

**Ewelina Humeniuk**

## **STRESZCZENIE**

Choroby nowotworowe, w tym czerniak złośliwy, stanowią jedno z najpoważniejszych wyzwań medycyny XXI wieku. Największy problem terapeutyczny w przypadku czerniaka złośliwego stanowi leczenie choroby zaawansowanej, w której występują ogniska przerzutowe. Pomimo ciągłego rozwoju nowych metod leczenia, obejmujących między innymi immunoterapię oraz terapię celowaną, poszukuje się nowych rozwiązań angażujących klasyczne metody leczenia takie jak promieniowanie X oraz chemioterapeutyki. Obiecująca wydaje się być perspektywa łączenia klasycznie stosowanych metod terapeutycznych z substancjami wzmacniającymi ich efekt farmakologiczny. Jednak dobór odpowiednich par związków oparty musi być na wiedzy obejmującej mechanizmy zachodzące w komórce przechodzącej transformację nowotworową. Efekt Warburga stanowi jedną z ciekawych przemian zachodzących w komórce nowotworowej i obejmuje aktywację glikolizy, pomimo obecności warunków tlenowych. Istnieje kilka hipotez obejmujących przyczyny powstawania efektu Warburga i są nimi m. in uszkodzenie funkcji mitochondriów, a także niewystracząca produkcja ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej w stosunku do zapotrzebowania energetycznego komórki nowotworowej. Można postawić tezę, iż związki zaburzające funkcjonowanie mitochondriów mogą uwrażliwić komórki nowotworowe o prawidłowo funkcjonujących mitochondriach na klasycznie stosowane metody leczenia takie jak cytostatyki oraz promieniowanie X.

Celem badań była ocena możliwości uwrażliwienia komórek nowotworowych czerniaka złośliwego na klasycznie stosowane cytostatyki z grup o różnym mechanizmie działania oraz promieniowanie X, poprzez zastosowanie modelowych związków zaburzających funkcjonowanie mitochondrium. Ponadto podjęto próbę oceny profilu fenotypu metabolicznego użytych w badaniach linii komórkowych czerniaka złośliwego w kontekście pozyskiwania ATP na drodze oddychania mitochondrialnego lub glikolizy, a także ocena, czy ewentualny efekt synergistyczny jest zależny od profilu fenotypu metabolicznego.

Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem trzech linii komórkowych czerniaka złośliwego G-361, CRL-1619 oraz SK-MEL28. W badaniach użyto trzech modelowych związków zaburzających funkcjonowanie mitochondriów o różnych mechanizmach działania: 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP), etanol oraz cyjanek potasu. Do dalszych badań działania łącznego z klasycznymi cytostatykami oraz promieniowaniem X wybrano 2,4-DNP w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ . Optymalne stężenia piętnastu cytostatyków do badań działania łącznego z 2,4-DNP wybrano na podstawie testu MTT, natomiast dawkę promieniowania X wybrano w oparciu o analizę cyklu komórkowego. Czas inkubacji komórek z badanymi związkami wynosił 48 godzin. Ocenę profilu fenotypu metabolicznego przeprowadzono na podstawie pomiaru stężenia glukozy oraz stężenia mleczanu w pożywce hodowlanej

w trzech punktach czasowych w czasie 72- godzinnej inkubacji badanych komórek czerniaka złośliwego. Ponadto dokonano oceny zagęszczenia mitochondriów za pomocą barwienia fluorescencyjnego oraz oceny poziomu ATP w badanych liniach pod wpływem 2,4-DNP jako substancji narzędziowej. Ocena wpływu działania łącznego 2,4-DNP w stężeniu 100  $\mu$ M oraz klasycznych cytostatyków na komórki czerniaka złośliwego przeprowadzono na podstawie testu MTT. W przypadku zaobserwowania występowania efektu synergistycznego dokonano analizy cyklu komórkowego. Oceny działania łącznego 2,4-DNP oraz promieniowania X w dawce 10 Gy dokonano na podstawie testu MTT, testu CVS, a także analizy morfologii komórek oraz cyklu komórkowego.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski: (1) Zaobserwowano zróżnicowaną odpowiedź trzech badanych linii komórkowych czerniaka złośliwego na wpływ kilku z użytych cytostatyków. Nie można wykluczyć, że zróżnicowana odpowiedź pozostaje w związku z fenotypem metabolicznym; (2) W trzech badanych liniach czerniaka odnotowano zróżnicowane rodzaje i aktywności szlaków metabolicznych w zakresie dynamiki zużycia glukozy i syntezy mleczanu; procentowego udziału w syntezie mleczanu innych substratów niż egzogenna glukoza, wykorzystania egzogennej glukozy do innych celów niż synteza mleczanu oraz oksydacyjnej fosforylacji. Takie fenotypy metaboliczne mogą stanowić w przyszłości dodatkowe kryterium w decyzjach terapeutycznych; (3) Stwierdzono obecność efektu synergistycznego 2,4-DNP z sześcioma z piętnastu przebadanych cytostatyków w stosunku do linii czerniaka G-361, jednego cytostatyku w odniesieniu do linii CRL-1619 oraz nie wykazano takiej synergii w żadnym z badanych cytostatyków w przypadku linii SK-MEL28. Dalsze badania powinny koncentrować się na ustaleniu, czy wykazana synergia lub jej brak pozostają w związku z fenotypem metabolicznym; (4) Nie wykazano nasilenia działania cytotoksycznego promieniowania X przez 2,4-DNP w trzech badanych liniach czerniaka złośliwego.