCA PODWÓJNĄ ROLĘ P21 W ZALEŻNOŚCI OD LOKALIZACJI WEWNĄTRZ KOMÓRKI. ...	31
RYCINA 4. SCHEMAT OBRAZUJĄCY WPŁYW AKTYWNOŚCI KINAZY AKT NA LOKALIZACJĘ I FUNKCJĘ FOXO3A W KOMÓRCIE.....	32
RYCINA 5. „KAMIENIE MIŁOWE” ODPOWIEDZI NA TERAPIĘ INHIBITORAMI KINAZY TYROZYNOWEJ.	42
RYCINA 6. MECHANIZMY OPORNOŚCI NA INHIBITORY KINAZY TYROZYNOWEJ (TKI).....	47
RYCINA 7. WZÓR STRUKTURALNY BK124.	56
RYCINA 8. PRZYKŁADOWY POMIAR ŻYWOTNOŚCI PRZY UŻYCIU MUSE CELL ANALYZER.	61
RYCINA 9. ANALIZA APOPTOZY PRZY UŻYCIU ANEKSYNY V/7-AAD.	68
RYCINA 10. PRZYKŁADOWY WYNIK ANALIZY CYKLU KOMÓRKOWEGO Z PROGRAMU MODFIT.....	69
RYCINA 11. PRZYKŁADOWY WYNIK POMIARU CZYSTOŚCI POPULACJI KOMÓREK CD34+ POCHODZĄCYCH Z KOMÓREK JEDNOJĄDRZASTYCH Z KRWI OBWODOWEJ PACJENTÓW CML.	71
RYCINA 12. PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK K562 W ZALEŻNOŚCI OD STĘŻENIA BK124.	81
RYCINA 13. ODSETEK KOMÓREK NA POSZCZEGÓLNYCH ETAPACH APOPTOZY.	82
RYCINA 14. CIĘCIE KASPAZ POD WPŁYWEM BK124.	84
RYCINA 15. POZIOM BIAŁEK ZWIĄZANYCH Z PRZEŻYCIEM KOMÓRKI NOWOTWOROWEJ.....	86
RYCINA 16. ODSETEK KOMÓREK K562 W POSZCZEGÓLNYCH FAZACH CYKLU KOMÓRKOWEGO PO TRAKTOWANIU ZWIĄZKIEM BK124.	88
RYCINA 17. WPŁYW ZWIĄZKU BK124 NA AKTYWACJĘ SZLAKÓW MAPK.	91
RYCINA 18. PROFIL FARMAKOKINETYCZNY ZWIĄZKU BK124 W MODELU SZCZURZYM (A) ORAZ MYSIM (B).	95
RYCINA 19. WYNIKI BADANIA CYTOTOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKU BK124 W MYSIM MODELU KSENOTRANSPLANTACYJNYM.	99
RYCINA 20. PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK K562 W BK124 PO SZEŚCIU MIESIĄCACH INKUBACJI.	103
RYCINA 21. INKUBACJA KOMÓREK K562 Z BK124 PRZEZ SZEŚĆ MIESIĘCY NIE POWODUJE WZROSTU ODSETKA KOMÓREK MDR1+.	104
RYCINA 22. POZIOM EKSPRESJI GLIKOPROTEINY P PO SZEŚCIU MIESIĄCACH INKUBACJI Z BK124.....	105
RYCINA 23. OPORNOŚĆ KRZYŻOWA KOMÓREK K562-MDR1.....	106
RYCINA 24. WPŁYW ZWIĄZKU BK124 NA APOPTOZĘ W KOMÓRKACH MDR1+.....	108
RYCINA 25. PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK CD34 ⁺ IZOLOWANYCH OD PACJENTÓW Z CML W ZALEŻNOŚCI OD STĘŻENIA BK124.	111
RYCINA 26. ODSETEK KOMÓREK CD34 ⁺ OD PACJENTÓW Z CML NA POSZCZEGÓLNYCH ETAPACH APOPTOZY.	112
RYCINA 27. REPREZENTATYWNE WYKRESY DOT-PLOT, POKAZUJĄCE ODSETEK KOMÓREK APOPTOTYCZNYCH PO INKUBACJI ZE ZWIĄZKIEM BK124 W POPULACJI KOMÓREK CD34 ⁺ CD38 ⁺ ORAZ CD34 ⁺ CD38 ⁺	114
RYCINA 28. ODSETEK KOMÓREK APOPTOTYCZNYCH PO INKUBACJI ZE ZWIĄZKIEM BK124 W POPULACJI KOMÓREK CD34 ⁺ CD38 ⁺ ORAZ CD34 ⁺ CD38 ⁺	115
RYCINA 29. BK124 POWODUJE POWSTANIE STRESU OKSYDACYJNEGO I AKTYWACJĘ SZLAKU MAPK.....	120

Spis tabel

TABELA 1. CHARAKTERYSTYKA RÓŻNYCH TYPÓW BIAŁACZEK.....	24
TABELA 2. SYSTEMY OCENY ROKOWANIA U PACJENTÓW DOTKNIĘTYCH PRZEWLEKŁĄ BIAŁACZKĄ SZPIKOWĄ.....	26
TABELA 3. MECHANIZMY DZIAŁANIA LEKÓW CYTOSTATYCZNYCH.....	39
TABELA 4. WYKAZ SPRZĘTÓW UŻYWANYCH W EKSPERYMENTACH.....	58
TABELA 5. LISTA PRZECIWCIAŁ UŻYWANYCH W EKSPERYMENTACH.....	59
TABELA 6. LISTA ODCZYNNIKÓW I MATERIAŁÓW ZUŻYWANYCH W HODOWLI KOMÓRKOWEJ.....	60
TABELA 7. GĘSTOŚCI KOMÓREK ORAZ NACZYNNIA HODOWLANE KOMÓREK UŻYWANE W RÓŻNYCH EKSPERYMENTACH.....	60
TABELA 8. LISTA ODCZYNNIKÓW UŻYWANYCH W TEŚCIE MTT.....	62
TABELA 9. STĘŻENIA ROBOCZE BK124 UŻYTE W TESTACH CYTOTOKSYCZNOŚCI.....	64
TABELA 10. ODCZYNNIKI UŻYTE DO SELEKCJI KOMÓREK CD34 ⁺ Z KRWI OBWODOWEJ.....	65
TABELA 11. LISTA PACJENTÓW, KTÓRYCH MATERIAŁU UŻYTO W NINIEJSZEJ PRACY.....	66
TABELA 12. ODCZYNNIKI UŻYWANE DO CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ.....	67
TABELA 13. ODCZYNNIKI UŻYTE DO IZOLACJI RNA I RT QPCR.....	71
TABELA 14. ODCZYNNIKI DO IZOLACJI BIAŁKA ORAZ ANALIZY SDS PAGE WESTERN BLOT.....	73
TABELA 15. ODCZYNNIKI UŻYTE DO BADANIA FOSFORYLACJI KINAZ JNK, p38 ORAZ ERK1/2.....	75
TABELA 16. GRUPY EKSPERYMENTALNE W BADANIU CYTOTOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKU BK124 PRZECIWKOM KOMÓRKOM CML IN VIVO. .	78
TABELA 17. BADANIE ROZPUSZCZALNOŚCI I STABILNOŚCI ZWIĄZKU BK124 W ROZTWORACH WODNYCH.....	94
TABELA 18. KLUCZOWE PARAMETRY FARMAKOKINETYCZNE ZWIĄZKU BK124 W MODELU MYSZY BALB/C.....	96
TABELA 19. MASA I ROZMIARY NARZĄDÓW WEWNĘTRZNYCH MYSZY W ZALEŻNOŚCI OD METODY LECZENIA.....	100
TABELA 20. ŚREDNIE WYNIKI MORFOLOGII KRWI MYSZY W ZALEŻNOŚCI OD METODY LECZENIA.....	101
TABELA 21. ZMIANY IC50 W KOMÓRKACH Z INDUKCJĄ MDR1 (MDR1+).....	106