Dariusz Rożkiewicz:
Ocena aktywności przeciwnowotworowej inhibitora kinazy Brutona i erytropoetyny w komórkach ludzkiego gruczolakoraka piersi.

Streszczenie w języku polskim

W ostatnich latach pojawiło się coraz więcej dowodów eksperymentalnych i klinicznych sugerujących, że kinaza tyrozynowa Brutona (BTK) odgrywa istotną rolę nie tylko w leczeniu białaczek i chłoniaków, ale także w innych rodzajach nowotworów. Wykazano między innymi, że ekspresja genu kodującego BTK chroni komórki raka piersi przed apoptozą. Obserwacja ta nasunęła hipotezę, że hamowanie aktywności BTK może być skuteczną strategią w hamowaniu wzrostu guza i progresji choroby nowotworowej. Należy jednak zauważyć, że większość dotychczasowych badań nad BTK koncentrowała się głównie na układzie krwiotwórczym, stąd rola BTK w przypadku nowotworów litych pozostaje w dużej mierze niezbadana.

W leczeniu niedokrwistości w przebiegu zaawansowanej choroby nowotworowej stosuje się m.in. erytropoetynę (Epo), która stymuluje proces erytropoezy na drodze bezpośredniej aktywacji receptora EpoR. Pomimo, że Epo może „poprawić" parametry hematologiczne i zwiększyć skuteczność zarówno radio- i chemioterapii, istnieją obawy, że może także pobudzać wzrost i proliferację komórek nowotworowych. Ekspresję Epo i receptorów EpoR wykazano w 24 liniach komórkowych ludzkich nowotworów, w tym w raku piersi. Dalsze badania są zatem niezbędne, aby ocenić korzyści i ryzyko związane z zastosowaniem tego czynnika wzrostu u pacjentów onkologicznych i umożliwić opracowanie optymalnych strategii terapeutycznych.

Celem niniejszej pracy była ocena łącznego podania LFM-A13 i Epo na rozwój estrogenozależnych MCF-7 i estrogenoniezależnych MDA-MB-231 komórek raka piersi. Zbadano wpływ badanych związków na komórki raka piersi, zarówno w modelu *in vitro* oraz *Danio rerio*. Dokonano także analizy oddziaływania LFM-A13 i Epo na proces apoptozy, cykl komórkowy oraz zaangażowanie kinazy BTK w mechanizmie ich farmakologicznej aktywności.

Linie komórkowe inkubowano w obecności LFM-A13 lub Epo, jak też kombinacji obu związków. Żywotność komórek oceniono przy pomocy klasycznej metody MTT (według Mosmann). Techniką cytometrii przepływowej zbadano wpływ LFM-A13, Epo i LFM-A13+Epo na proces apoptozy oraz potencjał błony mitochondrialnej (MMP). Następnie oceniono zmiany ekspresji BTK, cykliny D, kaspazy 6 metodą Western Blot, a także oceniono wrzeciono kariokinetyczne metodą immunofluorescencji przy użyciu mikroskopii konfokalnej. W kolejnym etapie embrionom *Danio rerio* implantowano znakowane za pomocą CM-Dil komórki linii, MCF-7 i MDA-MB-231. Ksenografty inkubowano z LFM-A13+Epo, po czym analizowano intensywność fluorescencji. W dalszej części badań oceniono ekspresję BTK, HER2, Ki-67, receptora progesteronowego oraz estrogenowego w wycinkach pobranych śródoperacyjnie od pacjentek z pierwotnym rakiem piersi. Skrawki poddano badaniu histopatologicznemu i immunohistochemicznemu.

W obu liniach komórkowych zaobserwowano największy spadek żywotności komórek po inkubacji z LFM-A13+Epo w porównaniu z grupą kontrolną, czy pojedynczymi związkami LFM-A13 lub Epo. Po inkubacji ksenograftów MCF-7 jak i MDA-MB-231 z LFM-A13 i Epo wykazano istotnie statystycznie zmniejszenie liczby komórek nowotworowych, obniżenie ekspresji BTK oraz stosunku pBTK/BTK. Proces apoptozy indukowany przez LFMA13 był związany z aktywacją kaspazy 6, a dodanie Epo istotnie nasiliło ten efekt. W badaniach z użyciem cytometrii przepływowej wykazano, że w liniach komórkowych raka piersi LFM-A13 i Epo spowodowały zmniejszenie frakcji fazy S, co wiązało się ze znaczącym spadkiem liczby komórek. Działanie to wiązało się ze obniżeniem ekspresji cykliny D1, regulującej cykl komórkowy. Techniką immunofluorescencji przy użyciu mikroskopii konfokalnej wykazano, że jednoczesne stosowanie LFM-A13 z Epo prowadziło do aberracji mitotycznych w komórkach nowotworowych, powstania monobiegunowych wrzecion podziałowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że LFM-A13 skutecznie zmniejsza żywotność estrogenozależnych i estrogenoniezależnych komórek raka piersi. Jednoczesna ekspozycja komórek raka piersi na LFM-13 oraz Epo skutkuje wzmocnieniem farmakologicznej aktywności przeciwnowotworowej inhibitora kinazy Brutona. Wydaje się, że Epo może być chemosensybilizatorem w terapii raka piersi. LFM-A13 podany łącznie z Epo nasila proces apoptozy na drodze utraty potencjału błony mitochondrialnej oraz eksternalizacji fosfatydyloseryny.

Uzyskane wyniki stanowią obiecujący materiał do dalszych badań przedklinicznych nad rakiem piersi i możliwością modulowania aktywności inhibitorów BTK przez skojarzone zastosowanie erytropoetyny lub innych czynników wzrostowych.