

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Natalia Tołoczko-Iwaniuk

**Prolino-zależna indukcja apoptozy w komórkach
raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (*squamous
cell carcinoma, SCC*). Wpływ celekoksylu.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Pracę wykonano w Samodzielnej Pracowni Analizy Leków

oraz w Klinice Chirurgii Szczękowo – Twarzowej

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Promotor: dr hab.n.farm. Wojciech Miłyk

Promotor pomocniczy: dr n.med. Dorota Dziemiańczyk-Pakieła

I. STRESZCZENIE

Rak jamy ustnej jest to nowotwór zlokalizowany w obrębie różnych jej struktur, przy czym za najczęstsze umiejscowienia uznawane są warga, język oraz dno jamy ustnej. Jako szósty najczęściej występujący nowotwór na świecie, jest postrzegany jako znaczący problem epidemiologiczny, ze względu na stale utrzymujący się wzrost zachorowalności, oraz pozostające od lat na tym samym poziomie wskaźniki przeżywalności. Leczeniem z wyboru jest leczenie chirurgiczne, często w dużej mierze okaleczające. Żaden z do tej pory stosowanych chemioterapeutyków nie przyniósł wystarczająco satysfakcjonujących efektów, aby mógł być stosowany jako jedna z metod leczenia radykalnego. Fakty te wskazują na potrzebę dalszego poszukiwania nowych punktów uchwytu farmakoterapii skutecznej w przypadku tego typu nowotworu.

Przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie jest ocena szlaków zaangażowanych w metabolizm proliny, w aspekcie indukcji apoptozy, a także wpływ celekoksylu, selektywnego inhibitora cyklooksigenazy II, na ten proces. Opierając się na doniesieniach z dostępnej literatury dotyczących właściwości przeciwnowotworowych celekoksylu, a także biorąc pod uwagę fakt, iż szlaki PRODH/POX oraz COX-2 / PGE2 podlegają wzajemnej regulacji (tzw. cross-talk), postanowiłam wykorzystać ten lek jako czynnik potencjalnie aktywujący apoptozę szlakiem PRODH/POX. Model badawczy stanowiły tkanki pobrane od pacjentów z rakiem jamy ustnej oraz hodowla komórkowa raka płaskonabłonkowego języka (CAL-27). W zebranym materiale tkankowym oceniłam zawartości proliny (metodą chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas), a także ekspresję wybranych czynników zaangażowanych w jej metabolizm, mających również znaczenie w procesie apoptozy - PRODH/POX, PPAR γ i HIF-1 α (metodą Western immunoblot). Parametry te zostały zestawione z oceną histologicznej złośliwości guzów, a także ze stopniem zaawansowania klinicznego choroby. Następnie, ekspresja tych samych czynników (PRODH/POX, PPAR γ , HIF-1 α) została oceniona w hodowli komórkowej raka języka (Western immunoblot), po inkubacji komórek z wybranymi stężeniami celekoksylu. Wykonałam także ocenę przeżywalności komórek (test cytotoksyczności MTT), ocenę biosyntezy DNA (metoda radiometryczna) oraz biosyntezy kolagenu (wg metody Peterkofsky). Uzyskane wyniki wskazują na znacznie wyższy poziom proliny w tkankach raka jamy ustnej niż w tkankach prawidłowych u wszystkich pacjentów włączonych do badania, przy jednoczesnym wyższym poziomie HIF-1 α i obniżonym poziomie PRODH/POX i PPAR γ . Zmiany w stężeniach proliny a także różnice w ekspresji wymienionych czynników wykazywały korelację ze złośliwością guza (histologiczną i kliniczną). Przeprowadzone

przeze mnie badania z wykorzystaniem hodowli raka płaskonabłonkowego języka (CAL-27) wykazały istotne zmniejszenie przeżywalności komórek w teście cytotoksyczności, a także zmniejszoną biosyntezę DNA i kolagenu po inkubacji z wybranymi stężeniami celekoksylu. Wykazałam również po raz pierwszy, iż celekoksyl powodował zwiększenie ekspresji czynników proapoptotycznych PRODH/POX i PPAR γ w zależności od użytej dawki, co wskazuje na jego wpływ na indukcję apoptozy tym szlakiem. Powodował on także zmniejszenie aktywności HIF-1 α – czynnika o działaniu antyapoptotycznym.

Uzyskane wyniki wskazują, iż celekoksyl, jako lek zwiększający ekspresję POX i PPAR γ , może stanowić potencjalną nową strategię terapeutyczną w przypadku raka jamy ustnej.

II. SUMMARY

Oral cancer is a type of malignancy located within various structures of the oral cavity, with the lip, tongue and the floor of the mouth considered as the most common places. As the sixth most prevalent type of cancer worldwide, it is a significant epidemiological problem, due to the growing incidence of morbidity and non-improving survival rates. Surgical treatment, often significantly mutilating, is the treatment of choice. None of the chemotherapeutics applied so far had so satisfactory effects to substantiate the reasonability of its use as one of the main methods of radical treatment. These facts indicate the need for further research focused on the new pharmacotherapy targeting this type of cancer.

The subject of the research presented in this dissertation was the evaluation of the pathways involved in proline metabolism, in terms of the apoptosis induction, as well as the effect of celecoxib, a selective cyclooxygenase II inhibitor, on this process. Considering the reports from the available literature regarding the anticancer properties of celecoxib, as well as the fact that the PRODH / POX and COX-2 / PGE2 pathways are cross-talked, I decided to use this drug as a factor that might activate apoptosis through the PRODH / POX pathway. In the research I used the tissues of patients with oral cancer and the cell culture of tongue squamous cell carcinoma (CAL-27). In the collected tissue material, I evaluated the proline concentration (using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry), as well as the expression of selected factors involved in the metabolism of this amino acid, also important in the process of apoptosis - PRODH / POX, PPAR γ and HIF-1 α (by Western immunoblot). The differences in the level of mentioned factors were compared with the

histologic malignancy of the tumor, as well as the clinical stage of the disease. Subsequently, the expression of the same factors (PRODH / POX, PPAR γ , HIF-1 α) was evaluated in a tongue cancer cell lines (Western immunoblot) after its incubation with the selected concentrations of celecoxib. I also performed the assessment of cell viability (MTT test), DNA biosynthesis (radiometric method) and collagen biosynthesis (according to the Peterkofsky method). The results of the research indicated significantly higher proline level in oral cancer tissues in comparison with the normal tissues in all patients included in the study, with a higher level of HIF-1 α and a decreased level of PRODH / POX and PPAR γ . Differences in the proline concentrations, as well as the differences in the expression of mentioned factors correlated with the tumor malignancy. The results of the research conducted on the tongue squamous cell carcinoma (CAL-27) showed a significant decrease in cell survival in the MTT test as well as reduced biosynthesis of DNA and collagen after cells incubation with the various concentrations of celecoxib. I also proved for the first time that celecoxib, depending on the dose of the drug, caused an increase in the expression of PRODH / POX and PPAR γ , which indicates the induction of apoptosis by this pathway. It also reduced the activity of the anti-apoptotic factor HIF-1 α .

The results obtained in the research indicated that celecoxib, as a drug that increases the expression of PRODH/POX, might constitute a potential therapeutic strategy in the pharmacotherapy of oral cancer.