



Unia Europejska  
Europejski Fundusz Społeczny



*„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”*

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKA AKADEMIA NAUK

## ROZPRAWA DOKTORSKA

**mgr Monika Cuprych-Belter**

### **SYNTEZA ORAZ BADANIE AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ IZOTIOCYJANIANÓW WOBEC LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO**

#### PROMOTORZY PRACY:

prof. dr hab. Joanna Wietrzyk

– Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
Polskiej Akademii Nauk

dr hab. inż. Marcin Sieńczyk, prof. uczelni – Politechnika Wrocławska

Badania do niniejszej pracy zrealizowano w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej (Zakład Onkologii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk) oraz w Katedrze Chemii Organicznej i Medycznej (Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska).

Wrocław 2022



Politechnika Wrocławska



Uniwersytet  
Wrocławski



UNIWERSYTET  
PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU



*Pragnę serdecznie podziękować*

***Pani Profesor Joannie Wietrzyk** oraz **Panu dr. hab. inż. Marcinowi Sieńczykowi** za możliwość realizacji niniejszej pracy doktorskiej oraz niezwykle ciekawą tematykę badawczą, która umożliwiła mi rozwój w aspekcie wielu dziedzin badawczych. Dziękuję również za wsparcie oraz pomoc podczas realizacji niniejszej pracy.*

***Koleżankom i kolegom** z zespołu Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej za miłą atmosferę podczas pracy, dzielenie się wiedzą oraz umiejętnościami. Szczególnie chciałabym podziękować **dr. inż. Mateuszowi Psurskiemu** oraz **dr inż. Beacie Filip-Psurskiej** za wsparcie oraz pomoc, na którą mogłam liczyć na każdym etapie realizacji niniejszej pracy, za niezliczone i wartościowe dyskusje naukowe oraz cenne uwagi.*

***Dr. hab. Tomaszowi Goszczyńskemu**, **dr. inż. Waldemarowi Goldemanowi** oraz **dr. inż. Łukaszowi Winiarskiemu** za pomoc podczas przeprowadzania syntez izotiocyanianów. **Dr inż. Agnieszce Łupickiej-Słowik** za pomoc podczas przeprowadzania analiz western blot.*

***Mojemu Mężowi Adrianowi**, **Mamie Beacie** oraz **Babci Zosi** za ogromne wsparcie, wiarę we mnie, dobre słowo oraz nieograniczone pokłady cierpliwości.*



*Pracę dedykuję Mężowi, Mamie, Babci oraz Dziadkowi*



Pracę doktorską zrealizowano w ramach:  
*„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów  
Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”*  
*Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu  
Społecznego.*





## SPIS TREŚCI

<b>STRESZCZENIE</b> .....	15
<b>SUMMARY</b> .....	16
<b>WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	17
<b>1. WSTĘP</b> .....	25
1.1. RAK PĘCZERZA MOCZOWEGO NA ŚWIECIE ORAZ W POLSCE – EPIDEMIOLOGIA, CZYNNIKI RYZYKA ORAZ DIAGNOSTYKA .....	25
1.1.1. EPIDEMIOLOGIA .....	25
1.1.2. CZYNNIKI RYZYKA .....	27
1.1.3. DIAGNOSTYKA .....	35
1.2. PODZIAŁ ORAZ CHARAKTERYSTYCZNE CECHY MOLEKULARNE RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	38
1.2.1. KLASYFIKACJA HISTOLOGICZNA .....	38
1.2.2. PODZIAŁ NOWOTWORÓW PĘCZERZA MOCZOWEGO ZE WZGLĘDU NA WYGLĄD KOMÓREK I GŁĘBOKOŚĆ ICH NACIEKANIA .....	42
1.2.3. OCENA STOPNIA ZRÓŻNICOWANIA ORAZ ZAAWANSOWANIA RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	46
1.2.4. KLASYFIKACJA MOLEKULARNA RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	47
1.2.5. MARKERY MOLEKULARNE RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	49
1.3. OBECNIE STOSOWANE SPOSOBY LECZENIA NOWOTWORÓW PĘCZERZA MOCZOWEGO.....	53
1.3.1. SPOSOBY LECZENIA CHORYCH NA NMIBC.....	53
1.3.2. SPOSOBY LECZENIA CHORYCH NA MIBC .....	56
1.3.3. SPOSOBY LECZENIA CHORYCH NA PRZERZUTUJĄCE RAKI PĘCZERZA MOCZOWEGO.....	59
1.4. OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANE TERAPEUTYKI.....	61
1.4.1. OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA CISPLATYNĘ .....	61
1.4.2. OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA GEMCYTABINĘ .....	63
1.4.3. OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA ALKALOIDY <i>VINCA</i> .....	64
1.4.4. OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA DOKSORUBICYNĘ .....	65
1.4.5. OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA METOTREKSAT .....	65
1.5. IZOTIOCYJANIANY (ITC ANG. <i>ISOTHIOCYANATE</i> ) – WYSTĘPOWANIE, WŁAŚCIWOŚCI ORAZ DZIAŁANIE PRZECIWNOWOTWOROWE. ....	67
1.5.1. WARZYWA KRZYŻOWE – BOGATE ŹRÓDŁO IZOTIOCYJANIANÓW .....	67

1.5.2. IZOTIOCYJANIANY – WYSTĘPOWANIE, POWSTAWANIE ORAZ METABOLIZM	68
1.5.3. IZOTIOCYJANIANY – WŁAŚCIWOŚCI ANTYKARCYNOGENNE	71
1.5.3.1 HAMOWANIE ENZYMÓW I FAZY ORAZ INDUKACJA ENZYMÓW II FAZY PRZEZ IZOTIOCYJANIANY	72
1.5.3.2 HAMOWANIE CYKLU KOMÓRKOWEGO	73
1.5.3.3 APOPTOZA	74
1.5.3.4 STRES OKSYDACYJNY	75
1.5.3.5 AUTOFAGIA	76
1.5.3.6 WŁAŚCIWOŚCI ANTYANGIOGENNE ORAZ PRZECIWPZRZUTOWE	76
<b>2. CEL PRACY</b>	<b>79</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY</b>	<b>81</b>
3.1. WYKORZYSTANE LINIE KOMÓRKOWE ORAZ ICH HODOWLA	81
3.2. WYPROWADZENIE LINII KOMÓREK OPORNYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO NA WYBRANE CYOSTATYKI Z LINII KOMÓRKOWEJ UM-UC-3	83
3.3. CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA KOMÓREK LEKOOPORNYCH LINII RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO ORAZ LINII WRAŻLIWYCH (WYJŚCIOWYCH)	85
3.3.1. OPORNOŚĆ KRZYŻOWA KOMÓREK LINII LEKOOPORNYCH ORAZ LINII WRAŻLIWYCH NA ZWIĄZKI O ZRÓŻNICOWANYCH MECHANIZMACH DZIAŁANIA STOSOWANYCH W LECZENIU ONKOLOGICZNYM	85
3.3.1.1 MATERIAŁY	85
3.3.1.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA (TEST SRB)	86
3.3.2. OZNACZENIE EKSPRESJI GENÓW ZWIĄZANYCH Z LEKOPORNOŚCIĄ W LIZATACH KOMÓRKOWYCH PANELU LINII LEKOOPORNYCH ORAZ WRAŻLIWYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO ZA POMOCĄ TECHNIKI REAL-TIME PCR	88
3.3.2.1 MATERIAŁY	88
3.3.2.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA	89
3.3.3. OZNACZANIE POZIOMU WYBRANYCH BIAŁEK W LIZATACH KOMÓRKOWYCH PANELU LINII LEKOOPORNYCH ORAZ LINII WRAŻLIWYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO ZA POMOCĄ TECHNIKI WESTERN BLOT	92
3.3.3.1 MATERIAŁY	92
3.3.3.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA	95
3.3.4. OZNACZENIE ILOŚCI GLUTATIONU UTLENIONEGO I ZREDUKOWANEGO W KOMÓRKACH LINII LEKOOPORNYCH ORAZ WRAŻLIWYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO	99
3.3.4.1 MATERIAŁY	99
3.3.4.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA	99

3.4. SYNTEZA NOWYCH IZOTIOCYJANIANÓW (ITC) .....	101
3.4.1. MATERIAŁY .....	101
3.4.2. PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	101
3.5. WSTĘPNA OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ ZSYNTEZOWANYCH IZOTIOCYJANIANÓW WOBEC KOMÓREK LINII RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	103
3.5.1 MATERIAŁY .....	103
3.5.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA.....	103
3.6. BADANIE AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ IZOTIOCYJANIANÓW WOBEC KOMÓREK WYBRANYCH LINII RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	104
3.6.1. BADANIE WPŁYWU IZOTIOCYJANIANÓW NA AKTYWNOŚĆ KASPAZY 3/7 W KOMÓRKACH LINII RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	104
3.6.1.1 MATERIAŁY .....	104
3.6.1.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	105
3.6.2. BADANIE APOPTOZY W KOMÓRKACH LINII RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI PRZY UŻYCIU ANEKSYNY V ORAZ JODKU PROPIDYNY.....	106
3.6.2.1 MATERIAŁY .....	106
3.6.2.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	106
3.6.3. BADANIE ZMIAN W CYKLU KOMÓRKOWYM KOMÓREK LINII RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI.....	108
3.6.3.1 MATERIAŁY .....	108
3.6.3.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	108
3.6.4. BADANIE WPŁYWU DZIAŁANIA IZOTIOCYJANIANÓW NA WŁAŚCIWOŚCI KLONOGENNE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH WYBRANYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	110
3.6.4.1 MATERIAŁY .....	110
3.6.4.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	110
3.6.5. OZNACZENIE ILOŚCI GLUTATIONU ZREDUKOWANEGO ORAZ UTLENIONEGO W KOMÓRKACH LINII RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI .....	112
3.6.5.1 MATERIAŁY .....	112
3.6.5.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	112
3.6.6. BADANIE POLIMERYZACJI TUBULINY POD WPŁYWEM ZSYNTETYZOWANYCH ITC.....	113
3.6.6.1 MATERIAŁY .....	113
3.6.6.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	113

3.6.7. OZNACZENIE WZGLĘDNEGO POZIOMU EKSPRESJI $\alpha$ - ORAZ $\beta$ -TUBULINY W LIZATACH KOMÓRKOWYCH WYBRANYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI METODĄ REAL-TIME PCR.....	114
3.6.7.1 MATERIAŁY .....	114
3.6.7.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	114
3.6.8. OZNACZENIE POZIOMU WYBRANYCH BIAŁEK W LIZATACH KOMÓRKOWYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI METODĄ WESTERN BLOT .....	116
3.6.8.1 MATERIAŁY .....	116
3.6.8.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	117
3.6.9. OBRAZOWANIE TUBULINY W KOMÓRKACH WYBRANYCH LINII RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU BADANYMI IZOTIOCYJANIANAMI Z ZASTOSOWANIEM MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ .....	119
3.6.9.1 MATERIAŁY .....	119
3.6.9.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA .....	119
3.7. ANALIZA STATYSTYCZNA .....	121
<b>4. WYNIKI</b> .....	123
4.1. WYPROWADZONE LINIE OPORNE RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO NA WYBRANE CYTOSTATYKI Z LINII KOMÓRKOWEJ UM-UC-3.....	123
4.2. CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA LEKOOPORNYCH ORAZ WRAŻLIWYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	124
4.2.1. OCENA ROZWOJU OPORNOŚCI KRZYŻOWEJ KOMÓREK BADANYCH LINII RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO NA ZWIĄZKI O ZRÓŻNICOWANYM MECHANIZMIE DZIAŁANIA .....	124
4.2.2. ANALIZA EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW W LIZATACH KOMÓRKOWYCH .....	129
4.2.3. ANALIZA POZIOMU WYBRANYCH BIAŁEK W LIZATACH KOMÓRKOWYCH ..	135
4.2.4. ANALIZA STOSUNKU GLUTATIONU ZREDUKOWANEGO DO UTLENIONEGO ORAZ ILOŚCI GLUTATIONU CAŁKOWITEGO W BADANYCH KOMÓRKACH LINII WYJŚCIOWYCH ORAZ LEKOOPORNYCH .....	141
4.3. ZSYNTEZOWANE ITC ORAZ ICH CHARAKTERYSTYKA .....	145
4.4. WSTĘPNA OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ ZSYNTEZOWANYCH ITC WOBEC PANELU LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO – OCENA AKTYWNOŚCI ANTYPROLIFERACYJNEJ .....	151
4.5. OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ WYSELEKJONOWANYCH ITC WOBEC WYBRANYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	159
4.5.1. AKTYWNOŚĆ KASPAZY 3 W KOMÓRKACH PO TRAKTOWANIU ITC .....	159

4.5.2. PORÓWNANIE LICZBY KOMÓREK APOPTOTYCZNYCH, NEKROTYCZNYCH ORAZ ŻYWYCH PO TRAKTOWANIU ITC .....	161
4.5.3. ANALIZA WPŁYWU DZIAŁANIA ITC NA CYKL KOMÓRKOWY .....	165
4.5.4. WPŁYW DZIAŁANIA ITC NA WŁAŚCIWOŚCI KLONOGENNE KOMÓREK RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO .....	170
4.5.5. PORÓWNANIE STOSUNKU GLUTATIONU ZREDUKOWANEGO I UTLENIONEGO W KOMÓRKACH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU ITC .....	172
4.5.6. OCENA POLIMERYZACJI TUBULINY W OBECNOŚCI WYSELEKCYJONOWANYCH ITC .....	175
4.5.7. ANALIZA EKSPRESJI $\alpha$ - ORAZ $\beta$ -TUBULINY W LIZATACH KOMÓRKOWYCH PO TRAKTOWANIU ITC .....	180
4.5.8. ANALIZA POZIOMU WYBRANYCH BIAŁEK W LIZATACH KOMÓRKOWYCH PO TRAKTOWANIU ITC.....	183
4.5.9. OBRAZY MIKROSKOPOWE KOMÓREK LINII RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU ITC .....	187
<b>5. DYSKUSJA WYNIKÓW .....</b>	<b>193</b>
<b>6. WNIOSKI .....</b>	<b>213</b>
<b>7. PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>215</b>
<b>8. SPIS RYCIN I TABEL .....</b>	<b>231</b>
<b>9. DOROBEK NAUKOWY .....</b>	<b>237</b>



## STRESZCZENIE

Rak pęcherza moczowego zajmuje 10 miejsce wśród najczęściej występujących nowotworów na świecie. Raki pęcherza moczowego są powszechnie uznawane za chemiooporne, a nieudana terapia pierwszego rzutu oparta głównie na cisplatynie prowadzi do jeszcze bardziej opornych, zagrażających życiu nowotworów złośliwych, które są trudne do wyleczenia nawet najnowszymi lekami (jak np. winfluniną). W związku z tym koniecznym jest podejmowanie prób w poszukiwaniu nowych związków mogących być potencjalnymi terapeutykami. Grupą takich związków, które w przyszłości mogłyby zostać nowymi lekami są izotiocyjaniany. Są to związki występujące w warzywach krzyżowych np. brokułach, kalafiorze czy brukselce. Powstają w wyniku hydrolizy glukozyolanów przy udziale mirozynazy. Izotiocyjaniany posiadają właściwości chemoprewencyjne, przeciwnowotworowe oraz bakteriobójcze. Wpływają na wiele różnych procesów biologicznych, takich jak: cykl komórkowy, apoptoza czy angiogeneza. Ze względu na ich zdolność do akumulacji w pęcherzu moczowym, rak pęcherza moczowego staje się naturalnym celem dla terapii z udziałem izotiocyjanianów.

Niniejsza praca doktorska została podzielona na dwie główne części. Celem pierwszej części było wyprowadzenie komórek linii raka pęcherza moczowego opornych na obecnie stosowane w terapii cytostatyki, tj. cisplatynę, winblastynę, gemcytabinę oraz łącznie na cisplatynę jak i gemcytabinę, a następnie dokonanie ich charakterystyki molekularnej. Natomiast celem drugiej części pracy była synteza serii strukturalnie zróżnicowanych izotiocyjanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów oraz ocena aktywności biologicznej zsyntetyzowanych związków wobec komórek linii raka pęcherza moczowego, scharakteryzowanych w pierwszej części pracy.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż komórki linii lekoopornych, wywodzące się z komórek różnych linii wyjściowych mimo tego, że są oporne na ten sam cytostatyk, rozwinęły swoją oporność na drodze różnych mechanizmów, co stwierdzono na podstawie analizy ekspresji genów oraz poziomu białek związanych z opornością na dany związek. Konsekwencją tego są zupełnie odmienne profile oporności krzyżowej komórek linii opornych raka pęcherza moczowego na inne związki.

Podczas realizacji drugiej części pracy otrzymano 29 syntetycznych izotiocyjanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów. Związki powstały w ramach dwóch serii badawczych. Pierwsza seria obejmowała 18 związków: estry metylowe, butylowe, etylowe, benzytowe, izopropylowe oraz cykloheksylowe alaniny, fenyloalaniny lub fenyloglicyny. Na podstawie wyników aktywności antyproliferacyjnej *in vitro* tych związków stwierdzono, iż izotiocyjaniany będące pochodnymi estrów metylowych są bardziej aktywne od pozostałych. W związku z tym druga seria składała się z 11 izotiocyjanianów opartych wyłącznie o estry metylowe aminokwasów. Związki te również poddano testom antyproliferacyjnym *in vitro*, aby następnie móc wyłonić najbardziej aktywne i zbadać mechanizmy odpowiedzialne za ich aktywność biologiczną. Następnie podjęto próbę odpowiedzi na pytanie: jak struktura izotiocyjanianów wpływa na ich aktywność antyproliferacyjną? Zsyntetyzowane związki wykazują aktywność antyproliferacyjną zarówno wobec komórek wyjściowych raka pęcherza moczowego jak i komórek linii lekoopornych. Powodują, m.in.: wzrost aktywności kaspazy 3/7, hamują cykl komórkowy w fazie G2/M, obniżają potencjał klonogenny komórek oraz hamują polimeryzację tubuliny. Wykazano, iż struktura chemiczna izotiocyjanianów ma wpływ na ich aktywność biologiczną - im prostszy łańcuch boczny aminokwasu izotiocyjanianu oraz im krótszy łańcuch alifatyczny estru, tym związek wykazuje silniejszą aktywność antyproliferacyjną.

Podsumowując, w ramach niniejszej pracy doktorskiej wyprowadzono cztery nowe lekooporne linie komórkowe raka pęcherza moczowego oraz dokonano ich charakterystyki molekularnej. Zsyntetyzowano 29 izotiocyjanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów, które wykazują aktywność antyproliferacyjną wobec komórek linii wrażliwych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego. Udowodniono, iż struktura chemiczna zsyntetyzowanych izotiocyjanianów ma wpływ na ich właściwości antyproliferacyjne.

## SUMMARY

Bladder cancer is the 10th most common cancer worldwide. Bladder cancers are widely recognized as chemoresistant, and the failure of first-line therapy, which is mainly based on cisplatin, leads to even more resistant, life-threatening malignancies that are difficult to treat, even with the latest drugs (such as vinflunine). Therefore, it is necessary to search for new compounds that could be potential anticancer drugs. A group of such compounds that could be new drugs in the future are isothiocyanates. These compounds are found in cruciferous vegetables such as broccoli, cauliflower, and Brussels sprouts. They are formed as a result of the hydrolysis of glucosinolates with the participation of myrosinase. Isothiocyanates have chemopreventive, anticancer and bactericidal properties. They affect many different processes including the: cell cycle, apoptosis and angiogenesis. They accumulate in the bladder, therefore bladder cancer becomes a natural target for therapy involving these compounds.

This PhD thesis has been divided into two main parts. The aim of the first part was to generate bladder cancer cell lines resistant to cytostatics currently used in therapy, i.e. cisplatin, vinblastine, gemcitabine and both cisplatin and gemcitabine, and then performing their molecular characterization. The aim of the second part of the study was to synthesize a set of structurally diverse isothiocyanates derived from amino acid esters and to evaluate the biological activity of the synthesized compounds against bladder cancer cells, characterized during the first part of the study.

Based on the results obtained, it was found that the drug-resistant cells, derived from various parental cell lines, despite the fact that they are resistant to the same cytostatics, developed their resistance through different mechanisms, which was found based on the level of the genes and proteins associated with resistance. This resulted in completely different cross-resistance profiles of bladder cancer-resistant cells to other compounds.

During the second part of the research, 29 novel isothiocyanates, derived from amino acid esters were synthesized. Compounds were synthesized as two series. The first one included 18 compounds: methyl, butyl, ethyl, benzyl, isopropyl and cyclohexyl esters of alanine, phenylalanine or phenylglycine. On the basis the results of the *in vitro* antiproliferative activity of these compounds, it was found that isothiocyanates, which are derivatives of methyl esters, are more active than the others. Therefore, the second series included 11 isothiocyanates containing methyl esters group. These compounds were also subjected to *in vitro* antiproliferative tests in order to select the most active compounds and investigate the mechanisms responsible for their biological activity, and then try to answer the question of how the structure of isothiocyanates affects their antiproliferative activity. The results obtained indicate that the synthesized compounds demonstrate antiproliferative activity against both, sensitive and drug-resistant bladder cancer cells. Mechanisms of its activity include: increased activity of caspase 3/7, inhibition of the cell cycle in the G2/M phase, reduced clonogenic potential of cells, and inhibition of tubulin polymerization. It has been shown that the chemical structure of isothiocyanates has an impact on their biological activity, i.e. the simpler the side chain of the isothiocyanate amino acid and the shorter the aliphatic chain of the ester, the greater antiproliferative activity of the compound.

In summary, during research for this doctoral dissertation, four new drug-resistant bladder cancer cell lines were developed and their molecular characterization was performed. 29 isothiocyanates derived from amino acid esters were synthesized, which exhibit antiproliferative activity against cells of the sensitive and drug-resistant bladder cancer cell lines. It has been proven that the chemical structure of the synthesized isothiocyanates affects their antiproliferative properties.



## WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

---

<b>ABC</b>	ang. <i>ATP-binding cassette transporter</i> ; transporter ABC (białko mające kastę wiążącą ATP)
<b>ABCBI</b>	ang. <i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1</i> ; zależna od ATP translokaza ABC
<b>Abu</b>	kwasy α-aminomasłowy
<b>AC</b>	ang. <i>Adjuvant Chemotherapy</i> ; adjuwantowa chemioterapia
<b>ADC</b>	ang. <i>Adenocarcinoma</i> ; gruczolakorak
<b>Aib</b>	kwasy 2-aminoizomasłowy
<b>AITC</b>	ang. <i>Allyl Isothiocyanate</i> ; izotiocyjanian allilu
<b>Ala</b>	alanina
<b>AMC</b>	<i>7-amino-4-methylcoumarin</i> ; 7-amino-4-metylokumaryna
<b>AP-1</b>	ang. <i>Activator Protein 1</i> ; białko aktywujące 1
<b>APS</b>	ang. <i>Ammonium Persulfate</i> ; nadsiarczan amonu
<b>ARE</b>	ang. <i>Antioxidant Response Element</i> ; element odpowiedzi antyoksydacyjnej
<b>ASS1</b>	ang. <i>Argininosuccinate Synthase 1</i> ; gen kodujący syntazę argininobursztynianową 1
<b>ATCC</b>	ang. <i>American Type Culture Collection</i> ; Amerykańska Kolekcja Kultur
<b>ATP7A</b>	ang. <i>ATPase Copper Transporting Alpha</i> ; białko Menkesa
<b>ATP7B</b>	ang. <i>ATPase Copper Transporting Beta</i> ; ATPaza transportująca Cu <sup>2+</sup>
<b>Bax</b>	ang. <i>Bcl-2-associated X protein</i> ; białko Bax
<b>BCG</b>	Bacille Calmette-Guérin
<b>Bcl2</b>	ang. <i>B-cell Lymphoma 2</i> , białko Bcl2
<b>BID</b>	ang. <i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i> ; gen agonisty śmierci domeny oddziałującej z BH3
<b>BITC</b>	ang. <i>Benzyl Isothiocyanate</i> ; izotiocyjanian benzylu
<b>BSA</b>	ang. <i>Bovine Serum Albumin</i> ; surowicza albumina wołowa
<b>BrdU</b>	ang. <i>Bromodeoxyuridine</i> ; bromodeoksyurydyna

<b>BSO</b>	ang. <i>Buthionine Sulfoximine</i> ; kwas (2R)-2-amino-4-(S-butylosulfonimidoilo)butanowy
<b>BRC</b>	ang. <i>BioResource Center</i> ; centrum biozasobów
<b>BTA</b>	ang. <i>Bladder Tumor Antigen</i> ; antygen nowotworu pęcherza moczowego
<b>BZT</b>	bortezomib
<b>CDDP</b>	cisplatyna
<b>CDH1</b>	ang. <i>Cadherin 1</i> ; gen kodujący E-kadherynę
<b>CDK</b>	ang. <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> , kinaza cyklinozależna
<b>CDKN1B</b>	ang. <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B</i> ; inhibitor kinazy zależnej od cyklin 1B
<b>CI</b>	ang. <i>Confidence Interval</i> , przedział ufności
<b>CDKN2A</b>	ang. <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i> ; inhibitor kinazy zależnej od cyklin 2A
<b>CTR1</b>	ang. <i>Copper Transport Protein 1</i> , białko transportujące miedź
<b>CMV</b>	cisplatyna, metotreksat, winblastyna
<b>COVID-19</b>	ang. <i>Coronavirus Disease 2019</i> ; choroba koronawirusowa 2019
<b>CSC</b>	ang. <i>Cancer Stem Cells</i> ; nowotworowe komórki macierzyste
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>dCK</b>	ang. <i>Deoxycytidine Kinase</i> ; kinaza deoksycytydynowa
<b>dFdCMP</b>	ang. <i>2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine monophosphate</i> ; monofosforan gemcytabiny
<b>dFdCDP</b>	ang. <i>2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine diphosphate</i> ; difosforan gemcytabiny
<b>dFdCTP</b>	ang. <i>2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine triphosphate</i> ; trifosforan gemcytabiny
<b>DHFR</b>	ang. <i>Dihydrofolate Reductase</i> ; reduktaza dihydrofolianowa
<b>DMEM</b>	ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ; podłoże hodowlane
<b>DMSO</b>	ang. <i>Dimethylsulfoxide</i> ; dimetylosulfotlenek
<b>DNA</b>	ang. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; kwas deoksyrybonukleinowy
<b>DOX</b>	doksorubicyna

<b>DSMZ</b>	niem. <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i> ; Niemeicki Zbiór Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych
<b>DTT</b>	ang. <i>Dithiotreitol</i> ; ditotreitól
<b>ECHDC1</b>	ang. Ethylmalonyl-CoA Decarboxylase 1; gen kodujący etylomalonylodekarboksylazę CoA
<b>EDTA</b>	ang. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> ; kwas wersenowy
<b>EGF</b>	ang. <i>Epidermal Growth Factor</i> ; nabłonkowy czynnik wzrostu
<b>EGFR</b>	ang. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> ; receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
<b>EMA</b>	ang. <i>European Medicines Agency</i> ; Europejska Agencja Leków
<b>EMDA</b>	ang. <i>Electro-Motive Drug Administration</i> ; system elektromotorycznej dystrybucji leku
<b>EMT</b>	ang. <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> ; przejście nabłonkowo-mezenchymalne
<b>eq</b>	gramorównoważnik (ekwiwalent stechiometryczny)
<b>ERBB2</b>	ang. <i>Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i> ; receptor Erb-b2 kinazy tyrozynowej 2
<b>ERCC2</b>	ang. <i>ERCC Excision Repair 2</i> ; białko zaangażowane w naprawę przez wycinanie nukleotydów sprzężonych z transkrypcją
<b>ERK1/2</b>	ang. <i>Extracellular Signaling-Regulated Kinase</i> ; kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
<b>EtITC</b>	ang. <i>Ethyl Isothiocyanate</i> ; izotiocyjanian etylu
<b>FBS</b>	ang. <i>Fetal Bovine Serum</i> ; bydlęca surowica płodowa
<b>FDA</b>	ang. <i>Food and Drug Administration</i> ; Agencja Żywności i Leków
<b>FGFR</b>	ang. <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> ; receptor czynnika wzrostu fibroblastów
<b>FGFR3</b>	ang. <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i> ; receptor 3 czynnika wzrostu fibroblastów
<b>FISH</b>	ang. <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> ; fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>
<b>FOXA1</b>	ang. <i>Forkhead Box Protein A1</i> ; czynnik transkrypcyjny FOXA1
<b>FOXO 3</b>	ang. <i>Forkhead Box O3</i> ; czynnik transkrypcyjny FOXO3
<b>GABA</b>	kwas $\gamma$ -aminomasłowy

<b>GAPDH</b>	ang. <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i> ; dehydrogenaza aldehydu 3-fosforanowego gliceryny
<b>GATA3</b>	ang. <i>GATA Binding Protein 3</i> ; białko wiążące GATA3
<b>GC</b>	gemcytabina, cisplatyna
<b>gDNA</b>	ang. <i>genomic DNA</i> ; genomowe DNA
<b>GEM</b>	gemcytabina
<b>Gly</b>	glicyna
<b>GSH</b>	ang. <i>Glutathione</i> ; glutation
<b>GSSG</b>	ang. <i>Glutathione Disulfide</i> ; disiarczek glutationu, glutation utleniony
<b>GST</b>	ang. <i>Glutathione S-Transferase</i> ; S-transferaza glutationowa
<b>GSTM1</b>	ang. <i>Glutathione S-Transferase Mu 1</i> ; glutationowa S-transferaza Mu1
<b>GU</b>	ang. <i>genomically unstable</i> ; niestabilny genomowo
<b>hENT1</b>	ang. <i>Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1</i> ; ludzki transporter równoważnych nukleozydów 1
<b>HEPES</b>	ang. <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> ; kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy
<b>HER2</b>	ang. <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> ; ludzki naskórkowy czynnik wzrostu
<b>HIF-1</b>	ang. <i>Hypoxia Inducible Factor 1</i> ; czynnik indukowany hipoksją 1
<b>HPLC</b>	ang. <i>High-Performacne Liquid Chromatography</i> ; wysokosprawna chromatografia cieczowa
<b>HPV</b>	ang. <i>Human Papilloma Virus</i> ; ludzki wirus brodawczaka
<b>HUVEC</b>	ang. <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> ; ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej
<b>IARC</b>	ang. <i>International Agency for Research on Cancer</i> ; Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
<b>IC<sub>50</sub></b>	ang. <i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i> ; stężenie powodujące cytotoksyczność wobec 50% komórek
<b>IgG</b>	immunoglobuliny G
<b>IITD PAN</b>	Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk

<b>Ile</b>	izoleucyna
<b>IL-1</b>	ang. <i>interleukin 1</i> ; interleukina 1
<b>IL-2</b>	ang. <i>interleukin 2</i> ; interleukina 2
<b>IL-6</b>	ang. <i>interleukin 6</i> ; interleukina 6
<b>ISUP</b>	ang. <i>International Society of Urological Pathology</i> ; Międzynarodowe Towarzystwo Uropatologiczne
<b>ITC</b>	ang. <i>isothiocyanate</i> ; izotiocyjanian
<b>JNK1/2</b>	ang. <i>c-Jun N-Terminal Kinase</i> , kinaza c-Jun N-terminalna
<b>KRT5/6</b>	ang. <i>Keratin 5/6</i> ; keratyna 5/6
<b>KRT14</b>	ang. <i>Keratin 14</i> ; keratyna 14
<b>KRT20</b>	ang. <i>Keratin 20</i> ; keratyna 20
<b>L-Gln</b>	L-glutamina
<b>Leu</b>	leucyna
<b>MAPK</b>	ang. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> ; kinaza aktywowana mitogenami
<b>MBOCA</b>	ang. <i>methylenebis(2-chloroaniline)</i> ; metylenobis(2-chloroanilina)
<b>MCL1</b>	ang. <i>Myeloid Leukemia 1</i> ; białko MCL1
<b>MDR</b>	ang. <i>Multi Drug Resistance</i> , oporność wielolekowa
<b>MDR1</b>	ang. <i>Multi Drug Resistance 1</i> ; gen oporności wielolekowej
<b>Met</b>	metionina
<b>MIBC</b>	ang. <i>Muscle Invasive Bladder Cancer</i> ; rak naciekający mięśniówkę
<b>MMP</b>	ang. <i>Matrix Metalloproteinases</i> ; metaloproteiny macierzy pozakomórkowej
<b>MRP</b>	ang. <i>Multidrug Resistance-Associated Protein</i> ; białko oporności wielolekowej
<b>MT2A</b>	ang. <i>Metallothionein 2A</i> ; metalotioneina 2A
<b>MYC</b>	ang. <i>Master Regulator of Cell Cycle Entry and Proliferative Metabolism</i> ; główny regulator wejścia w cykl komórkowy i metabolizmu proliferacyjnego
<b>MVAC</b>	metotreksat, winblastyna, adriamycyna, cisplatyna
<b>NAC</b>	ang. <i>Neoadjuvant Chemotherapy</i> ; neoadjuwantowa chemioterapia

<b>NAT2</b>	ang. <i>N-Acetyltransferase 2</i> ; N-acetylotransferaza 2
<b>NBI</b>	ang. <i>Narrow Band Imaging</i> ; obrazowanie w wąskim paśmie
<b>NF-κB</b>	ang. <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i> ; czynnik transkrypcyjny NF-κB
<b>NIH</b>	ang. <i>National Institutes of Health</i> ; Amerykański Narodowy Instytut Zdrowia
<b>Nle</b>	norleucyna
<b>NMIBC</b>	ang. <i>Non-Muscle Invasive Bladder Cancer</i> ; rak nie naciekający mięśniówki
<b>NMP22</b>	ang. <i>Nuclear Matrix Protein 22</i> ; białko macierzy jądrowej 22
<b>NMR</b>	ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ; spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
<b>NPS</b>	ang. <i>NMIBC Proteomic Subtypes</i> ; podtypy proteomiczne
<b>Nrf2</b>	ang. <i>Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2</i> ; czynnik transkrypcyjny Nrf2
<b>NT</b>	ang. <i>Nucleozide Transporter</i> ; transporter nukleozydowy
<b>Nva</b>	norwalina
<b>PBS</b>	ang. <i>Phosphate Bufferd Saline</i> ; izotoniczny roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami pH 7
<b>PBST</b>	PBS+0,1% Tween20
<b>PCR</b>	ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; reakcja łańcuchowej polimerazy
<b>PDGFR</b>	ang. <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i> ; receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu
<b>PEITC</b>	ang. <i>Phenetyl Isotiocyanate</i> ; izotiocyjanian fenetylu
<b>Phe</b>	fenyloalanina
<b>Phg</b>	fenyloglicyna
<b>PI</b>	ang. <i>Propidium Iodide</i> ; jodek propidyny
<b>PI3K</b>	ang. <i>Phosphatidyl Inositol 3-Kinase</i> ; kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
<b>PPARγ</b>	ang. <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i> ; proliferatory peroksysomów gamma
<b>PTEN</b>	ang. <i>Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten</i> ; białko kodowane przez gen supresorowy PTEN

<b>PTX</b>	paklitaksel
<b>PVDF</b>	ang. <i>Polivinylidene Difluoride</i> ; polifluorek winylidenu
<b>RAS</b>	ang. <i>From "Rat Sarcoma Virus"</i> ; GTP-aza RAS
<b>RB1</b>	ang. <i>Retinoblastoma 1</i> ; gen kodujący białko RB1
<b>RCCL</b>	ang. <i>The Resistant Cancer Cell Line Collection</i> ; Kolekcja Opornych Nowotworowych Linii Komórkowych
<b>RI</b>	ang. <i>Resistnace Index</i> ; indeks oporności
<b>RNA</b>	ang. <i>Ribonucleic Acid</i> ; kwas rybonukleinowy
<b>RPMI-1640</b>	ang. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ; podłoże hodowlane RPMI-1640
<b>ROS</b>	ang. <i>Reactive Oxygen Species</i> ; reaktywne formy tlenu
<b>RTK</b>	ang. <i>Receptor Tyrosine Kinase</i> ; receptor kinazy tyrozynowej
<b>SAR</b>	ang. <i>Structure-Activity Relationship</i> ; zależność struktura-aktywność
<b>SATI</b>	ang. <i>Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1</i> ; N1 acetylotransferaza spermidyny
<b>SCC</b>	ang. <i>Squamous Cell Carcinoma</i> ; rak płaskonabłonkowy
<b>SCCL</b>	ang. <i>squamous cell carcinoma-like</i> ; rak płaskonabłonkowy
<b>SD</b>	ang. <i>Standard Deviation</i> ; odchylenie standardowe
<b>SDS</b>	ang. <i>Sodium Dodecylsulfate</i> ; dodecylosiarczan sodu
<b>SFN</b>	ang. <i>Sulphoraphane</i> ; sulforafan
<b>SLC3A1</b>	ang. <i>Solute Carrier Family 3 Member 1</i> , gen kodujący białko CTR1
<b>SLC14A1</b>	ang. <i>Solute Carrier Family 14 Member 1</i> ; gen kodujący transporter mocznika
<b>SRB</b>	sulforodamina B
<b>TBS</b>	ang. <i>Tris-Buffered Saline</i> ; izotoniczny roztwór chlorku sodu buforowany Trisem pH 7
<b>TBST</b>	TBS+0,1% Tween-20
<b>TCA</b>	kwas trichlorooctowy
<b>TCC</b>	ang. <i>Transitional Cell Carcinoma</i> ; rak przejściowokomórkowy
<b>TCGA</b>	ang. <i>The Cancer Genome Atlas</i> ; atlas genomu raka
<b>TEMED</b>	ang. <i>Tetrametyloetylenodiamina</i> ; tetrametyloetylenodiamina

<b>TIMP</b>	ang. <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i> ; inhibitory metaloproteinaz
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	ang. <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> ; czynnik martwicy nowotworów
<b>TNM</b>	ang. <i>Tumor Node Metastasis</i> ; guz, węzły chłonne, przerzuty
<b>TP53</b>	ang. <i>Tumor Protein P53</i> ; gen kodujący białko p53
<b>TRIM24</b>	ang. <i>Tripartite Motif Containing 24</i> ; białko TRIM24
<b>TRIS</b>	Tris(hydroksymetylo)aminometan
<b>TSC1</b>	ang. <i>TSC Complex Subunit 1</i> ; gen kodujący hamartynę
<b>TUB<math>\beta</math>3</b>	ang. <i>Tubulin beta 3 Class III</i> ; gen kodujący $\beta$ III tubulinę
<b>TURBT</b>	ang. <i>Transurethral Resection of Bladder Tumour</i> ; przezcewkowa resekcja guza
<b>USG</b>	ultrasonografia
<b>WLC</b>	ang. <i>White-Light Cystoscopy</i> ; cystoskopia z wykorzystaniem światła białego
<b>Val</b>	walina
<b>VBL</b>	winblastyna
<b>VDS</b>	vindezyna
<b>VEGF</b>	ang. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ; czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
<b>VEGFR</b>	ang. <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> ; receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego
<b>VFL</b>	winflunina
<b>VRL</b>	winorelbina
<b>WHO</b>	ang. <i>World Health Organization</i> ; Światowa Organizacja Zdrowia
<b><math>\beta</math>-Ala</b>	$\beta$ -alanina



---

## 1. WSTĘP

---

### 1.1 RAK PĘCZERZA MOCZOWEGO NA ŚWIECIE ORAZ W POLSCE – EPIDEMIOLOGIA, CZYNNIKI RYZYKA ORAZ DIAGNOSTYKA

#### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

W ostatnich latach roczna liczba diagnozowanych nowych przypadków nowotworów na świecie przekracza 18 milionów [1]. Według statystyk już w 2030 roku przewyższy ona 20 milionów [2], a w roku 2040 wyniesie około 24 miliony [3]. Wzrost zachorowań na nowotwory jest związany przede wszystkim z rosnącą liczbą ludności oraz starzeniem się społeczeństw większości krajów świata [4]. Szacuje się, iż jedna na pięć osób zachoruje na nowotwór przed ukończeniem 75-go roku życia. Warto przy tym zaznaczyć, że liczba ta różni się w zależności od regionu; przykładowo w krajach położonych w południowo-środkowej Azji oraz środkowej Afryce jest to jeden na dziesięciu mieszkańców, natomiast w Australii oraz Nowej Zelandii jeden na dwóch. Obecnie na świecie żyje ponad 44 milionów ludzi, u których nowotwór został rozpoznany mniej niż pięć lat temu, a rocznie 10 milionów ludzi umiera z powodu nowotworu [1]. Według danych WHO (ang. *World Health Organization*; Światowa Organizacja Zdrowia) w 2015 r. nowotwór złośliwy (w potocznym języku określany jako rak) był główną przyczyną śmierci ludzi przed 70-tym rokiem życia w 91 spośród 172 krajów [4]. Natomiast już w 2019 r. przodował w 112 krajach spośród 183, z których pochodziły dane epidemiologiczne [3]. W marcu 2020 r., kiedy rozpoczęła się pandemia COVID-19 (ang. *Coronavirus Disease 2019*; choroba koronawirusowa 2019), doszło do czasowych zamknięć lub utrudnień w dostępie pacjentów do systemu opieki zdrowotnej. Zawieszeniu uległo wiele programów badań przesiewowych oraz niemożliwe było wykonanie w szybkim czasie badań diagnostycznych. Wszystkie wymienione powyżej czynniki spowodowały, że w najbliższych latach spodziewany jest krótkoterminowy, pozorny spadek zachorowalności na nowotwory. Jednakże następstwem tej sytuacji będzie wzrost diagnozowania w kolejnych latach nowotworów w stadium zaawansowanym oraz wzrost śmiertelności [3]. Najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym na świecie jest nowotwór płuc (sumując dane epidemiologiczne dla kobiet oraz mężczyzn), tuż za nim znajdują się rak piersi, prostaty oraz jelita grubego [4]. Nowotwory układu moczowo-płciowego stanowią 26% wszystkich diagnozowanych przypadków na świecie [5], natomiast nowotwory pęcherza moczowego to około 3% zachorowań [1].

Według danych opublikowanych przez GLOBOCAN w 2012 r. rak pęcherza moczowego zajmował 9 miejsce wśród zachorowań na nowotwory na świecie, natomiast wśród mężczyzn zajmował 7 pozycję. Zostało wówczas zdiagnozowanych ponad 430 000 przypadków raka pęcherza moczowego oraz miało miejsce około 165 000 zgonów spowodowanych tą chorobą [6]. W 2018 r. rak pęcherza moczowego był dziesiątym najczęściej diagnozowanym nowotworem (550 000 potwierdzonych przypadków) [7, 8]. W 2020 roku potwierdzono już 573 000 nowych przypadków raka pęcherza moczowego, a 213 000 osób zmarło z jego powodu [3]. Przedstawione powyżej dane epidemiologiczne pokazują niepokojący trend wzrostu nowych przypadków nowotworu pęcherza moczowego w kolejnych latach, co oznacza, iż z roku na rok osób chorujących na ten nowotwór będzie coraz więcej.

Znakomita większość osób chorujących na nowotwory pęcherza moczowego to mężczyźni (stanowią oni około 75% wszystkich zachorowań) [9]. Kraje z najwyższymi notowanymi wskaźnikami zachorowalności na raka pęcherza moczowego to kraje zachodniej i południowej Europy oraz Ameryki Północnej [7], a także Syria, Izrael, Egipt i Turcja [1], natomiast najniższe wskaźniki dotyczą krajów położonych w środkowej i zachodniej Afryce oraz środkowej Ameryce [7]. Dysproporcje geograficzne pod względem zachorowalności wynikają głównie z faktu, iż mieszkańcy różnych krajów są narażeni w innym stopniu na czynniki zwiększające ryzyko zachorowalności na nowotwór pęcherza moczowego. Ponadto w krajach rozwijających się, gdzie obywatele mają utrudniony dostęp do służby zdrowia, diagnostyka nowotworów jest utrudniona, przez co sama diagnoza stawiana jest zbyt późno, co ma istotny wpływ na wzrost śmiertelności [1, 10].

Innym z istotnych czynników wpływających na zachorowalność, przeżywalność oraz diagnostykę raka pęcherza moczowego jest sytuacja społeczno-ekonomiczna kraju. Brak edukacji w zakresie ochrony zdrowia oraz słaba jakość opieki zdrowotnej sprawiają, że osoby o niskim statusie społeczno-ekonomicznym są wielokrotnie bardziej narażone na zachorowanie lub są diagnozowane zbyt późno [2].

W Polsce choroby nowotworowe są drugą najczęstszą przyczyną śmierci Polaków, tuż po chorobach układu sercowo-naczyniowego. W ciągu ostatnich 30 lat liczba diagnozowanych nowotworów oraz śmiertelność powodowana nowotworami zwiększyła się ponad dwukrotnie. W 1980 r. zdiagnozowanych zostało 64 820 przypadków, natomiast w 2016 r. było ich już 164 140. Tak duży wzrost związany jest przede wszystkim ze zmieniającą się strukturą demograficzną społeczeństwa, tzn. z rosnącą liczbą osób, które

przekroczyły 65 rok życia, gdyż w tej grupie wiekowej nowotwory diagnozowane są najczęściej. Ponadto w obecnych czasach istnieje o wiele większe ryzyko narażenia na karcynogeny aniżeli kilkadziesiąt lat temu [11]. Do najczęściej występujących nowotworów wśród kobiet w Polsce można zaliczyć nowotwory piersi, płuc, jelita grubego, endometrium oraz jajników. Nowotwory te odpowiedzialne są również za największą liczbę zgonów. Najczęściej diagnozowanymi nowotworami wśród mężczyzn, będącymi jednocześnie przyczyną największej liczby zgonów, są rak prostaty, płuc, jelita grubego, pęcherza moczowego oraz żołądka [11].

Rak pęcherza moczowego odpowiada każdego roku za około 7% nowych zachorowań na nowotwory wśród mężczyzn w Polsce. W 2020 r. zostało zdiagnozowanych 11 521 przypadków, z czego 8 525 dotyczyło mężczyzn [12]. Pomimo postępu związanego z dostępem do leczenia onkologicznego w Polsce wciąż obserwuje się olbrzymi wzrost zachorowań na raka pęcherza moczowego [11, 13]. W ciągu ostatnich 15 lat nie odnotowano spadku liczby nowych przypadków, a wręcz przeciwnie, wskaźnik ten z roku na rok jest coraz wyższy. Ponadto śmiertelność w Polsce spowodowana nowotworami pęcherza moczowego jest jedną z najwyższych w Europie [13]

### **1.1.2 CZYNNIKI RYZYKA**

Czynniki zwiększające ryzyko zachorowania na nowotwór pęcherza moczowego można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej zaliczyć należy czynniki, na których intensywność oddziaływania można wpłynąć lub można je całkowicie wyeliminować. Przede wszystkim jest to palenie papierosów, wykonywany zawód, używane chemikalia, dieta, spożywane płyny oraz stosowane leki. Druga grupa obejmuje czynniki, na które nie można wpłynąć, jak płeć, wiek, uwarunkowania genetyczne, ogólny stan zdrowia oraz kondycja układu moczowo-płciowego (*Ryc. 1*).



*Ryc. 1. Czynniki zwiększające ryzyko zachorowalności na nowotwory pęcherza moczowego.*

#### CZYNNIKI RYZYKA, NA KTÓRYCH INTENSYWNOŚĆ ODDZIAŁYWANIA MOŻNA WPŁYNAĆ LUB MOŻNA JE WYELIMINOWAĆ

##### Palenie papierosów

Wpływ palenia papierosów na zachorowalność na raka pęcherza moczowego jest przedmiotem wielu badań epidemiologicznych. Wskazują, one iż palenie papierosów jest jedną z głównych przyczyn stale rosnącej liczby zachorowań na nowotwory pęcherza moczowego. W związku z tym, iż rozwój nowotworu pęcherza moczowego wymaga kilkudziesięciu lat ekspozycji na karcynogeny, diagnozuje się go najczęściej u osób powyżej 65 roku życia, które przez większość życia były palaczami [7]. Szacuje się, iż palenie odpowiada za 50-65% zachorowań [14]. Ryzyko zachorowania wśród palaczy jest nawet 5-krotnie większe w porównaniu do osób niepalących i rośnie wraz z intensywnością palenia - palenie paczki papierosów dziennie zwiększa ryzyko zachorowania 5-krotnie, natomiast „umiarkowane” palenie kilku papierosów dziennie „tylko” 2-krotnie [15]. Ponadto ryzyko zachorowania wśród palaczy jest również uwarunkowane płcią i jest 3 do 5 razy większe wśród mężczyzn niż wśród kobiet [16].

Tytoń w swoim składzie posiada wiele substancji o charakterze karcynogennym takich jak aromatyczne aminy, N-nitrozoaminy,  $\beta$ -naftyloaminę czy wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [10]. Zmieniający się na przestrzeni lat skład papierosów skutkowało zwiększeniem stężenia karcynogenów, które znacząco zwiększają ryzyko

zachorowania na raka pęcherza moczowego [7, 15]. Większość związków o charakterze karcynogennym w postaci niezmienionej (lub metabolicznie aktywnej) trafia do pęcherza moczowego. Związki te pozostają w stałym kontakcie z komórkami nabłonkowymi wyściełającymi wewnątrz pęcherza moczowego dopóki mocz nie zostanie usunięty z organizmu [17] powodując powstawanie stanu zapalnego w komórkach nabłonkowych, a ich metabolizm zachodzący w pęcherzu moczowym prowadzi do powstawania uszkodzeń oraz adduktów DNA (ang. *Deoxyribonucleic Acid*; kwas deoksyrybonukleinowy), a następnie trwałych mutacji genetycznych. Mutacje takie mogą aktywować onkogeny lub hamować geny supresorowe, czego konsekwencją jest rozpoczęcie karcynogenezy [7]. Bardziej narażeni na działanie karcynogenów są palacze ciemnego tytoniu, który jest dodawany do tytoniu fajkowego oraz do cygar, aniżeli palacze jasnego tytoniu, co jest związane z większym stężeniem amin aromatycznych np. 4-aminobifenolu w ciemnym tytoniu. W etiologii raka pęcherza moczowego wpływ palenia oraz używania innych wyrobów tytoniowych, m.in. fajek, cygar czy tabaki, ale również bezdymnego tytoniu oraz fajek wodnych nie jest do końca poznany [15, 18]. Choć palacze fajek oraz cygar mniej inhalują się dymem aniżeli palacze papierosów, przez co są mniej narażeni na zachorowanie na raka pęcherza moczowego, to z drugiej strony częściej chorują na nowotwory głowy i szyi [18]. Co warte podkreślenia, podobne związki o charakterze karcynogennym są obecne w moczu osób używających e-papierosów, jak i palących tradycyjne papierosy [10]. Wpływ biernego palenia na zachorowalność na nowotwór pęcherza moczowego nie jest do końca poznany. Według niektórych źródeł istnieje powiązanie pomiędzy biernym paleniem a zachorowalnością na raka pęcherza moczowego, które jest szczególnie widoczne wśród kobiet. Wskazuje się, iż ekspozycja na dym papierosowy w okresie dzieciństwa, jak również w wieku dojrzałym, zwiększa ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego [19]. W innych badaniach natomiast nie odnotowano różnic pomiędzy osobami biernie palącymi a zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka pęcherza moczowego, porównując je do osób nigdy nie palących oraz nie będących narażonymi na bierne palenie [20].

Zaprzestanie palenia papierosów skutkuje obniżeniem ryzyka zachorowania o 30-60%. Byli palacze, którzy przestali palić wiele lat temu oraz palili przez stosunkowo krótki czas są obciążeni niewielkim ryzykiem zachorowalności, które można porównać do ryzyka jakim obciążone są osoby nigdy nie palące [15].

### Wykonywany zawód

Tuż po paleniu papierosów drugim, obejmującym około 10-18% przypadków, czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego jest wykonywanie zawodu związanego z narażeniem na różnego rodzaju związki chemiczne, w szczególności aminy aromatyczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne oraz chlorowane węglowodory [7, 19, 22]. Pierwsze doniesienia opisujące związek pomiędzy narażeniem na aminy aromatyczne a rakiem pęcherza moczowego zostały opisane w 1895 r. przez niemieckiego fizyka Ludwiga Rehna, który stwierdził występowanie dużej liczby zachorowań na raka pęcherza moczowego wśród pracowników fabryk produkujących barwniki [23]. W 1954 r. Case *i wsp.* wykazał, iż pracownicy przemysłu związanego z produkcją barwników w Anglii oraz Walii są obarczeni 10 do 50 razy większym ryzykiem śmierci związanym z rakiem pęcherza moczowego po ekspozycji na 2-naftyloaminę oraz benzydynę. Ekspozycja na anilinę nie zwiększała ryzyka śmierci, natomiast ekspozycja na 1-naftyloaminę zwiększała, gdyż była *de facto* zanieczyszczona 2-naftyloaminą [21]. Wiele innych badań opisuje związek pomiędzy zachorowaniem na raka pęcherza moczowego, a wykonywanym zawodem. W szczególności zawodami, w których istnieje ryzyko narażenia na płyny wykorzystywane do obróbki metali, aminy aromatyczne (jak toluidyna znajdująca się w barwnikach) oraz tetrachloroetylen (wykorzystywany w pralniach chemicznych). Do grupy podwyższonego ryzyka należą malarze, zawodowi kierowcy pojazdów ciężarowych oraz innych pojazdów mechanicznych, a także pracownicy zatrudnieni przy produkcji tytoniu, barwników, amin aromatycznych, produktów gumowych, jak również skórzanych [15, 24]. Toluidyna jest aminą aromatyczną używaną w produkcji barwników, gum syntetycznych oraz jako utwardzacz żywic epoksydowych. W 2008 r. została zakwalifikowana przez IARC (ang. *International Agency for Research on Cancer*; Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem) do grupy 1 – jako karcynogen [15], natomiast tetrachloroetylen używany jako środek czyszczący w pralniach do grupy 2A – jako prawdopodobny karcynogen [15]. Badania przeprowadzone w jednej z tajlandzkich fabryk nad MBOCA (ang. *methylenebis(2-chloroaniline)*; metylenobis(2-chloroanilina)) wykorzystywaną w produkcji części poliuretanowych wykazały, że wdychana przez pracowników fabryk w formie aerozoli, a także wchłaniana przez skórę zwiększa zachorowalność na nowotwory pęcherza moczowego [18]. Wykazano, że już dwuletnia ekspozycja na wymienione powyżej związki istotnie podwyższa zachorowalność na nowotwory pęcherza. Warto

jednakże zaznaczyć, iż choroba nie rozwija się od razu, lecz nawet dziesiątki lat po kontakcie z tymi karcynogenami [7].

#### Chemikalia stosowane na co dzień oraz zanieczyszczenia występujące w środowisku

Częste i regularne używanie farb do włosów jest również uznawane za jeden z czynników zwiększających ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego. Badania epidemiologiczne przeprowadzone wśród fryzjerów pracujących codziennie z farbami do włosów ujawniły, iż w ich krwi znajdowały się wcześniej wspomniane toluidyna, 4-aminobifenyl oraz inne aminy aromatyczne [15]. Zanieczyszczenia występujące w wodzie pitnej oraz żywności to kolejne czynniki mające wpływ na wzrost ryzyka zachorowania. Wyniki badań przeprowadzonych w Argentynie, Chile oraz Bangladeszu wykazały, iż zanieczyszczenie wody pitnej arsenem koreluje z podwyższonym ryzykiem wystąpienia raka pęcherza moczowego [10, 19, 22]. Mieszkańcy Bangladeszu są chronicznie narażeni na wysokie stężenia arsenu w wodzie pitnej (przekraczające 2000 µg/l), podczas gdy jego stężenie przyczyniające się do zwiększenia ryzyka zachorowania na raka pęcherza moczowego wynosi około 300-500 µg/l [18]. Mechanizm powstawania raka pęcherza moczowego pod wpływem arsenu nie jest do końca znany. Arsen może hamować działanie enzymów zawierających grupy sulfhydrylowe oraz hamować metabolizm komórkowy związany z cytotoksycznością oraz genotoksycznością. Wyniki badań przeprowadzonych na grupie osób z nowotworem pęcherza moczowego chronicznie narażonych na działanie arsenu wykazały obecności mutacji w genie p53 [18]

#### Dieta

Podobnie jak w przypadku innych chorób, także w przypadku raka pęcherza moczowego przebadano wpływ stosowanej diety na zwiększenie ryzyka zachorowalności na raka pęcherza moczowego [10]. Czynniki związane z dietą, takie jak spożywanie czerwonego mięsa czy alkoholu, w różnym stopniu podwyższają ryzyko zachorowania na nowotwór pęcherza moczowego [15]. Spożywanie dużych ilości czerwonego mięsa (szczególnie tłustego) oraz mięsa przetworzonego (produkty mięsne w puszkach oraz mięso grillowane) zwiększa ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego odpowiednio o 17% oraz 10% [7]. Mutageny zaangażowane w rozwój nowotworu pęcherza moczowego prawdopodobnie mogą powstawać w trakcie obróbki cieplnej produktów mięsnych, szczególnie podczas smażenia produktów bogatych w tłuszcze [14]. Nie zaobserwowano przy tym istotnego wpływu spożycia alkoholu na zapadalność na nowotwory pęcherza moczowego [7, 14]. Co ciekawe, zaobserwowana w przeszłości

zwiększona zachorowalność wśród osób regularnie spożywających kawę sprawiła, iż kawa była uznawana za potencjalny karcynogen. Niemniej jednak wyniki najnowszych badań pokazały, iż tak naprawdę czynności powiązane z piciem kawy jak np. palenie papierosów są odpowiedzialne za wzrost zachorowalności, a nie sama kawa [19, 25]. Podobnie picie herbaty, coli oraz napojów energetycznych nie zwiększa ryzyka zachorowalności na raka pęcherza moczowego [10].

„Całkowite spożycie płynów” czyli dobowe spożycie płynów przez danego człowieka także może być związane z zachorowalnością na raka pęcherza moczowego. Z jednej strony duże całkowite spożycie płynów obniża ryzyko zachorowania [15], co może być spowodowane zwiększoną częstotliwością oddawania moczu, a w konsekwencji skróceniem czasu kontaktu karcynogenów znajdujących się w moczu z nabłonkiem wyścielającym powierzchnię pęcherza moczowego [16, 25]. Natomiast w innym badaniu sugerowano wzrost zachorowalności wraz ze zwiększonym całkowitym spożyciem płynów. Różnice te mogą potencjalnie wynikać z odmiennej interpretacji pojęcia „całkowite spożycie płynów”. Przez niektórych badaczy jest ono interpretowane jako spożycie wszystkich płynów zawierających wodę kranową, wraz z kawą oraz herbatą, podczas gdy inni nie zaliczają do tego pojęcia płynów zawierających wodę kranową [15]. Zmniejszona wówczas częstotliwość oddawania moczu sprawia, że występujące w wysokim stężeniu karcynogeny pozostają dłużej w kontakcie z nabłonkiem wyścielającym pęcherz moczowy, co może sprzyjać rozwojowi nowotworu tego narządu [25].

Z drugiej strony istnieją produkty, które obniżają ryzyko zachorowalności na nowotwory pęcherza moczowego. Częste spożywanie świeżych warzyw, szczególnie warzyw krzyżowych, np. kapusty, jarmużu, kalafiora czy też rzeżuchy oraz owoców cytrusowych znacząco obniża ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego [14, 15, 26].

### Stosowane leki

Stosowanie leków z określonych grup również ma wpływ na zmniejszenie lub zwiększenie ryzyka zachorowania na raka pęcherza moczowego. Lekami, których regularne stosowanie obniża ryzyko zachorowalności na nowotwory pęcherza moczowego są m.in. niesteroidowe leki przeciwzapalne. Efekt przeciwnowotworowy stosowania takich leków wynika z ich przeciwzapalnej aktywności [24].



Grupą leków mogących wpływać na zwiększenie ryzyka zachorowalności na raka pęcherza moczowego są leki podawane doustnie w leczeniu cukrzycy jak np. pioglitazon, rozyglitazon oraz lobeglitazon. Warto zaznaczyć, iż w piśmiennictwie można znaleźć badania potwierdzające ten efekt ale również takie, które opisują zupełnie odwrotny efekt działania leków przeciwcukrzycowych [24].

Wzrost ryzyka zachorowalności na raka pęcherza moczowego zaobserwowano również wśród młodych kobiet po regularnym stosowaniu leków przeciwbólowych zawierających fenacetynę, wykluczając przy tym wpływ innych czynników ryzyka [14]. Innym lekiem, który zwiększa ryzyko zachorowalności na raka pęcherza moczowego jest cyklofosfamid. Jest to lek, dla którego zaobserwowano zależność dawka-odpowiedź w stosunku do tego ryzyka [14].

#### CZYNNIKI RYZYKA, NA KTÓRYCH INTENSYWNOŚĆ ODDZIAŁYWANIA NIE MOŻNA WPŁYNAĆ Płeć oraz wiek

Na całym świecie rak pęcherza moczowego występuje 4 razy częściej wśród mężczyzn, niż wśród kobiet [7]. Uważa się, iż obserwowane różnice w zachorowalności oraz śmiertelności są związane z kilkoma czynnikami – częstotliwością palenia papierosów (w ujęciu globalnym mężczyźni palą znacznie częściej [10]), wykonywanym zawodem (głównie mężczyźni wykonują zawody, które podwyższają ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego), oraz częstszym spożywaniem czerwonego mięsa przez mężczyzn [7]. Rak pęcherza moczowego określany jest jako choroba osób starszych, najczęściej diagnozowany jest po 65 roku życia [27]. Rozwój choroby wymaga czasu. Szacuje się, iż nawet kilkudziesięciu lat po zakończeniu ekspozycji na karcynogeny. Dochodzi wówczas do pokonania komórkowych mechanizmów supresorowych i rozpoczęcia procesu karcynogenezy [7].

#### Czynniki genetyczne

Uważa się, iż nowotwór pęcherza moczowego nie jest chorobą dziedziczną [7]. Jednak ryzyko zachorowania krewnych pierwszego stopnia pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem pęcherza moczowego jest dwukrotnie wyższe, niż osób, które nie posiadają w rodzinie osób ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego [19]. Jednymi z czynników genetycznych, które wpływają na rozwój nowotworu pęcherza moczowego są m.in.: N-acetylotransferaza 2 (kodowana przez gen *NAT2* ang. *N-Acetyltransferase 2*) – odpowiedzialna za detoksyfikację amin aromatycznych oraz glutationowa S-transferaza

Mu1 (kodowana przez gen *GSTM1* ang. *Glutathione S-Transferase Mu 1*) enzym biorący udział w detoksyfikacji karcynogenów pochodzących ze środowiska [7]. NAT2 oraz *GSTM1* nie prowadzą bezpośrednio do zwiększenia ryzyka zachorowalności, natomiast mogą powodować zwiększenie wrażliwości na działanie substancji karcynogennych. Wymienione powyżej enzymy biorą udział w metabolizowaniu karcynogenów pochodzących z tytoniu, a ich aktywność jest zmienna osobniczo. W związku z tym u osób posiadających niską wydajność N-acetylotransferazy 2 dochodzi do nagromadzenia karcynogenów w komórkach, powodując tym samym zwiększenie ryzyka zachorowalności na nowotwory pęcherza moczowego [19]. Warto również wspomnieć o mutacji jednego z transporterów mocznika kodowanego przez gen *SLC14A1* (ang. *Solute Carrier Family 14 Member 1*; gen kodujący transporter mocznika). Mutacje tego genu wiążą się ze zmianami stężenia moczu w nerkach, co może mieć wpływ na bezpośredni kontakt karcynogenów znajdujących się w moczu z nabłonkiem wyściełającym pęcherz moczowy [28]. Niektóre choroby dziedziczne także prowadzić mogą do rozwoju choroby nowotworowej. Przykładem takiej choroby jest zespół Cowdena, w którym występuje mutacja w genie *PTEN* (ang. *Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten*). W wyniku mutacji tego genu, powstające białko nie jest zdolne do hamowania proliferacji komórek nowotworowych, czego następstwem jest rozwój nowotworu [7].

#### Przewlekłe schorzenia układu moczowego oraz ogólny stan zdrowia

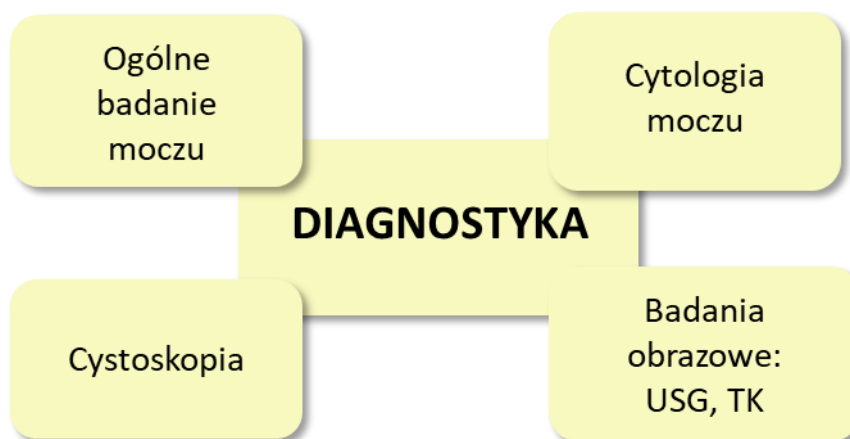
Przewlekłe choroby układu moczowego, takie jak zapalenie pęcherza moczowego czy schistosomatoza wywoływana przez przywry *Schistosoma haematobium*, uznawane są za czynniki zwiększające ryzyko zachorowalności na raka pęcherza moczowego. Schistosomatoza wywołując przewlekłe stany zapalne komórek nabłonkowych wyściełających wewnętrzną powierzchnię pęcherza moczowego, prowadzi do uszkodzeń tych komórek, a w konsekwencji do zwiększenia stężenia karcynogenów w moczu [14]. W związku z czym odnotowuje się wiele zachorowań w regionach, w których występuje schistosomatoza, jak Egipt czy Zambia [16]. Ponadto infekcje wirusowe, szczególnie wywoływane wirusem HPV (ang. *Human Papilloma Virus*; ludzki wirus brodawczaka) także zaliczane są do czynników zwiększających ryzyko zachorowalności. Radioterapia także może wpływać na zwiększone ryzyko zachorowalności na raka pęcherza moczowego, a w szczególności radioterapia związana z leczeniem raka prostaty. Pacjenci,

którzy byli poddawani takiej radioterapii, zaliczani są do grupy podwyższonego ryzyka zachorowania na raka pęcherza moczowego [28].

### 1.1.3 DIAGNOSTYKA

Obecnie diagnostyka nowotworów pęcherza moczowego opiera się głównie na (*Ryc. 2*):

- ogólnym badaniu moczu,
- cytologii moczu,
- cystoskopii,
- ocenie czynności nerek,
- badaniach obrazowych takich jak badanie ultrasonograficzne, urografia oraz tomografia komputerowa [29, 30].



*Ryc. 2. Diagnostyka nowotworów pęcherza moczowego*

Cytologia moczu to badanie, które jest łatwe do przeprowadzenia oraz cechuje się wysoką czułością, jak również specyficzną wykrywania komórek nowotworowych w osadzie moczu. W przypadku diagnozowania zmian o niskim stopniu złośliwości cytologia moczu nie jest już tak czułym i specyficznym badaniem [17]. Bardzo często wśród pacjentów, u których podejrzewa się raka pęcherza moczowego występuje również krwimocz, lecz nie zawsze ma on charakter makroskopowy. W celu wykrycia krwimoczu mikroskopowego wykonuje się cytologię moczu. Należy jednak pamiętać, iż nie tylko rak pęcherza moczowego może powodować krwimocz, ale również kamica nerkowa oraz infekcje dróg moczowych. Z drugiej strony negatywny wynik badania nie świadczy o braku nowotworu pęcherza moczowego [30]. Cytologię moczu należy traktować jako badanie uzupełniające proces całościowej diagnostyki nowotworów

pęcherza moczowego, szczególnie w świetle ograniczonej czułości wykrywania zmian nowotworowych charakteryzujących się niskim potencjałem złośliwości [17].

Standardowa cystoskopia WLC z wykorzystaniem światła białego (ang. *White-Light Cystoscopy*) jest wykorzystywana od lat w diagnostyce nowotworów pęcherza moczowego [31]. Badanie to polega na wzrokowej ocenie nabłonka urotelialnego. Wszelkie zmiany komórek nabłonkowych wyścielejających wewnątrz pęcherza moczowego wykryte podczas wykonywania badania, takie jak zmiany brodawkowate lub lite, powinny zostać w miarę możliwości usunięte w trakcie cystoskopii, a następnie zostać poddane analizie histopatologicznej [31, 32]. Podczas badania WLC niektóre zmiany nowotworowe mogą zostać pominięte, szczególnie gdy są one niewielkie, przez co może dojść do szybkiej wznowy i progresji choroby [31]. W związku z tym, aby zapobiec takim sytuacjom, opracowano nowe techniki diagnostyczne jak cystoskopia NBI (ang. *Narrow Band Imaging*; obrazowanie w wąskim paśmie) czy badanie fotodynamiczne/cystoskopia z wykorzystaniem światła niebieskiego. Cystoskopia NBI dzięki wykorzystaniu technologii wzmacniania obrazu pozwala na łatwiejsze uwidocznienie nieprawidłowości w nabłonku urotelialnym wyścielejającym wewnątrz pęcherza moczowego. Używanie dłuższych fal światła sprawia, iż możliwe jest dogłębne zbadanie komórek urotelialnych oraz dostrzeżenie nawet niewielkich zmian nowotworowych. Cystoskopia NBI opiera się na filtrowaniu światła białego do niebieskiego (415 nm) oraz zielonego (450 nm). Wiązka świetlna jest absorbowana przez hemoglobinę, dzięki czemu bardziej uwidocznione są kapilary powierzchniowe znajdujące się w unaczynionej tkance guza [31]. Cystoskopia powinna być wykonywana u wszystkich pacjentów z krwiomoczem makroskopowym oraz u pacjentów powyżej 35 roku życia z krwiomoczem widocznym w obrazie mikroskopowym. Niezależnie od wieku cystoskopia powinna zostać wykonana u pacjentów, u których występuje krwiomocz oraz byli lub nadal są narażeni na działanie czynników zwiększających ryzyko zachorowania na nowotwory pęcherza moczowego [30].

W ostatnich latach dużym zainteresowaniem cieszą się badania nad markerami nowotworowymi znajdującymi się w moczu, dzięki którym można diagnozować raka pęcherza moczowego bez konieczności wykonywania cystoskopii. Dzięki takim badaniom możliwa byłaby redukcja liczby wykonywanych inwazyjnych badań cystoskopowych. *Kontey i wsp.* wskazali jakie cechy powinny posiadać idealne biomarkery raka pęcherza moczowego: (a) wysoka czułość i (b) specyficzność, (c) łatwość interpretacji wyników analizy oraz (d) ich pobranie nie powinno się wiązać z inwazyjnym zabiegiem, lecz

powinny występować w moczu. Biomarkerami mogą być białka, metabolity, DNA oraz RNA (ang. *ribonucleic acid*; kwas rybonukleinowy) [33]. Istnieje kilka testów wykorzystujących biomarkery występujące w moczu (**Tab. 1**) w diagnostyce nowotworu pęcherza moczowego, które zostały zatwierdzone przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*; Agencja Żywności i Leków). Badania obrazowe takie jak urografia dożylna, USG (ultrasonografia) nerek, tomografia komputerowa czy rezonans magnetyczny dróg moczowych powinny być wykonywane u wszystkich pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego. Badania te przeprowadza się głównie w celu oceny stanu górnych dróg moczowych, głównie nerek oraz moczowodów [17, 29, 34]. Badania te pozwalają również na określenie wielkości guza obecnego w pęcherzu moczowym. Dodatkowo u wszystkich osób, u których podejrzewa się raka pęcherza moczowego, powinno zostać wykonane oznaczenie poziomu azotu, mocznika oraz kreatyniny w surowicy w celu oceny wydolności nerek [30].

**Tab. 1.** Testy stosowane w diagnostyce raka pęcherza moczowego oparte o detekcję obecnych w moczu biomarkerów [33]

TEST	BIOMARKER	TYP TESTU	OGRANICZENIA
<b>Badanie NMP22</b> (ang. <i>Nuclear Matrix Protein 22</i> )	NMP-22	Test immunoenzymatyczny	Wyniki fałszywie pozytywne otrzymywane są podczas występowania u pacjenta krwimoczu, stanu zapalnego oraz infekcji
<b>Test BTA</b> (ang. <i>Blader Tumor Antigen</i> )	Pęcherzowy antygen nowotworowy	Test kolorymetryczny	Wyniki fałszywie pozytywne są otrzymywane, m.in., podczas zapalenia nerek.
<b>ImmunoCyt™/uCyt+™</b>	Antygen karcynoembrionalny oraz dwie mucyny	Test immunocytochemiczny	Wyniki fałszywie pozytywne są otrzymywane w czasie trwania infekcji oraz stanu zapalnego.
<b>UroVysion™</b>	Wykrywanie aneuploidii chromosomu 3, 7 oraz 17	Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> FISH (ang. <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> )	Niska czułość wykrywania nowotworu pęcherza moczowego o niskim stopniu złośliwości.

## **1.2 PODZIAŁ ORAZ CHARAKTERYSTYCZNE CECHY MOLEKULARNE RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO**

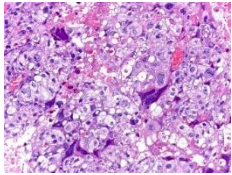
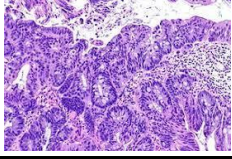
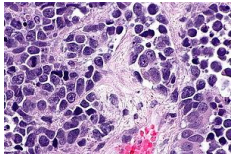
### **1.2.1 KLASYFIKACJA HISTOLOGICZNA**

Znakomita większość nowotworów pęcherza moczowego (około 90%) wywodzi się z nabłonka urotelialnego – charakterystycznego dla pęcherza moczowego, który określany jest również jako nabłonek przejściowy, wyściełający wewnętrzną powierzchnię pęcherza. Istnieje kilka wariantów raka urotelialnego (*Tab. 2*). Do pozostałych nowotworów złośliwych pęcherza moczowego należą: rak płaskonabłonkowy, gruczolakoraki, raki drobnokomórkowe, pierwotne chłoniaki pęcherza moczowego, raki neuroendokrynne oraz mięsaki (*Tab. 2*) [35, 36].

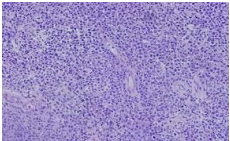
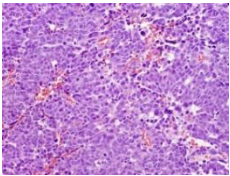
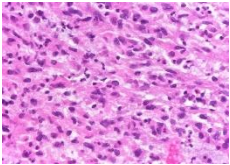
Tab. 2. Klasyfikacja histopatologiczna nowotworów pęcherza moczowego [35-45]

NOWOTWORY ZŁOŚLIWE PĘCHERZA MOCZOWEGO	WARIANTY RAKA UROTELIALNEGO	CECHY CHARAKTERYSTYCZNE	PROFIL IMMUNOHISTOCHEMICZNY	OBRAZ HISTOPATOLOGICZNY (barwienie hematoksylina & eozyna)
<b>RAK UROTELIALNY</b> (TCC, ang. <i>transitional cell carcinoma</i> ; rak przejściowokomórkowy)	<b>Z rozbieżnym zróżnicowaniem</b> (ang. <i>urothelial carcinoma with divergent differentiation</i> )	Charakteryzuje się tendencją do odróżnicowania komórek w stronę nabłonka płaskiego oraz gruczołowego.	(+) GATA3, S100P, p63, HMCK, trombomodulina	
	<b>Mikrobrodawczakowaty</b> (ang. <i>micropapillary variant of urothelial carcinoma</i> )	Budują go drobne brodawki	(+) MUC1, EMA, CK7, CK20, ERBB2 ( <i>HER2/neu</i> ), CA-125 (-) CD34, D2-40	
	<b>Z gniazdami</b> (ang. <i>nested variant of urothelial carcinoma</i> )	Niewielkie gniazda komórek nabłonka przejściowego obecne są w granicach blaszki właściwej.	(+) CK7, CK20, p63, Ki67, 34βE12, p53 (-) BCL2, PSA, p27	
	<b>Typu nabłoniaka limfatycznego</b> (ang. <i>lymphoepithelioma-like carcinoma</i> )	Występują gniazda niskozróżnicowanych komórek raka przejściowokomórkowego, które otoczone są gęstym naciekiem zapalnym.	(+) CKAE1/AE3, CK7, EMA, p53, GATA3 (-) CD45, EBV, CK20	
	<b>Mięsakowaty</b> (ang. <i>sarcomatoid carcinoma</i> )	W obrazie mikroskopowym widoczne są zarówno komórki nabłonkowe, jak i wrzecionowe.	(+) CKAE1/AE3, EMA, wimentyna, p63, CD10, GATA3 (-) PAX8, desmina, aktyna mięśni gładkich	

KLASYFIKACJA HISTOPATOLOGICZNA

	<p><b>Nie zróżnicowany z olbrzymimi komórkami trofoblastycznymi</b> (ang. <i>undifferentiated urothelial carcinoma with trophoblastic giant cells</i>)</p>	<p>W obrazie mikroskopowym obserwowany jest dwufazowy obraz guza, który posiada budowę charakterystyczną dla raka kosmówki bądź guza ze stwierdzoną obecnością komórek olbrzymich między komórkami nabłonka przejściowego.</p>	<p>(+) <math>\beta</math>HCG, p63, GATA3</p>	
	<p><b>Nie zróżnicowany, w tym olbrzymiokomórkowy</b> (ang. <i>undifferentiated carcinoma giant cell carcinoma</i>)</p>	<p>Nie spełnia kryteriów rozpoznania raka urotelialnego, płaskonabłonkowego, gruczolakoraka, mięsaka ani innego typu.</p>	<p>(+) CK7, CAM 5.2, EMA, p63, GATA3 (-) <math>\beta</math>HCG</p>	
<p><b>POZOSTAŁE TYPY NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH PĘCHERZA MOCZOWEGO</b></p>	<p><b>CECHY CHARAKTERYSTYCZNE</b></p>		<p><b>PROFIL IMMUNOHISTOCHEMICZNY</b></p>	<p><b>OBRAZ HISTOPATOLOGICZNY</b></p>
<p><b>RAK PŁASKONABŁONKOWY</b> (SCC, ang. <i>squamous cell carcinoma</i>)</p>	<p>Zbudowany z rogowaciejącego nabłonka płaskiego. Często związany z schistosomatozą oraz rozpoznawany gdy jest już znacznie zaawansowany.</p>		<p>(+) CK5/6, CK14, CK7, (...), CK20</p>	
<p><b>GRUCZOLAKORAK</b> (ADC, ang. <i>adenocarcinoma</i>)</p>	<p>Budują go komórki o zróżnicowaniu gruczolowym.</p>		<p>(+) CK7, CK20, 34bE12, CD141, CDX2, <math>\beta</math>-katenina</p>	
<p><b>RAK DROBNOKOMÓRKOWY</b> (ang. <i>small cell carcinoma</i>)</p>	<p>Bardzo rzadki, agresywny oraz rozpoznawany w zaawansowanym stadium. Badania histologiczne oraz immunohistochemiczne wskazują, iż jest nie do odróżnienia od drobnokomórkowego raka płuc.</p>		<p>(+) EMA, CAM 5.2, CD117, CD56, CK7, TTF1, CK5/6 (-) CK20, CEA</p>	



<p><b>PIERWOTNY CHŁONIAK PĘCHERZA MOCZOWEGO</b> (ang. <i>lymphoma</i>)</p>	<p>Występuje niezwykle rzadko. Jako zmiana pierwotna stanowi ok. 0,2%, natomiast jako zmiana wtórna ok. 1,8%. Ponad 1/3 przypadków jest diagnozowana u pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherza moczowego. Częściej występuje u kobiet.</p>	<p>(+) L-CA, kappa light chain (-) PSA, EMA</p>	
<p><b>RAK NEUROENDOKRYNNY</b> (ang. <i>neuroendocrine carcinoma</i>)</p>	<p>Wyróżnia się jego dwa podtypy: drobnokomórkowy oraz wielkokomórkowy. Bardzo często rozpoznawany gdy nacieka mięśniówkę właściwą lub pozapęcherzowo.</p>	<p>(-) CK7</p>	
<p><b>MIĘSAK</b> (ang. <i>sarcoma</i>)</p>	<p>Często występuje w postaci pojedynczego guza. W badaniu USG widoczny jest jako lita podśluzówkowa masa, która nie nacieka śluzówki.</p>	<p>(+) wimentyna, desmina, SMA, aktyna, S-100, NSE, CA125</p>	

(+) pozytywny pod względem danego markera; (-) negatywny pod względem danego markera

### 1.2.2 PODZIAŁ NOWOTWORÓW PĘCHERZA MOCZOWEGO ZE WZGLĘDU NA WYGLĄD KOMÓREK I GŁĘBOKOŚĆ ICH NACIEKANIA

W oparciu o badania histopatologiczne, tzn. wygląd komórek i głębokość ich naciekania, nowotwory pęcherza moczowego podzielono na dwie grupy: (a) NMIBC, nowotwory, które nie naciekają na mięśniówkę (ang. *Non-Muscle Invasive Bladder Cancer*) oraz (b) MIBC, takie które naciekają mięśniówkę (ang. *Muscle Invasive Bladder Cancer*) [46]. Obie grupy nowotworów posiadają różne cechy biologiczne oraz kliniczne [47]. MIBC są nowotworami bardziej agresywnymi oraz przerzutującymi do węzłów chłonnych, kości, płuc i wątroby. Rozpoznanie raka naciekającego mięśniówkę oznacza złe rokowania dla pacjenta. Rak pęcherza moczowego, który nie nacieka mięśniówki, jako mniej agresywny oznacza lepsze rokowanie dla pacjenta, aniżeli MIBC, jednakże NMIBC częściej nawraca [48]. Aby móc lepiej określić rokowania pacjenta oraz dobrać odpowiednie leczenie, w ostatnim czasie wyróżniono trzecią grupę nowotworów pęcherza moczowego, a mianowicie guzy nieinwazyjne, które z dużym prawdopodobieństwem mogą ulec progresji do raka naciekającego (NMIBC w kierunku MIBC) [49].

Analizy histologiczne oraz cytogenetyczne guzów pęcherza moczowego wykazały, iż są one bardzo zróżnicowane. Guzy NMIBC o niskim stopniu złośliwości cechują się niewielką liczbą zmian cytogenetycznych, podczas gdy nowotwory MIBC są pod tym względem bardziej niestabilne. Biorąc pod uwagę zróżnicowanie histologiczne, cytogenetyczne oraz kliniczne nowotworów NMIBC oraz MIBC zaproponowano dwie różne ścieżki powstawania tych nowotworów: brodawkowatą (ang. *papillary*) oraz nie brodawkowatą (ang. *non-papillary*). W ścieżce brodawkowatej obserwuje się powstawanie hiperplazji, która zapoczątkowuje powstawanie guzów NMIBC. Dysplazja, która widoczna jest w ścieżce nie brodawkowatej, odpowiada za powstawanie guzów MIBC. Jednakże guzy NMIBC o podwyższonym stopniu złośliwości rozwijają się na skutek obecności zarówno hiperplazji, jak i dysplazji, co świadczy o przecinaniu się tych dwóch szlaków [49].

Ścieżka brodawkowata charakteryzuje się aktywacją lub nadekspresją onkogenów. W większości nowotworów powstających na drodze tego szlaku obserwuje się mutacje w genie *FGFR3* (ang. *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*; czynnik wzrostu fibroblastów 3), w związku z czym uważa się je za zmiany prowadzące do hiperplazji oraz powstawania nowotworów na drodze szlaku brodawkowatego [49]. W szlaku nie brodawkowatym prowadzącym do rozwoju guza MIBC, obserwuje się liczne mutacje w genach supresorowych takich jak *TP53* (ang. *Tumor Protein p53*; gen kodujący białko

p53), *RB1* (ang. *Retinoblastoma 1*; gen kodujący białko RB1) oraz *PTEN* (ang. *Phosphate and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten*), jak również nieprawidłowości chromosomalne wynikające z uszkodzeń procesów naprawczych DNA. Guzy o dużej niestabilności genomowej z wieloma mutacjami w genach supresorowych zazwyczaj wiążą się z zaawansowanym stadium nowotworu oraz ze słabymi rokowaniami [49].

Ścieżka brodawczakowata i nie brodawczakowata tłumaczą powstawanie oraz wczesny rozwój nowotworów NMIBC, a także MIBC. Jednakże biorąc pod uwagę heterogenność guzów, nie można na podstawie tych dwóch szlaków wytłumaczyć biologii oraz dalszego rozwoju nowotworów. Dzięki badaniom transkryptomycznym guzów pęcherza moczowego przeprowadzonym na dużą skalę udało się zidentyfikować podtypy molekularne raka pęcherza moczowego, co w dużej mierze ułatwiło poznanie biologii tej choroby. Nowotwory klasyfikowane jako NMIBC są bardzo szeroką grupą, do której często zaliczane są nowotwory o odmiennej charakterystyce genetycznej oraz klinicznej, dlatego guzy NMIBC podzielono na 3 podtypy (klasy) molekularne (**Tab. 3**) [49]. Klasa I charakteryzuje się wysoką ekspresją białek adhezyjnych oraz białek związanych z wczesnymi etapami cyklu komórkowego (**Tab. 3**). Dla klasy II charakterystyczna jest utrata *TP53* oraz *RB1* (**Tab. 3**). Natomiast cechą charakterystyczną dla klasy III jest nadekspresja markerów związanych z CSC (ang. *Cancer Stem Cells*; nowotworowe komórki macierzyste) [50]. Dzięki przeprowadzonym analizom proteomicznym tkanek guzów pochodzących od 117 pacjentów udało się zidentyfikować trzy NPS (ang. *NMIBC Proteomic Subtypes*; podtypy proteomiczne) guzów NMIBC. NPS1 to grupa charakteryzująca się nadekspresją cząsteczek związanych ze stanem zapalnym, guzy podtypu NPS2 posiadają fenotyp mezenchymalny, podczas gdy NPS3 wykazują podwyższoną obecność markerów różnicujących: *KRT20* (ang. *Keratin 20*; keratyna 20), *CDH1* (ang. *Cadherin 1*; gen kodujący E-kadherynę) oraz uroplakiny [51].

**Tab.3. Podtypy (klasy) molekularne guzów NMIBC [49]**

PODTYP MOLEKULARNY NMIBC	ZRÓŻNICOWANIE	MECHANIZM ONKOGENNY	CECHY MOLEKULARNE	STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA ORAZ ZRÓŻNICOWANIA	RYZYKO NAWROTU / PROGRESJI
<b>Klasa I</b>	Luminalne	Mutacje FGFR3	Nadekspresja ERBB3 Wysoka aktywność szlaku RAS/RAF/MAPK	Niski stopień zaawansowania oraz zróżnicowania	Wysokie ryzyko nawrotu
<b>Klasa II</b>	Luminalne	Amplifikacja HER2	Utrata TP53/RB1 Mutacje ERCC2	Wysoki stopień zaawansowania oraz zróżnicowania	Wysokie ryzyko progresji
<b>Klasa III</b>	Podstawne	Mutacje FGFR3	Możliwość przejścia guza do klasy II	Wysoki stopień zaawansowania oraz zróżnicowania	Wysokie ryzyko progresji

Na podstawie specyficznych cech biologicznych oraz odpowiedzi na stosowane leczenie guzy MIBC podzielono na sześć podtypów molekularnych: LumP (brodawkowaty luminalny), LumNs (luminalny nieokreślony), LumU (luminalny niestabilny), Ba/Sq (podstawny/płaskonabłonkowy), Stroma-rich (bogaty w zrąb) oraz NE-like (neuroendokrynnopodobny) (**Tab. 4**) [49].

**Tab. 4. Podtypy molekularne guzów MIBC [49]**

PODTYP MOLEKULARNY MIBC	ZRÓŻNICOWANIE	MECHANIZM ONKOGENNY	CECHY MOLEKULARNE	STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA ORAZ ZRÓŻNICOWANIA
<b>LumP</b> <i>(ang. luminal papillary)</i>	Luminalne	Mutacje FGFR3 oraz delecja CDKN2A	Wysoka aktywność szlaku RAS/RAF/MAPK Mutacje KDM6A oraz STAG2	T2
<b>LumNS</b> <i>(ang. luminal non-specified)</i>	Luminalne	Mutacje PPARG	Mutacje ELF3	T2
<b>LumU</b> <i>(ang. luminal unstable)</i>	Luminalne	Amplifikacja HER2	Utrata TP53 Mutacje ERCC2 oraz PPARG	T2
<b>Ba/Sq</b> <i>(ang. basal/squamous)</i>	Podstawne oraz płaskonabłonkowe	Mutacje EGFR	Utrata TP53 i/oraz RB1	T3/T4
<b>Stroma-rich</b>	Podstawne oraz luminalne	-	Infiltracja zrębu poprzez komórki układu immunologicznego	-
<b>NE-like</b> <i>(ang. neuroendocrine-like)</i>	Neuroendokrynne	Utrata TP53 i/oraz RB1	Transdyferencjacja urotelialna	-

T – stopień zaawansowania guza według skali TNM.

### 1.2.3 OCENA STOPNIA ZRÓŻNICOWANIA ORAZ ZAAWANSOWANIA RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO

Ocena zróżnicowania guzów pęcherza moczowego jest niezwykle cenna podczas procesu dobierania odpowiedniej terapii oraz oceny ryzyka progresji nowotworu. Obecnie istnieją dwie klasyfikacje oceny stopnia zróżnicowania raka pęcherza moczowego: klasyfikacja WHO z 1973 r. oraz ISUP (ang. *International Society of Urological Pathology*; Międzynarodowe Towarzystwo Uropatologiczne) z 2004 r. (**Tab. 5**). Zarówno w klasyfikacji WHO, jak i ISUP występują trzy stopnie zróżnicowania, jednakże stopnie te nie są równocenne w obu klasyfikacjach (**Tab. 5**) [52].

Klasyfikacja ISUP obejmuje następujące stopnie:

- UNLMP – nowotwór urotelialny o niskim potencjale zezłośliwienia,
- low grade carcinoma – rak o niskiej złośliwości,
- high grade carcinoma – rak o wysokiej złośliwości.

Klasyfikacja WHO składa się ze stopni:

- G1 – rak wysoce zróżnicowany,
- G2 – rak umiarkowanie zróżnicowany,
- G3 – rak nisko zróżnicowany.

Ponadto na podstawie przeprowadzonych w ostatnim czasie badań zauważono nie tylko różnice w ocenie tych samych preparatów histologicznych przez różnych patologów, ale również w ocenie przeprowadzanej przez tego samego patologa, ale w różnym czasie [45], co wpływa na stawianą diagnozę.

**Tab. 5.** Klasyfikacja ISUP oraz WHO oceny stopnia zróżnicowania raka pęcherza moczowego [52]

KLASYFIKACJA ISUP	UNLMP	LOW GRADE CARCINOMA	HIGH GRADE CARCINOMA
KLASYFIKACJA WHO	G1	G2	G3

Klasyfikacją oceniającą stopień zaawansowania raka pęcherza moczowego jest klasyfikacja TNM (ang. *Tumor Node Metastasis*; guz, węzły chłonne, przerzuty) (**Tab. 6**). W klasyfikacji tej ocenie poddaje się guz (ang. *tumor*), tzn. głębokość oraz rozległość jego

naciekania, węzły chłonne (ang. *node*), jako dodatnie lub ujemne oraz obecność i miejsce występowania przerzutów (ang. *metastasis*) [52].

**Tab. 6. Klasyfikacja TNM [52]**

<b>T – guz pierwotny</b>	
<b>Tx</b>	Ocena guza pierwotnego nie jest możliwa
<b>T0</b>	Brak guza pierwotnego
<b>Ta</b>	Nieinwazyjny rak brodawczakowaty
<b>Tis</b>	Rak in situ, „płaski guz”
<b>T1</b>	Guz nacieka tkankę łączną podnabłonkową
<b>T2</b>	Guz nacieka błonę mięśniową <b>T2a</b> guz powierzchniowo nacieka mięśniówkę (poniżej 50%) <b>T2b</b> guz głęboko nacieka mięśniówkę (ponad 50 %)
<b>T3</b>	Guz nacieka tkanki okołopęcherzowe <b>T3a</b> Mikroskopowo <b>T3b</b> Makroskopowo
<b>T4</b>	Guz nacieka: stercz/macicę/pochwę/ścianę miednicy/ścianę jamy brzusznej <b>T4a</b> Guz nacieka stercz, macicę lub pochwę <b>T4b</b> Guz nacieka ścianę miednicy lub ścianę jamy brzusznej
<b>N – regionalne węzły chłonne</b>	
<b>NX</b>	Ocena regionalnych węzłów chłonnych nie jest możliwa
<b>N0</b>	Brak przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
<b>N1</b>	Obecność przerzutów w pojedynczym węzle chłonnym miednicy
<b>N2</b>	Obecność przerzutów w więcej niż jednym węzle chłonnym miednicy
<b>M – Przerzuty odległe</b>	
<b>MX</b>	Ocena przerzutów odległych nie jest możliwa
<b>M0</b>	Brak przerzutów odległych
<b>M1</b>	Obecność przerzutów odległych

#### 1.2.4 KLASYFIKACJA MOLEKULARNA RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO

Pierwsze badania mające na celu ustalenie podtypów molekularnych raka pęcherza moczowego zostały wykonane przez grupę Prof. Sjobahl z Uniwersytetu w Lund w 2012 r. [55]. Badania te polegały na dokonaniu analizy ekspresji 13 953 genów w pobranych od pacjentów 308 próbkach guzów NMIBC oraz MIBC. Na podstawie otrzymanych wyników wyodrębniono następujące podtypy molekularne raka pęcherza moczowego (klasyfikacja Lund):

- rak płaskonabłonkowy (SCCL, ang. *squamous cell carcinoma-like*),
- urobasal B (uroB),
- naciekający,
- niestabilny genomowo (GU, ang. *genomically unstable*; niestabilny genomowo),
- urobasal A (uroA).

Nowotwory SCCL oraz uroB cechują się ekspresją markerów molekularnych, które są charakterystyczne dla płaskonabłonkowego raka piersi, tzn. KRT5/6 (ang. *keratin 5/6*; keratyna 5/6) oraz KRT14 (ang. *keratin 14*; keratyna 14), natomiast nowotwory uroA oraz GU wykazują ekspresję markerów charakterystycznych dla nowotworów luminalnych: uroplakin, KRT20, ERBB2 (ang. *Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2*; receptor Erb-b2 kinazy tyrozynowej 2), FOXA1 (ang. *Forkhead Box Protein A1*, czynnik transkrypcyjny FOXA1), GATA3 (ang. *GATA Binding Protein 3*; białko wiążące GATA3), TRIM24 (ang. *Tripartite Motif Containing 24*; białko TRIM24) oraz PPAR $\gamma$  (ang. *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*) [42, 44]. Udowodniono również, iż każdy typ molekularny wiąże się z inną prognozą dla pacjentów. Dla pacjentów z podtypami molekularnymi uroA oraz naciekającymi stwierdza się lepsze rokowania aniżeli dla pacjentów z nowotworami podtypów SSCL czy uroB [50].

TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*; atlas genomu raka) to projekt, który jest kompleksowym źródłem wiedzy na temat genomu nowotworu. Celem programu jest wskazanie zmian w DNA, RNA oraz białkach w próbkach pochodzących z tkanek guzów nowotworów różnych narządów. Pierwsze badania dotyczyły zmian molekularnych nowotworów piersi, natomiast pierwsze dane dotyczące nowotworów pęcherza moczowego zostały opracowane przez Lerner. Początkowo analizę, która objęła 131 różnych guzów pęcherza moczowego od guzów chemowrażliwych po inwazyjne, przeprowadzono pod kątem występowania mutacji somatycznych, zróżnicowania ekspresji mRNA, mikroRNA oraz białek, a także metylacji DNA. Zidentyfikowano 32 istotne mutacje genów zaangażowanych w cykl komórkowy, przebudowywanie chromatyny, mechanizmy naprawcze DNA oraz białek uczestniczących w szlakach sygnałowych RTK (ang. *Receptor Tyrosine Kinase*; receptor kinazy tyrozynowej) /RAS (ang. “*rat sarcoma virus*”; GTP-aza RAS) /PI3K (ang. *Phosphatidylinositol 3- Kinase*). Ponadto w 1/3 guzów wystąpiła hipermetylacja DNA. Na podstawie otrzymanych wyników dotyczących grupowania mRNA oraz miRNA wyróżniono cztery charakterystyczne grupy (klastry). Guzy należące do grupy I cechują się mutacjami FGFR3 oraz brodawkowatą morfologią. Dla klastrów I oraz II charakterystyczna jest wysoka ekspresja HER2 (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*; ludzki naskórkowy czynnik wzrostu) oraz receptora estrogenowego  $\beta$ . Nowotwory należące do grupy III posiadają bardzo wysoką ekspresję KRT14 oraz CD44 – białek zaangażowanych w adhezję oraz migrację komórek. Natomiast grupa IV posiada bardzo zbliżone cechy molekularne do grupy III, jednak posiada również cechy molekularne otaczającego zrębu oraz mięśniówki [54].



### 1.2.5 MARKERY MOLEKULARNE RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO

Choć głównym celem identyfikacji markerów molekularnych jest tworzenie nieinwazyjnych testów diagnostycznych, to poznanie charakterystycznych mutacji genów oraz nadekspresji białek w komórkach nowotworowych pęcherza moczowego jest niezwykle cenne zarówno w dobraniu odpowiedniej terapii, jak i w trakcie samego leczenia. Analiza markerów molekularnych raka pęcherza moczowego w połączeniu z analizą jego cech klinicznych jest bardzo obiecującą strategią oceny ryzyka rozwoju raka pęcherza moczowego [56]. Potencjalne biomarkery tkankowe nowotworów pęcherza moczowego mogą być używane do określania ewentualnej progresji guzów, ryzyka nawrotu choroby, przewidywania odpowiedzi na zastosowaną terapię oraz zaprojektowania indywidualnej terapii. Do tej pory najintensywniej zostały przebadane biomarkery związane z regulowaniem cyklu komórkowego, apoptozą, angiogenezą, jak również białka sygnałowe oraz hormony (*Tab. 7*) [56].

*Tab. 7. Markery molekularne raka pęcherza moczowego*

<p><b>TP53</b></p>	<p><i>TP53</i> koduje białko p53. W wielu nowotworach, w tym również nowotworze pęcherza moczowego, obserwuje się mutacje tego genu, co wiąże się z rozwojem nowotworu o agresywnych cechach. Akumulacja białka p53 w nowotworach przejściowokomórkowych pęcherza moczowego jest związana z niekorzystnym rokowaniem. Sugeruje się, iż zbadanie poziomu p53 u pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego może być stosowane w klinice jako marker prognostyczny [56, 57, 58].</p>
<p><b>CDKN1B</b> (ang. <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B</i>)</p>	<p>Gen <i>CDKN1B</i> koduje białko p27<sup>Kip1</sup> należące do rodziny inhibitorów cyklinozależnych kinaz Cip/Kip. Nieliczne przeprowadzone badania wykazały wartość predykcyjną p27 u pacjentów z nienaciekającym rakiem pęcherza moczowego. Jednakże u pacjentów z naciekającym rakiem pęcherza moczowego p27 jest drugim co do ważności czynnikiem określającym ryzyko nawrotu choroby, tuż po białku p53 [59].</p>
<p><b>p21<sup>WAF1/CIP1</sup></b></p>	<p>Gen <i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup></i> koduje białko p21, które jest inhibitorem cyklinozależnej kinazy, obniża poziom ekspresji białka p53 oraz zaangażowane jest w regulację cyklu komórkowego w fazie G1. Brak ekspresji p21 wpływa na zmiany w ekspresji p53, co jest związane z progresją nowotworu. Badania przeprowadzone w próbkach guzów pobranych od pacjentów wskazują, iż w guzach, w których występowała wysoka ekspresja p21 ryzyko nawrotu oraz progresji choroby u tych pacjentów było wysokie [60].</p>
<p><b>CKN2A</b> (ang. <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>)</p>	<p>Gen <i>CDKN2A</i> zlokalizowany jest na chromosomie 9 i koduje on dwa białka: p14<sup>ARF</sup> oraz p16<sup>INK4A</sup>, które regulują cykl komórkowy poprzez ścieżki ARF-MDM-p53 oraz Rb-E2F-1. p16<sup>INK4A</sup> to inhibitor kinaz cyklinozależnych (cdk), utrata funkcji tego białka wiąże się z niekontrolowanymi podziałami komórkowymi. Mutacje genu <i>CDKN2A</i> są bardzo częste w nowotworach pęcherza moczowego [57, 60].</p>
<p><b>Rb</b></p>	<p>Gen <i>Rb</i> zlokalizowany jest na chromosomie 13. Koduje fosfoproteinę pRb, której fosforylacja odgrywa kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego, ponieważ oddziałuje z innymi białkami regulatorowymi odpowiedzialnymi za przejście komórek z fazy G1 do fazy S w trakcie cyklu komórkowego [60]. Analiza ekspresji pRb, p53 oraz p27 razem jako zestawu biomarkerów może służyć w ocenie ryzyka nawrotu, a także progresji nowotworu pęcherza moczowego [56, 61].</p>
<p><b>TSC1</b> (ang. <i>TSC Complex Subunit 1</i>)</p>	<p>Gen <i>TSC1</i> koduje hemartynę, białko negatywnie regulujące przejścia faz w cyklu komórkowym. Dezaktywujące mutacje <i>TSC1</i> występują w około 12% nowotworów pęcherza moczowego [61].</p>
<p><b>ErbB2</b></p>	<p><i>ErbB2</i> jest protoonkogenem zlokalizowanym na chromosomie 17, kodującym należący do rodziny receptorów nabłonkowego czynnika wzrostu receptor kinazy tyrozynowej. Nadekspresja ErbB2 obserwowana jest w 10-50% nowotworów TCC oraz jest częstsza w przerzutach, aniżeli w guzie pierwotnym co pokazuje, iż białko to odgrywa istotną rolę w procesie przerzutowania raka pęcherza moczowego. Badania Asamoto i wsp. wykazały, że w 32% zbadanych próbek tkanek guzów pęcherza moczowego</p>

	występowała nadekspresja ErbB2. Ponadto Nadoushan i <i>wsp.</i> dowiedli, iż ekspresja ErbB2 ma związek ze stopniem zróżnicowania oraz zaawansowania raka pęcherza moczowego, dlatego też może on być czynnikiem prognostycznym [58, 61-64].
<b>RAS</b>	Onkogeny <i>HRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> są GTPazami, które aktywują kaskady RAF/MEK/ERK oraz PI3K/AKT/PTEN. W 10-20% badanych próbek nowotworowych pęcherza moczowego zidentyfikowano mutacje punktowe w genach kodujących <i>HRAS</i> oraz <i>NRAS</i> . Wydaje się, iż mutacje onkogenów RAS nie są związane ze zróżnicowaniem czy też stopniem zaawansowania raka pęcherza moczowego. Jednakże amplifikacja genu kodującego kinazę <i>Raf1</i> , która zaangażowana jest w przekazywanie sygnałów Ras, wiąże się ze zróżnicowaniem oraz stopniem zaawansowania raka pęcherza moczowego [61]. Wyniki badań <i>in vitro</i> dowiodły, iż <i>HRAS</i> może wpływać na podwyższenie ekspresji EGFR (ang. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> ; receptor nabłonkowego czynnika wzrostu) w komórkach nowotworów przejściowokomórkowych, co sprzyja inwazyjnemu fenotypowi nowotworu [58].
<b>FGFR</b> (ang. <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> )	FGFRs czyli receptory czynników wzrostu fibroblastów, należące do rodziny receptorów kinaz tyrozynowych, regulują głównie proliferację, różnicowanie, angiogenezę oraz biorą udział w rozwoju embrionalnym. Mutacje w genie <i>FGFR3</i> są bardzo często identyfikowane w guzach pęcherza moczowego. Szacuje się, iż około 80% guzów pęcherza moczowego diagnozowanych w stopniu zaawansowania posiada aktywujące mutacje punktowe w genie receptora FGFR3, co wiąże się z korzystnymi prognozami dla pacjentów. Mutacje FGFR wskazują na niskie ryzyko nawrotu choroby (guzy TCC) oraz są one markerami guzów o dobrym rokowaniu [58, 59, 61, 62].
<b>EGF</b> (ang. <i>Epidermal Growth Factor</i> )	EGF występuje w stosunkowo wysokim stężeniu w moczu, a jego receptor – EGFR (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> ; receptor nabłonkowego czynnika wzrostu) występuje w warstwie podstawnej nabłonka urotelialnego. Jest to białko transbłonowe, przekazujące sygnały dotyczące wzrostu komórek, ich ruchliwości oraz różnicowania. Ekspresję EGFR stwierdzono również na powierzchni zmian złośliwych pęcherza moczowego. Na tej podstawie przypuszcza się, iż EGFR może odgrywać ważną rolę w rozwoju i wzroście guzów przejściowokomórkowych. Nadekspresja EGFR w komórkach raka pęcherza moczowego jest powiązana z wysokim stopniem zaawansowania choroby oraz jej progresją [63, 65].
<b>Surwiwina</b>	Surwiwina jest białkiem związanym z apoptozą, które wykorzystywane jest jako użyteczny diagnostycznie biomarker. Działanie surwiwiny opiera się na hamowaniu aktywności kaspaz. Ponadto wpływa na ekspresję genów związanych z inwazyjnością komórek nowotworowych. Na podstawie ekspresji tego białka można ocenić ryzyko nawrotu czy też progresji nowotworu pęcherza moczowego, jak również jego stopień zróżnicowania oraz zaawansowania [56, 59].

**HIF-1/HIF-2,**  
(ang. *Hypoxia  
Inducible Factor  
1/2*)  
**VEGF**  
(ang. *Vascular  
Endothelial  
Growth Factor*)

HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor 1*; czynnik indukowany hipoksją 1) jest aktywowany w środowisku, w którym panuje obniżone stężenie tlenu. Jones i wsp. wykazali wzrost stężenia HIF-1 oraz VEGF w ludzkich liniach komórkowych raka pęcherza moczowego. Ekspresja VEGF w tkankach guzów nienaciekających jest 4-krotnie większa, a w tkance guzów naciekających obserwuje się 10-krotnie większą ekspresję VEGF w porównaniu do prawidłowych komórek nabłonka urotelialnego. Wysoka ekspresja VEGF w guzach nienaciekających wiąże się również z dużym ryzykiem wczesnego nawrotu choroby oraz szybkiej progresji. Ekspresja VEGF-C występuje w cytoplazmie komórek raka pęcherza moczowego, podczas gdy w prawidłowych komórkach nabłonka urotelialnego ekspresja VEGF-C jest niska. W związku z tym ekspresja VEGF-C jest bezpośrednio związana z wielkością guza, zróżnicowaniem, stopniem zaawansowania oraz procesem przerzutowania. Pacjenci, u których występuje wysoka ekspresja VEGF-C mają gorsze rokowania, w porównaniu do pacjentów z niską ekspresją VEGF-C [59, 60].

### 1.3 OBECNIE STOSOWANE SPOSOBY LECZENIA NOWOTWORÓW PĘCHERZA MOCZOWEGO

Na początku XXI wieku badania naukowe nad rakiem pęcherza moczowego oraz rozwój nowych terapii były najbardziej niedofinansowanymi przez NIH (ang. *National Institutes of Health*; Amerykański Narodowy Instytut Zdrowia) spośród najczęściej występujących nowotworów. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy była zapewne niska świadomość społeczna dotycząca ogromnego problemu jakim jest ta choroba. Spowodowało to długotrwały brak finansowania badań naukowych w tym obszarze, czego konsekwencją było bardzo słabe poznanie jego biologii (w porównaniu do innych nowotworów) oraz brak postępów w projektowaniu nowych terapii. Pomimo rozwoju innych terapii przeciwnowotworowych, leczenie systemowe chorych na raki pęcherza moczowego nie uległo zmianom przez ponad 30 lat. W ciągu ostatnich 10 lat dzięki znacznie lepszemu zrozumieniu biologii nowotworów pęcherza moczowego, a ponadto dzięki zwiększonemu zainteresowaniu dotyczącego opracowywaniu nowych leków, powstały nowe terapie oraz schematy jego leczenia [66]. Zastosowanie odpowiedniego leczenia wymaga określenia czy nowotwór nacieka na mięśniówkę, czy też nie oraz czy jest to nowotwór złośliwy zaawansowany z przerzutami.

#### 1.3.1 SPOSOBY LECZENIA CHORYCH NA NMIBC

Podstawową metodą leczenia nienaciekającego raka pęcherza moczowego jest zabieg TURBT (ang. *transurethral resection of bladder tumour*; przezcewkowa resekcja guza) wykonywany w znieczuleniu miejscowym lub ogólnym (**Ryc. 3**). Celem zabiegu jest usunięcie wszystkich widocznych zmian znajdujących się w pęcherzu moczowym wraz z marginesem zdrowej tkanki. W przypadku gdy guz jest duży, TURBT wykonuje się głównie aby pobrać wycinki guza do badań histopatologicznych (określenie stopnia zaawansowania oraz dobrania odpowiedniego leczenia). Dla dużych guzów TURBT wykonuje się także aby zmniejszyć ich wielkość [67, 68]. Zmiany nowotworowe znajdujące się w pęcherzu moczowym można również usunąć podczas zabiegu z użyciem lasera. Zaletą tej formy usuwania guzów nowotworowych jest zminimalizowanie ryzyka krwawienia oraz ogólnych podrażnień pęcherza moczowego. Wadą tej metody jest brak jednoczesnego pobrania tkanki guza do analizy histopatologicznej ze względu na „destrukcyjny” pod tym względem charakter metody [69].

Według obecnych wytycznych po resekcji guza zaleca się podanie jednej z terapii dopęcherzowych: chemioterapii okołoperacyjnej lub immunoterapii BCG (*Bacille Calmette-Guérin*). Głównym celem ich podawania jest ochrona przed nawrotem oraz

progresją raka NMIBC do MIBC [70]. Badania wskazują, iż podanie chemioterapii okołoperacyjnej znacząco obniża ryzyko nawrotu choroby [67]. Istnieją także badania pokazujące, iż pacjenci, u których terapia dopęcherzowa została podana, w krótkim czasie po wykonaniu TURBT wykazują mniejsze ryzyko progresji i nawrotu choroby aniżeli pacjenci, u których terapia została podana później [69]. Leki stosowane w trakcie chemioterapii okołoperacyjnej to mitomycyna C, gemcytabina, doksorubicyna, epirubicyna, walrubicyna, tiotepa oraz etogluclid [67, 69, 71]. Najczęściej z nich stosowana jest mitomycyna C, jednak powoduje ona podrażnienia, a niekiedy martwicę pęcherza moczowego [67]. Mitomycyna C ma właściwości alkilujące, jej mechanizm działania opiera się na wiązaniu z DNA, czego skutkiem jest hamowanie jego syntezy oraz pęknięcie nici [69]. Gemcytabina jest analogiem 2-deoksycytydyny o szerokim spektrum działania przeciwnowotworowego. Posiada podobną skuteczność do mitomycyny C lecz cechuje się lepszą tolerancją przez pacjentów oraz niższymi kosztami [67, 72]. Kolejny lek to doksorubicyna (adriamycyna) - antybiotyk z grupy antracyklin. Najbardziej toksyczne działanie doksorubicyny obserwowane jest w fazie S oraz M podziału komórkowego. Dochodzi wówczas do wbudowywania jej między podwójną sieć DNA, ponadto wpływa na hamowanie topoisomerazy II. Dodatkowo doksorubicyna hamuje syntezę DNA oraz RNA poprzez alkilację, chelatowanie jonów cynku, żelaza oraz miedzi, a także wiąże się z błoną komórkową co zmienia jej przepuszczalność dla jonów [69]. Poza doksorubicyną w trakcie chemioterapii okołoperacyjnej stosowana jest także epirubicyna, która jest pochodną doksorubicyny. Mechanizm działania epirubicyny jest podobny do działania doksorubicyny [69]. Tiotepa była pierwszym związkiem używanym w chemioterapii dopęcherzowej. W przeszłości była używana dosyć często, jednak ze względu na występowanie mielosupresji została zastąpiona głównie przez mitomycynę C. Mechanizm działania związany jest z uwolnieniem rodników, m.in. etylenowych, czego wynikiem jest rozerwanie wiązań DNA na skutek alkilacji guaniny w pozycji N-7 [69, 73].

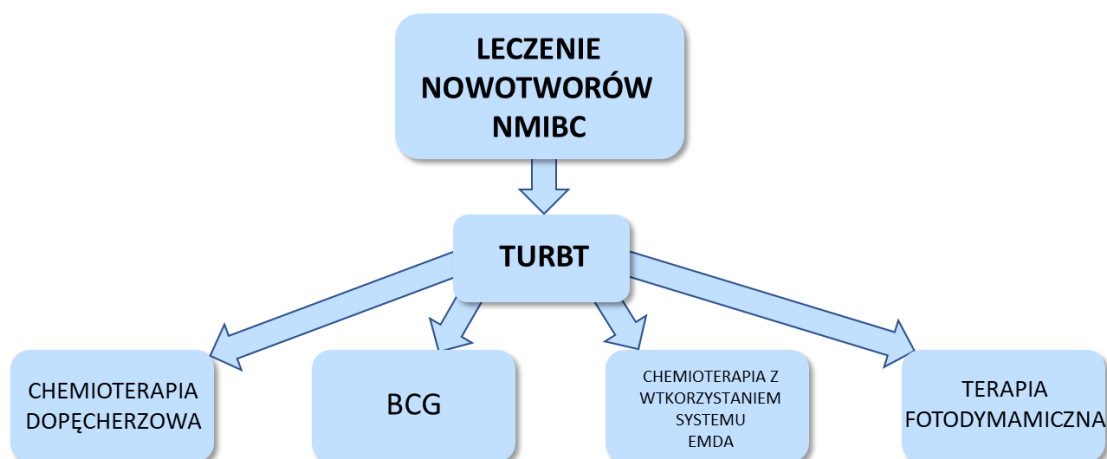
W przypadku nowotworów NMIBC stosuje się również chemioterapię wielolekową. Najczęściej używanymi kombinacjami leków są doksorubicyna/mitomycyna C, epirubicyna/INF- $\alpha$ , mitomycyna C/doksorubicyna/cisplatyna, gemcytabina/mitomycyna C, gemcytabina/docetaksel, kabazytaksel/gemcytabina/cisplatyna [74].

BCG to szczepionka przeciwko gruźlicy [75], w której skład wchodzi atenuowana forma *Mycobacterium bovis*. Szczepionkę BCG w terapii przeciwnowotworowej zaczęto stosować już w 1969 r., kiedy Mathe i wsp. zauważyli pozytywne działanie BCG wobec ostrej białaczki limfoblastycznej [67, 75]. BCG to immunoterapia, która jest podawana

przede wszystkim pacjentom z nowotworem NMIBC średniego oraz wysokiego ryzyka [67]. Zastosowanie BCG zmniejsza ryzyko nawrotu oraz progresji raka pęcherza moczowego odpowiednio o 70% oraz 27% [61]. Mechanizm działania BCG jest złożony. Prawdopodobnie BCG adheruje do komórek nabłonka pęcherza moczowego, dochodzi do internalizacji, następnie prezentacji antygeny prątka gruźlicy, czego konsekwencją jest komórkowa odpowiedź odpornościowa [67]. Jednakże ostatnie badania nad BCG wykazały również inne mechanizmy działania wobec raka pęcherza moczowego. Oprócz aktywacji układu odpornościowego, BCG działa bezpośrednio na komórki nowotworowe doprowadzając do ich apoptozy, nekrozy oraz wywołując stres oksydacyjny. BCG może aktywować również kaspazę 8, która jest białkiem inicjatorowym ścieżki zewnętrznej fazy kontrolno-decyzyjnej apoptozy. Ponadto BCG może aktywować proapoptotyczne białko BID (ang. *BH3 Interacting Domain Death Agonist*; gen agonisty śmierci domeny oddziałującej z BH3) oraz prokaspazę 9 poprzez aktywację oraz nadekspresję katepsyny B, co ostatecznie prowadzi do apoptozy. Wadą BCG jest relatywnie wysoka nietolerancja BCG przez pacjentów oraz pojawiająca się oporność komórek nowotworowych pęcherza moczowego na jej działanie. Dodatkowo u niektórych pacjentów BCG wywołuje ciężkie działania niepożądane jak zapalenie pęcherza, płamicę rzekomoanafilatyczną, ziarniniakowe zapalenie gruczołu krokowego, zapalenie płuc oraz posocznicę [75].

W leczeniu nowotworów NMIBC stosuje się także chemioterapię dopęcherzową z użyciem mitomycyny C z wykorzystaniem systemu elektromotorycznej dystrybucji leku (EMDA; ang. *electro-motive drug administration*). System ten stosuje się u pacjentów z grupy średniego oraz wysokiego ryzyka nawrotu choroby. Polega na aktywnym transporcie leku z wykorzystaniem prądu stałego w jonoforezie oraz jego elektroosmozie poprzez błonę komórkową. Podawanie dopęcherzowo BCG lub mitomycyny C w podwyższonej temperaturze (43 °C) okazuje się być skuteczne u pacjentów, u których tradycyjna terapia BCG zawiodła. [76].

Inną terapią używaną do leczenia nienaciekających nowotworów pęcherza moczowego jest terapia fotodynamiczna, polegająca na fotouczulaniu komórek nowotworowych, a następnie ich naświetlaniu. Najczęściej używanymi fotouczulaczami są preparaty na bazie hematoporfiryn pochodzących z rozkładu hemoglobiny. Aby terapia fotodynamiczna była skuteczna i dochodziło do śmierci komórek nowotworowych niezbędna jest również obecność tlenu. Po podaniu pacjentowi fotouczulacza i naświetlaniu pęcherza moczowego, dochodzi do reakcji podanego związku z tlenem, w wyniku czego powstają cytotoskyczne wolne rodniki [69].



Ryc. 3. Schemat leczenia stosowany u pacjentów z nienaciekającym (NMIBC) rakiem pęcherza moczowego

### 1.3.2 SPOSOBY LECZENIA CHORYCH NA MIBC

Nowotwór MIBC według klasyfikacji TNM obejmuje stopnie T2-T4. Szacuje się, że nowotwory MIBC stanowią około 25% wszystkich nowych diagnozowanych przypadków. Radykalna cystektomia z wycięciem węzłów chłonnych miednicy jest obecnie podstawową metodą leczenia MIBC (Ryc. 4). Jednakże, pomimo wycięcia pęcherza moczowego wraz z węzłami chłonnymi znajdującymi się w miednicy, wciąż około 50% pacjentów umiera z powodu przerzutów. Aby ograniczyć ryzyko powstawania przerzutów odległych pacjentom podawana jest chemioterapia [77].

Radykalna cystektomia wraz z usunięciem węzłów chłonnych miednicy uznawana jest za złoty standard w leczeniu nowotworów pęcherza moczowego naciekających mięśniówkę. W trakcie przeprowadzania zabiegu u mężczyzn poza pęcherzem moczowym usuwa się także prostatę, pęcherzyki nasienne, moczowody dystalne oraz okoliczne węzły chłonne. U kobiet natomiast usuwa się również cewkę moczową, pochwę oraz macicę.

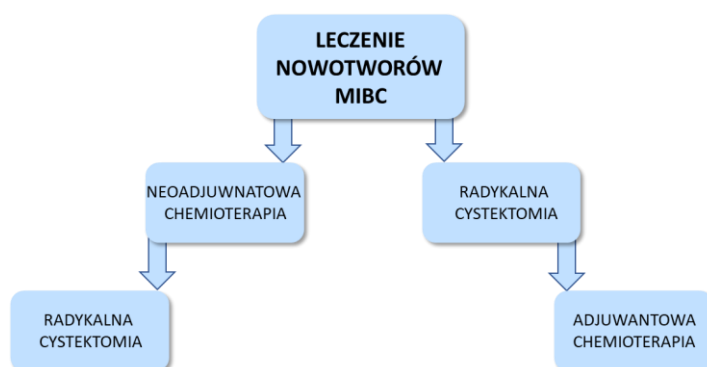
Do lat 80-tych XX wieku radykalna cystektomia była jedyną szansą wyleczenia dla pacjentów chorujących na naciekającego raka pęcherza moczowego. Niestety pięcioletni wskaźnik przeżycia wynosił jedynie około 50% stąd konieczne było stosowanie dodatkowej terapii o wyższej skuteczności. W związku z tym rozpoczęto podawanie pacjentom chemioterapii neoadjuwantowej (NAC; ang. *neoadjuvant chemotherapy*) podawanej przed wykonaniem zabiegu operacyjnego [77]. NAC przeznaczona jest dla pacjentów z rakiem pęcherza moczowego w stopniu zaawansowania T2-T4 naciekającym na mięśniówkę [78]. Jej głównym celem jest wyeliminowanie mikroprzerzutów, które jak wykazano mogą występować po cystektomii zazwyczaj w miejscach odległych



od występowania guza pierwotnego [77, 79]. Ponadto NAC sprzyja także obniżaniu stopnia zaawansowania oraz rozmiarów guza, który w momencie diagnozy może nie nadawać się do usunięcia [77, 80]. Dodatkowo przyjmowanie przez pacjentów chemioterapii przed zabiegiem operacyjnym jest lepiej tolerowane niż po operacji, gdy organizm jest osłabiony [81]. NAC stosuje się także gdy planowana jest ochrona pęcherza moczowego przed całkowitą resekcją [82]. NAC oparta jest głównie na chemioterapii wielolekowej, w której stosowana jest cisplatyna [83], a najpowszechniej stosowanymi schematami są MVAC (metotreksat, winblastyna, adriamycyna, cisplatyna), CMV (cisplatyna, metotreksat, winblastyna) oraz GC (gemcytabina, cisplatyna) [81, 84]. Już w 1985 r. wykazano, iż kombinacja czterech związków jest bardziej skuteczna niż stosowanie jednego związku. Potwierdzono również większą skuteczność MVAC w porównaniu do stosowania samej cisplatyny [85]. Wyniki badań nad stosowaniem schematów MVAC i GC dowodzą, iż schemat MVAC jest o wiele bardziej toksyczny dla całego organizmu niż schemat GC. MVAC może prowadzić do mielosupresji oraz zapalenia błon śluzowych, dlatego też coraz częściej w NAC stosowany jest schemat GC [66, 86]. Zastosowanie NAC u pacjentów z MIBC w stopniu T2-T4, a następnie radykalnej cystektomii zwiększa przeżywalność pacjentów, w porównaniu do wykonania jedynie radykalnej cystektomii [87, 88]. Niektórzy badacze postulują nawet, aby neoadjuwantowa chemioterapia, a następnie cystektomia były podstawowym schematem leczenia chorych na naciekającego mięśniówkę raka pęcherza moczowego [88]. Jednak jedne z najnowszych danych literaturowych wskazują, iż istnieje pewien odsetek pacjentów, którzy nie odpowiadają na zastosowaną chemioterapię NAC. W związku z tym ważne jest opracowanie strategii klasyfikacji pacjentów, u których podanie NAC przyniesie oczekiwane skutki [89]. Wyniki badań przeprowadzone przez V. G. Pattel i *wsp.* wykazali, iż gen *ERCC2* (ang. *ERCC Excision Repair 2*; białko zaangażowane w naprawę przez wycinanie nukleotydów sprzężonych z transkrypcją), który jest zaangażowany w naprawę wycinania nukleotydów, może być markerem wskazującym pacjentów, którzy będą odpowiadali na neoadjuwantową chemioterapię [66]. Jednakże stosowanie neoadjuwantowej chemioterapii obarczone jest dużą wadą, tj. nieznajomością stopnia zaawansowania nowotworu w momencie podawania jej pacjentom. Pacjenci są poddawani NAC mimo, iż stopień zaawansowania guza nie wskazuje na potrzebę stosowania NAC [81, 89]. Ponadto opóźnienie w przeprowadzeniu cystektomii u pacjentów, którzy nie będą reagowali na NAC, może pogorszyć ich stan zdrowia [90].

Chemioterapia adjuwantowa (AC; ang. *adjuvant chemotherapy*,) jest podawana pacjentom po wykonanym zabiegu cystektomii, u których został usunięty guz o stopniu zaawansowania T2-T4. Najważniejszym celem stosowania AC jest zniwelowanie ryzyka nawrotu choroby. Chemioterapia podawana po wykonaniu zabiegu operacyjnego posiada zarówno wady, jak i zalety. Główną zaletą takiego rozwiązania jest zastosowanie od razu leczenia miejscowego – usunięcie guza. Ponadto AC cechuje się zastosowaniem schematu chemioterapeutycznego dostosowanego do stopnia zaawansowania guza, ponieważ po jego usunięciu jest on badany pod kątem histopatologicznym, stąd znany jest dokładny stopień jego zaawansowania oraz zróżnicowania. Takie rozwiązanie pozwala uniknąć podawania pacjentom zbyt agresywnej chemioterapii. Główną wadą AC jest niezbyt dobra jej tolerancja przez pacjentów po przejściu rozległej operacji usunięcia pęcherza moczowego. Dodatkowo gdy u pacjenta występują mikroprzerzuty podawanie chemioterapii mające na celu ich zlikwidowanie jest opóźnione, ponieważ w pierwszej kolejności usuwany jest guz pierwotny, w związku z czym w momencie rozpoczęcia leczenia AC przerzuty mogą być już mocno rozwinięte [77, 78, 81, 91]. W leczeniu chorych na raka pęcherza moczowego MIBC stosowana jest również radioterapia [77].

Aby poprawić jakość życia pacjentów poddawanych leczeniu opracowano strategie ochrony pęcherza moczowego, które są również stosowane w przypadku pacjentów, u których nie może zostać przeprowadzona radykalna cystektomia. W tym celu stosuje się przezcewkową resekcję guza, częściową cystektomię, chemioterapię oraz radioterapię. Zastosowanie powyżej wymienionych terapii nie daje jednak takich samych efektów jak przeprowadzenie radykalnej cystektomii [77].



**Ryc. 4.** Schemat leczenia stosowany u pacjentów z naciekającym (MIBC) rakiem pęcherza moczowego

### 1.3.3 SPOSOBY LECZENIA CHORYCH NA PRZERZUTUJĄCE RAKI PĘCHERZA MOCZOWEGO

Około 4% wszystkich diagnozowanych nowych przypadków raka pęcherza moczowego stanowi rak pęcherza moczowego z przerzutami. Ze względu na odległe przerzuty pacjenci posiadają bardzo złe rokowanie, a średni czas przeżycia przy standardowej chemioterapii opartej na cisplatynie wynosi między 13 a 15 miesięcy. Dzięki postępowi badań nad rakiem pęcherza moczowego w ostatnim czasie powstały nowe terapie, m.in. z wykorzystaniem przeciwciał czy terapie celowane (**Ryc. 5**) [67].

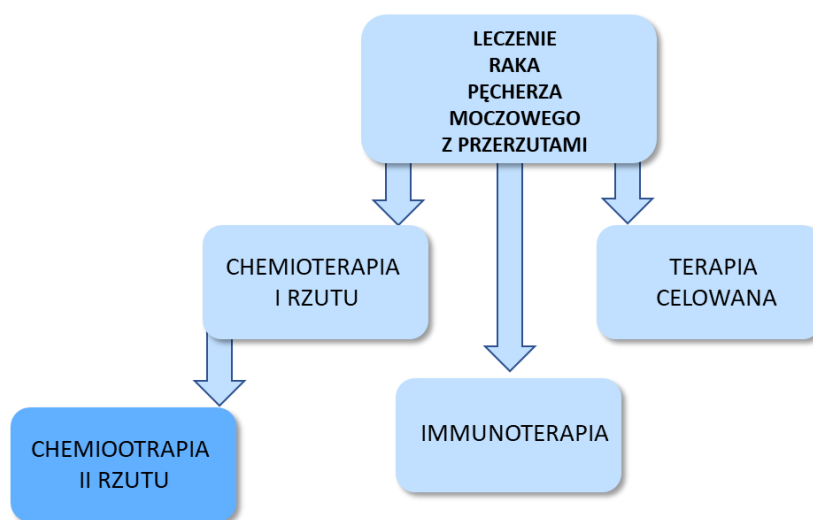
Terapeutyki oparte o platynę są podstawową terapią I rzutu leczenia chorych na zaawansowanego raka pęcherza moczowego z przerzutami [92]. Chemioterapia podawana pacjentom może być jedno- lub wielolekowa. Choć w chemioterapii jednolekowej stosuje się najczęściej cisplatynę, karboplatynę oraz lobaplatynę, to niestety bardzo często nie przynosi ona oczekiwanych rezultatów. W chemioterapii wielolekowej stosuje się połączenia kilku leków, co jest o wiele bardziej skuteczne, aniżeli chemioterapia jednolekowa [93]. Jako chemioterapię wielolekową I rzutu zaleca się zastosowanie schematu GC lub MVAC. Schemat GC posiada lepszy profil cytotoksyczności, jest łagodniejszy dla pacjentów przy zachowaniu skuteczności leczenia w związku z czym jest on obecnie częściej stosowany. Podawania pacjentom taksanów, takich jak paklitaksel czy larotaksel w połączeniu z terapią GC, były również intensywnie badane. Jednakże ze względu na duży stopień toksyczności, występowanie neutropenii oraz małopłytkowości po zastosowaniu schematu taksany+GC zaprzestano stosowania takiej kombinacji [75, 92].

U pacjentów, u których chemioterapia I rzutu nie przyniosła oczekiwanych rezultatów istnieje możliwość zastosowania chemioterapii II rzutu. Podobnie jak w przypadku chemioterapii I rzutu może być to chemioterapia jedno- lub wielolekowa [93]. Jedynym lekiem zatwierdzonym przez EMA (*ang. European Medicines Agency*; Europejska Agencja Leków), który jest stosowany jako chemioterapia jednolekowa II rzutu, jest winflunina. Badania drugiej fazy wskazały, iż wskaźnik odpowiedzi u pacjentów po zastosowaniu winfluniny wyniósł 18% [92, 94]. Zalecana jest ona u pacjentów z przerzutującym rakiem pęcherza moczowego po niepowodzeniu terapii I rzutu opartej na cisplatynie. Intensywnie badana jest również skuteczność paklitakselu jako związku mogącego być stosowanym w terapii II rzutu [92], a także docetakselu oraz gemcytabiny [93]. W badaniach nad schematami wielolekowymi jako chemioterapia II rzutu wykazano, iż kombinacje kilku leków często przynoszą lepsze wskaźniki odpowiedzi, natomiast wykazują się wyższą toksycznością, co przekłada się na obniżenie wskaźników

przeżywalności. Najintensywniej badanym połączeniem związków możliwym do stosowania jako chemioterapia II rzutu jest paklitaxel oraz gemcytabina [93].

Znaczna liczba mutacji w komórkach raka pęcherza moczowego sprawia, iż może on być podatny na immunoterapię, a zwłaszcza leczenie inhibitorami punktów kontrolnych układu odpornościowego (ang. *immune checkpoint inhibitors*) w postaci przeciwciał monoklonalnych specyficznych wobec białka PD-1 oraz jego ligandu, PD-L1. Od 2015 r. zostało zatwierdzonych pięć inhibitorów punktów kontrolnych (przeciwciał) do leczenia raka pęcherza moczowego z przerzutami - atezolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab oraz pembrolizumab [67, 95].

W przypadku zaawansowanego raka pęcherza moczowego z przerzutami trwają również prace nad terapią celowaną. Obecnie głównym celem jest receptor czynnika wzrostu fibroblastów, który ma wpływ na wiele procesów komórkowych takich jak proliferacja czy angiogeneza. Jednym z inhibitorów FGFR, który znajduje się w fazie badań klinicznych jest BGJ398 (infigratinib). Posiada on zdolność do hamowania działania FGFR1, FGFR2 oraz FGFR3. Prowadzone są również badania nad skutecznością działania bortezomibu (inhibitora proteasomów), worinostatu (inhibitora deacetylaz histonów) oraz sorafenibu (inhibitora kinaz tyrozynowych VEGFR (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*; receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczynowego)/PDGFR (ang. *platelet-derived growth factor receptor*; receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu) [93]. Wykazano również skuteczność działania bewacyzumabu, przeciwciała monoklonalnego posiadającego zdolność wiązania VEGF, w połączeniu z cisplatyną oraz gemcytabiną [96].



Ryc. 5. Schemat leczenia stosowany u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego z przerzutami

## **1.4 OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANE TERAPEUTYKI**

Lekooporność, czyli zmniejszona wrażliwość komórek nowotworowych na działanie związków chemicznych stosowanych w terapii stanowi duże wyzwanie terapeutyczne. Lekooporność komórek nowotworowych często prowadzi do powstawania przerzutów oraz nawrotów choroby. Dlatego też tak ważne jest zrozumienie mechanizmów molekularnych oraz poznanie białek odpowiadających za nabywanie oporności komórek nowotworowych na najczęściej stosowane terapie. Mechanizmy, które odpowiadają za rozwój oporności to m.in. systemy naprawy DNA, autofagia oraz proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego. Wśród białek biorących udział w rozwijaniu oporności komórek nowotworowych znajdują się pompy transporterowe typu ABC (ang. *ATP-binding cassette transporter*; transporter ABC (białko mające kastę wiążącą ATP)), onkogeny, a także geny supresorowe [97].

### **1.4.1 OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA CISPLATYNĘ**

Cisplatyna jest jednym z pierwszych leków chemoterapeutycznych, w skład którego wchodzi metal. Szacuje się, iż wartość rocznej sprzedaży cisplatyny na świecie wynosi około 2 mld dolarów amerykańskich. Ponad połowa pacjentów chorych na nowotwory na świecie jest leczona przy wykorzystaniu tego związku [98]. Cisplatyna została zsyntetyzowana po raz pierwszy w 1844 r. przez Peyrone, natomiast struktura chemiczna tego związku została pierwszy raz wyjaśniona w 1893 r. przez A. Wernera. Do lat 60-tych XX w. cisplatyna nie cieszyła się dużym zainteresowaniem. Zmieniło się to w 1965 r., kiedy Rosenberg zaobserwował, iż związki platyny są zdolne do hamowania podziałów komórek *Escherichia coli*. Od tego momentu cisplatyna zyskała duże zainteresowanie, również w zastosowaniu w chemioterapii nowotworów [99].

Cisplatyna może reagować z wieloma cząsteczkami takimi jak białka czy kwasy nukleinowe. Po wejściu cisplatyny do komórki dochodzi do zastąpienia jej dwóch atomów chloru cząsteczkami wody, co prowadzi do powstania silnego ugrupowania elektrofilowego będącego w stanie reagować z różnymi nukleofilami komórkowymi, włączając w to grupy sulfhydrylowe białek czy atomy azotu cząsteczek kwasów nukleinowych. Cisplatyna wiążąc się z atomami azotu N7 sąsiednich zasad purynowych prowadzi do ich krzyżowego sieciowania. Powstałe addukty DNA-cisplatyna w konsekwencji prowadzą do uszkodzenia DNA komórek, zahamowania podziałów

komórkowych i ostatecznie apoptozy komórek nowotworowych. Wskazuje się, iż to właśnie DNA jest głównym celem molekularnym cisplatyny [99, 100].

Głównymi mechanizmami odpowiadającymi za oporność komórek nowotworowych na cisplatynę jest jej zwiększone wypompowywanie z komórki, zmniejszony napływ do komórki (m.in. zmiany w ekspresji białek ATP7A (ang. *ATPase Copper Transporting Alpha*; białko Menkesa), ATP7B (ang. *ATPase Copper Transporting Beta*; ATPaza transportująca  $Cu^{2+}$ ) oraz CTR1 (ang. *Copper Transport Protein 1*; białko transportujące miedź)), mechanizmy naprawy DNA, tolerancja komórek na uszkodzenia DNA oraz wiązanie się cisplatyny z glutationem [100, 101]. Bardzo często za oporność komórki na cisplatynę odpowiada więcej niż jeden z wymienionych mechanizmów (**Tab. 8**) [102].

**Tab. 8** Cząsteczki oraz procesy zaangażowane w rozwój lekooporności na cisplatynę

CZĄSTECZKI ORAZ PROCESY	WPLYW NA LEKOOPORNOŚĆ
<b>ERCC1</b>	Białkiem odpowiedzialnym za rozpoznawanie uszkodzonych fragmentów DNA jest enzym o charakterze egzonukleazy – ERCC1 (ang. <i>excision repaire crosscomplementation group 1</i> ), która naciina uszkodzoną nić DNA, a następnie ją niszczy. W miejscu wyciętego fragmentu dochodzi do syntezy nowego łańcucha oligonukleotydowego na matrycy nici prawidłowej. Nadekspresja ERCC1 związana jest z opornością komórek nowotworowych na cisplatynę [100].
<b>CTR1, ATP7A, ATP7B</b>	Napływ znacznej części cisplatyny do komórek odbywa się przy udziale białka CTR1. Komórki, w których występuje obniżona ekspresja CTR1, cechują się opornością wobec cisplatyny. Natomiast białka CTR2, ATP7A oraz ATP7B są odpowiedzialne za wypompowywanie cisplatyny. Ponadto nadekspresja transporterów typu ATP7A oraz ATP7B również związana jest ze zwiększonym wypływem cisplatyny z komórek, co skutkuje rosnącą lekoopornością [100, 103, 104].
<b>Glutation</b>	Cisplatyna po wejściu do komórki potrafi tworzyć koniugaty z glutationem przy udziale S-transferaz glutationowych. Powstanie takich koniugatów prowadzi do zwiększenia rozpuszczalności cisplatyny, czego konsekwencją jest jej wydalanie. Zwiększenie ekspresji enzymów uczestniczących w syntezie glutationu oraz biorących udział w tworzeniu koniugatów cisplatyny z glutationem jest odpowiedzialne za wytwarzanie lekooporności na cisplatynę w komórkach nowotworowych. [101, 102].
<b>EMT</b> (ang. <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> ; przejście nabłonkowo-mezenchymalne)	Podczas procesu EMT komórki nowotworowe tracą cechy komórek nabłonkowych, natomiast zyskują charakter mezenchymalny. Wiąże się to utratą ekspresji E-kadheryny oraz zwiększoną ekspresją represorów transkrypcji E-kadheryny: Snail, Slug, Twist, Zeb-1 oraz Zeb-2. Snail odpowiada za bezpośrednie obniżanie ekspresji białka ERCC1 uczestniczącego w naprawie uszkodzonych przez cisplatynę fragmentów DNA [100].

#### 1.4.2 OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA GEMCYTABINĘ

Gemcytabina (29,29-difluoro-29-deoksycytydina, dFdC) jest analogiem arabinozydu cytozyny (Ara-C) posiadającym dwa atomy fluoru w pierścieniu furanozowym [105]. Gemcytabina jest prolekiem ulegającym aktywacji na drodze wewnątrzkomórkowej fosforylacji przy udziale dCK (ang. *deoxycytidine kinase*; kinaza deoksycytydynowa) co prowadzi do utworzenia dFdCMP (ang. *2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine monophosphate*; monofosforan gemcytabiny). Następnie monofosforan gemcytabiny jest przekształcany do dFdCDP (ang. *2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine diphosphate*; difosforan gemcytabiny) oraz dFdCTP (ang. *2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine triphosphate*; trifosforan gemcytabiny), które są aktywnymi metabolitami gemcytabiny. Gemcytabina posiada wiele celów molekularnych, jednak jej aktywność antyproliferacyjna związana jest głównie z hamowaniem syntezy DNA. Gemcytabina hamuje przejście komórki z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego. Ponadto trifosforan gemcytabiny jest inhibitorem polimerazy DNA, a także posiada zdolność wiązania się z DNA [105, 106]. Gemcytabina transportowana jest przez błonę komórkową za pomocą aktywnych NT (ang. *nucleoside transporter*; transporter nukleozydowy) [105]. Oporność komórek nowotworowych na działanie gemcytabiny jest związana ze zmianami w ekspresji enzymów biorących udział w metabolizowaniu gemcytabiny, nadekspresji pomp biorących udział w jej wypompowywaniu oraz aktywacji przejścia EMT. Ponadto szlaki Hedgehog (Hh), Wnt oraz Notch są aktywowane w komórkach nowotworowych opornych na gemcytabinę (**Tab. 9**) [107].

**Tab. 9** Szlaki sygnałowe, czynniki transkrypcyjne oraz białka zaangażowane w rozwój lekooporności na gemcytabinę

SZLAKI SYGNAŁOWE, CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE ORAZ BIAŁKA	WPLYW NA LEKOOPORNOŚĆ
SZLAK SYGNAŁOWY HEDGEHOG	Szlak sygnałowy Hedgehog prawdopodobnie ma kluczowe znaczenie dla utrzymania populacji nowotworowych komórek macierzystych będących opornymi na gemcytabinę. Szlak ten reguluje ekspresję markerów komórek nowotworowych o charakterze macierzystym jak ALDH1, Bmi1, Snail, Wnt2, PDGRa, Jagged-1, CD44 oraz c-MET, a więc pośrednio przyczynia się do powstawania oporności komórek nowotworowych na gemcytabinę [107].
SZLAK SYGNAŁOWY NOTCH	Szlak sygnałowy Notch odgrywa istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej, proliferacji komórek, różnicowaniu oraz apoptozie. Ponadto ścieżka ta może brać udział w progresji guzów oraz powstawaniu oporności na stosowane terapie, w tym także gemcytabinę [107].

<b>CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE</b>	Aktywność czynników transkrypcyjnych również jest odpowiedzialna za oporność komórek nowotworowych na gemcytabinę. Wyróżnić tutaj należy białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej – HMGA. Zahamowanie działania HMGA1 zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na gemcytabinę [108].
<b>hENT1 (ang. <i>Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1</i>), dCK, ABC</b>	Zmiany w ekspresji białek biorących udział w metabolizowaniu gemcytabiny, szczególnie obniżenie ekspresji hENT1 oraz dCK, są mocno związane z powstawaniem oporności na ten związek [100, 101]. Dodatkowo nadekspresja pomp typu ABC biorących udział w wypompowywaniu gemcytabiny zwiększa oporność komórek nowotworowych na ten związek [107].

### 1.4.3 OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA ALKALOIDY VINCA

Alkaloidy *vinca* (alkaloidy barwinka różyczkowego) są związkami pochodzenia naturalnego wykazującymi właściwości przeciwnowotworowe. Związki te, po raz pierwszy odkryte przez Roberta Noble oraz Charlesa Beera, pozyskiwane są z barwinka różyczkowego (*Catharanthus roseus*) [109]. Główne związki należące do grupy alkaloidów *vinca* to winblastyna (VBL), winorelbina (VRL), winkrystyna oraz windezyna (VDS), a od 2008 r. także syntetyczny alkaloid winflunina (VFL) [110]. Mechanizm działania alkaloidów *vinca* polega na hamowaniu polimeryzacji tubuliny, co zaburza działanie mikrotubul, a w konsekwencji prowadzi do zatrzymania podziału komórki na etapie metafazy. Mikrotubule, poza uczestniczeniem w podziałach komórkowych, są również zaangażowane w inne procesy jak transport międzykomórkowy, ruchliwość komórek oraz stabilność cytoszkieletu komórkowego. Dlatego też zaburzenie działania mikrotubul jest odczuwalne także w wyżej wymienionych procesach (**Tab. 10**) [110, 111].

**Tab. 10** Białka zaangażowane w rozwój lekooporności na alkaloidy *vinca*

<b>BIAŁKA</b>	<b>WPLYW NA LEKOOPORNOŚĆ</b>
<b>ZMIANY W EKSPRESJI BIAŁEK</b>	Oporność komórek nowotworowych na działanie alkaloidów <i>vinca</i> wiąże się przede wszystkim z nadekspresją pomp P-gp (które wchodzi w skład rodziny transporterów ABC), kodowanych przez gen <i>mdr1</i> (ang. <i>multi drug resistance 1</i> ; gen oporności wielolekowej). Alkaloidy <i>vinca</i> jako substraty pompy P-gp biorą udział w rozwijaniu oporności wielolekowej (MDR; ang. <i>multi drug resistance</i> ), skutkiem czego jest obniżanie stężenia związków w komórkach oraz zmniejszanie ich cytotoksyczności. Ponadto warto zaznaczyć, iż komórki nowotworowe odporne na alkaloidy <i>vinca</i> cechują się często podwyższoną ekspresją $\beta$ III tubuliny, Cav-1 oraz FASN [112, 113].



#### 1.4.4 OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA DOKSORUBICYNĘ

Doksorubicyna, metabolit *Streptomyces peuceticus var. caesius*, należy do grupy antybiotyków antracyklinowych. Zbudowana jest z czterech pierścieni antrachinonowych, które są przyłączone do jednego ugrupowania aminocukrowego. Jej właściwości przeciwnowotworowe zostały odkryte w 1950 r. Doksorubicyna jest skutecznym lekiem, jednak posiada dwie główne wady: wysoką kardiotoxycyżność oraz szybkie rozwijanie się lekooporności komórek nowotworowych. Za główne mechanizmy działania doksorubicyny uważa się hamowanie replikacji DNA na drodze interkalacji z DNA oraz uszkodzanie błony komórkowej za pomocą wytwarzanych wolnych rodników. Doksorubicyna zakłóca również naprawę DNA, w której bierze udział topoiżomeraza II (*Tab. 11*) [114].

*Tab. 11* Białka zaangażowane w rozwój lekooporności na doksorubicynę

BIĄŁKA	WPLYW NA LEKOOPORNOŚĆ
<b>MDR1</b>	Nadekspresja <i>MDR1</i> skutkuje zwiększonym wypływem związku z komórek nowotworowych [114].
<b>FOXO 3</b> (ang. <i>Forkhead Box O3</i> )	Doksorubicyna prowadzi do akumulacji czynnika transkrypcyjnego FOXO3. Czynniki ten jest związany z hamowaniem cyklu komórkowego, działaniem antyoksydacyjnym oraz niekiedy promuje apoptozę. W związku z tym sprzyja on przeżywalności komórek nowotworowych, a jego nadekspresja może się wiązać z powstawaniem oporności na doksorubicynę [108].
<b>p300</b>	Obniżenie ekspresji białka p300 w komórkach nowotworowych powoduje rozwój oporności na doksorubicynę [115].
<b>IZOFORMA <math>\alpha</math></b> <b>TOPOIŻOMERAZY</b> <b>II</b>	Doksorubicyna działa przeciwnowotworowo poprzez wiązanie się z izoformą $\alpha$ topoiżomerazy II, w związku z czym jej zmniejszona ekspresja powoduje nabywanie przez komórki lekooporności [114].

#### 1.4.5 OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA METOTREKSAT

Metotreksat to związek o charakterze antymetabolitu, czyli związku zaburzającego przebieg określonego szlaku metabolicznego. Jego główny mechanizm działania opiera się na hamowaniu DHFR (ang. *dihydrofolate reductase*; reduktaza dihydrofolianowa), enzymu biorącego udział w przemianie dihydrofolianu do tetrahydrofolianu. Hamowanie działania reduktazy dihydrofolianowej prowadzi do zahamowania syntezy nukleotydów purynowych oraz tymidynianów, które są konieczne do syntezy oraz naprawy DNA, a także replikacji komórki [116].

*Tab. 12 Białka zaangażowane w rozwój lekooporności na doksorubicynę*

<b>BIAŁKA ORAZ SZLAKI SYGNAŁOWE</b>	<b>WPLYW NA LEKOOPORNOŚĆ</b>
<b>BIAŁKA MRP</b> (ang. <i>Multidrug Resistance-Associated Protein</i> ): <b>1, 2, 3, 4</b>	Pośredniczą w zmniejszaniu akumulacji związku w komórce poprzez jego zwiększony wypływ [117]
<b>BRAK POLIGLUTAMINIANU, ZWIĘKSZENIE ILOŚCI REDUKTAZY DIHYDROFOLIANOWEJ ORAZ HYDROLAZY Γ-GLUTAMYLOWEJ</b>	Zmniejszone wchłanianie do komórki [116]

## **1.5 IZOTIOCYJANIANY (ITC ang. *ISOTHIOCYANATE*) – WYSTĘPOWANIE, WŁAŚCIWOŚCI ORAZ DZIAŁANIE PRZECIWNOWOTWOROWE**

### **1.5.1 WARZYWA KRZYŻOWE – BOGATE ŹRÓDŁO IZOTIOCYJANIANÓW**

Odżywianie odgrywa ważną rolę w życiu oraz zdrowiu człowieka. Jest to istotny aspekt zapobiegania chorobom, w tym również chorobom nowotworowym [118]. Wiele badań epidemiologicznych wskazuje, iż dieta bogata w owoce oraz warzywa, a w szczególności warzywa krzyżowe jak kapusta, brokuły, kalafior, brukselka, rzeżucha czy jarmuż obniża ryzyko zachorowania na nowotwory o 40% [119, 120]. Rośliny krzyżowe były uprawiane i cenione ze względu na swoje właściwości prozdrowotne już w czasach starożytnej Grecji [119, 121, 122]. Spożycie warzyw krzyżowych stanowi około 10-15% całkowitego spożycia warzyw na świecie. Najwięcej warzyw krzyżowych spożywanych jest w Chinach, ponad 100 g/dzień, natomiast w Ameryce Północnej ilość spożywanych warzyw krzyżowych wynosi około 25-30 g/dzień. W Europie ilość ta różni się w zależności od kraju, a wartości osiągają od 15-30 g/dzień. Badania epidemiologiczne dotyczące związku pomiędzy spożywaniem warzyw krzyżowych, a ryzykiem zachorowalności na nowotwory pokazują odwrotną zależność tzn., zwiększone spożywanie warzyw krzyżowych zmniejsza ryzyko zachorowania na nowotwory [123].

Stale rosnące statystyki dotyczące śmiertelności związanej z nowotworami na świecie wskazują, iż obecnie stosowane terapie nie są do końca skuteczne. Sytuacja ta wymusza ciągłe poszukiwania nowych środków terapeutycznych [124]. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się terapie oparte na zastosowaniu związków pochodzenia naturalnego [125]. Wskazuje się, iż podstawowymi zaletami stosowania środków pochodzenia naturalnego są niskie koszty oraz minimalna toksyczność [124]. Jedną z grup roślin, które są bogate w substancje o charakterze przeciwnowotworowym, są wspomniane powyżej warzywa krzyżowe, bogate w glukozynolany, które w wyniku hydrolizy są przekształcane do aktywnych biologicznie izotiocyanianów. Zarówno badania *in vitro*, *in vivo*, jak i epidemiologiczne wskazują, iż izotiocyaniany hamują karcynogenezę w pęcherzu moczowym [125, 126]. Farmakokinetyka tych związków sprawia, iż bardzo szybko dostają się one do pęcherza. Ponadto metabolity izotiocyanianów akumulują się w moczu, przez co nabłonek wyścielający wnętrze pęcherza moczowego jest najbardziej wystawiony na działanie izotiocyanianów. Dlatego też izotiocyaniany mogą być wysoce skuteczne w terapii nowotworów pęcherza moczowego [127].

### 1.5.2 IZOTIOCYJANIANY – WYSTĘPOWANIE, POWSTAWANIE ORAZ METABOLIZM

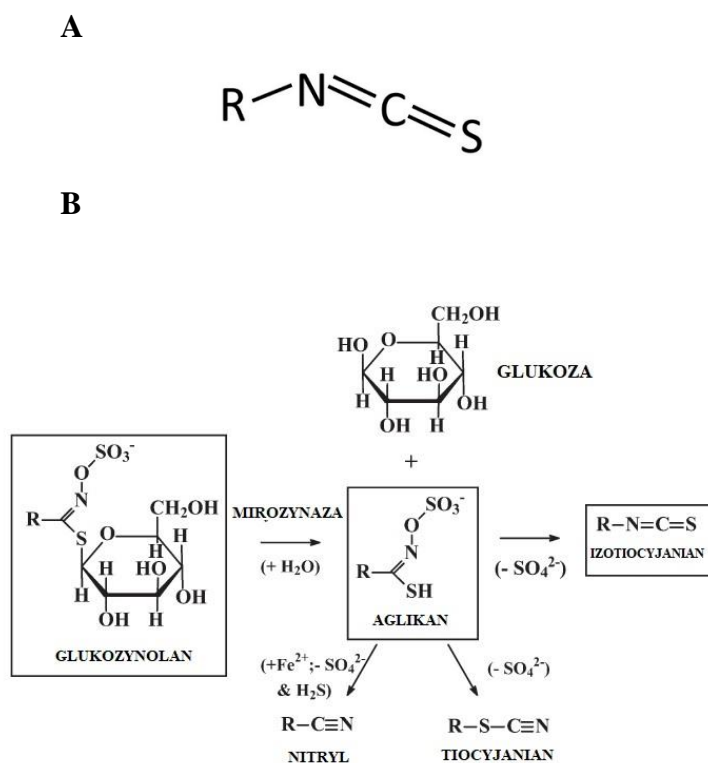
Izotiocyaniany to występujące w roślinach należących do rodziny *Cruciferae* (krzyżowych) związki organiczne. Do rodziny roślin krzyżowych należą m.in. brokuły, rukiew wodna, jarmuż, kapusta, kapusta włoska, brukselka, gorczyca oraz kalafior. Izotiocyaniany posiadają szereg właściwości prozdrowotnych [128], m.in. właściwości przeciwbakteryjne, zapobiegają chorobom sercowo-naczyniowym oraz wykazują działanie przeciwnowotworowe [125]. Przeciwbakteryjne właściwości wynikają m.in. z ich zdolności do deregulacji procesów enzymatycznych oraz zwiększenia ekspresji białek szoku cieplnego. Sugeruje się, że związki te mogą być stosowane jako naturalne antybiotyki, dodatki do żywności lub pestycydy [118]. Jednakże najważniejszą cechą izotiocyanianów jest ich zdolność do hamowania indukowanej chemicznie karcynogenezy [129].

Do najczęściej występujących naturalnie izotiocyanianów należy izotiocyanian allilu (AITC, ang. *allyl isothiocyanate*), sulforafan (SFN, ang. *sulphoraphane*), izotiocyanian fenyloetylu (PEITC, ang. *phenethyl isothiocyanate*) oraz izotiocyanian benzylu (BITC, ang. *benzyl isothiocyanate*) [123, 129].

Izotiocyaniany występują w roślinach jako glukozynolany, organiczne związki o charakterze anionowym. W strukturze glukozynolanów obecna jest  $\beta$ -D-glukoza, siarka oraz łańcuch boczny – alifatyczny lub aromatyczny. Aminokwasy budujące łańcuch boczny mogą być heterocykliczne (tryptofan), alifatyczne (alanina, walina, leucyna, metionina) lub aromatyczne (fenyloalanina, tyrozyna). W zależności od struktury łańcucha aminokwasowego glukozynolany dzieli się na heterocykliczne, alifatyczne oraz aromatyczne. Ilość glukozynolanów w roślinach różni się w zależności od gatunku rośliny. Wpływ na zawartość glukozynolanów w roślinach mają nie tylko czynniki środowiskowe jak klimat czy region geograficzny, lecz także część rośliny oraz stadium jej rozwoju. Dotychczas zidentyfikowanych zostało około 200 struktur glukozynolanów naturalnego pochodzenia [118].

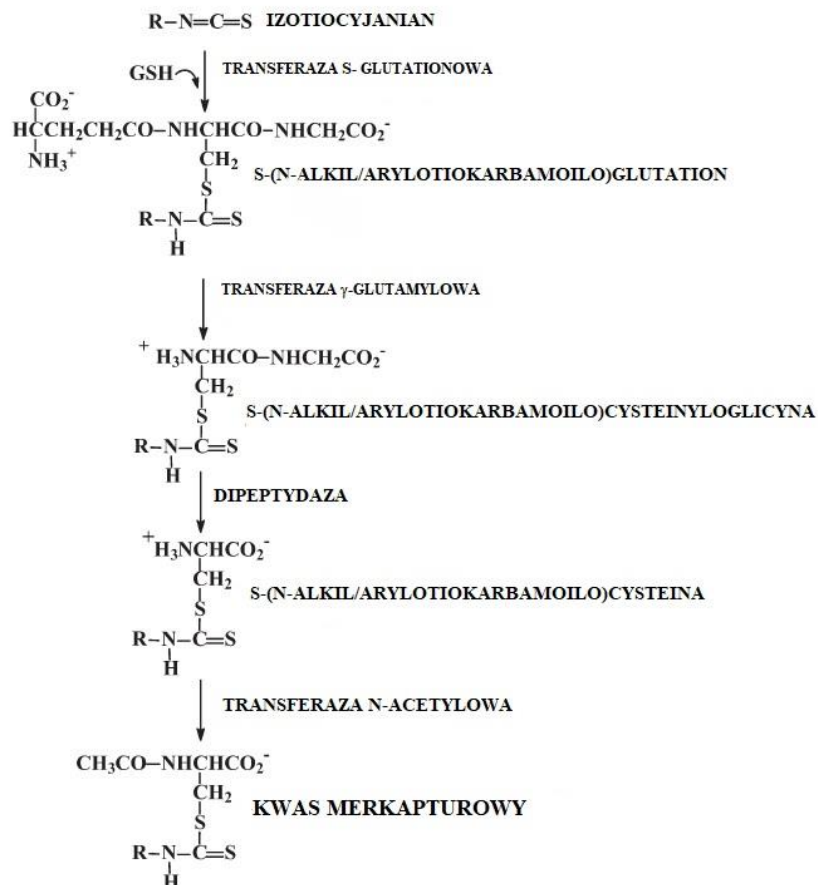
Same glukozynolany nie wykazują aktywności biologicznej [129]. Katalizowana przez mirozynazę hydroliza glukozynolanów prowadzi do otrzymania aktywnych biologicznie pochodnych: nitryli, tiocyanianów oraz izotiocyanianów (**Ryc. 6**) [118]. Glukozynolany są magazynowane w cytoplazmie komórek, natomiast mirozynaza ulega ekspresji na zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej roślin, więc nie ma bezpośredniego kontaktu z glukozynolanami. Cięcie, żucie lub rozrywanie części roślin prowadzi do uwolnienia mirozynazy doprowadzając tym samym do jej bezpośredniego

kontaktu z substratami, czego konsekwencją jest rozbitcie grupy siarkowej wiązania glikozydowego. Następnie uwalniana jest glukoza, w wyniku czego powstaje niestabilny związek pośredni aglikon. W kolejnym etapie dochodzi do samoistnego rozpadu aglikonu do jednego z wielu produktów takich jak: tiocyjanianów, nitryli oraz izotiocyjanianów w zależności od panującego pH oraz obecności różnych kofaktorów. Centralny, elektrofilowy atom węgla obecny w strukturze izotiocyjanianów odpowiada za ich aktywność biologiczną. Oddziałuje on z nukleofilami znajdującymi się w komórce, w tym również z wieloma białkami zaangażowanymi w rozwój nowotworów. Poza elektrofilowym atomem węgla również łańcuchy boczne izotiocyjanianów mogą wpływać na ich aktywność biologiczną, m.in. poprzez zmianę elektrofilowości grupy  $-N=C=S$  oraz właściwości lipofilowych cząsteczki. Ilość powstałych izotiocyjanianów jest zależna m.in. od endogenego pH rośliny, temperatury otoczenia, dostępności jonów żelaza, pory roku, warunków klimatycznych w danym roku uprawy, warunków glebowych, rodzaju glukozynolanów, a także sposobu przechowywania zebranych roślin. Ilość powstałych izotiocyjanianów jest także zależna od sposobu przygotowania roślin krzyżowych do spożycia. W wyniku gotowania czy smażenia dochodzi do dezaktywacji mirozyny. W takiej sytuacji hydroliza glukozynolanów odbywa się przy udziale mikrobiomu w przewodzie pokarmowym, jednak hydroliza ta cechuje się dużo niższą wydajnością [118]. Wyniki badań wykazały, iż spożywanie świeżych kiełków brokułów powoduje dużo wyższe stężenie sulforafanu w osoczu oraz w moczu badanych ochotników niż spożywanie komercyjnie dostępnego suplementu diety bogatego w glukorafan ale nie zawierającego mirozyny. Oznacza to, że izotiocyjaniany są lepiej wchłaniane niż glukozynolany [118, 119, 121, 128-130].



**Ryc. 6.** (A) Wzór strukturalny izotiocyanianu; R – grupa alkilowa lub arylowa, (B) Hydroliza glukozynolanów [130]

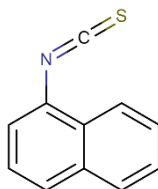
Powstałe w wyniku hydrolizy glukozynolanów izotiocyaniany ulegają dalszemu metabolizmowi na drodze szlaku kwasów merkapturowych. Po spożyciu warzyw krzyżowych izotiocyaniany przenikają na drodze biernej dyfuzji przez nabłonek przewodu pokarmowego oraz śródbłonek naczyń włosowatych, a następnie wiążą się odwracalnie z białkami osocza i przenikają przez błonę plazmatyczną do wnętrza komórek [130]. W komórce, w pierwszym etapie szlaku kwasów merkapturowych, izotiocyaniany przy udziale S-transferazy glutationowej łączą się z glutationem [128]. Koniugaty izotiocyanianów z glutationem są wydalane z komórki przy udziale białek oporności wielolekowej. W środowisku zewnątrzkomórkowym reszty  $\gamma$ -glutamyłowe koniugatów są rozszczepiane przez transferazę  $\gamma$ -glutamyłową ( $\gamma$ -GT), natomiast reszty glicyłowe przez dipeptydazę. Powstałe koniugaty cysteiny są transportowane do wątroby, w której dochodzi do ich acetylacji przez transferazy N-acetyłowe tworząc kwasy merkapturowe (**Ryc. 7**) [130]. Ostatecznie kwasy merkapturowe izotiocyanianów są akumulowane w moczu.



Ryc. 7. Szlak kwasów merkapturowych [130]

### 1.5.3 IZOTIOCYJANIANY – WŁAŚCIWOŚCI ANTYKARCYNOGENNE

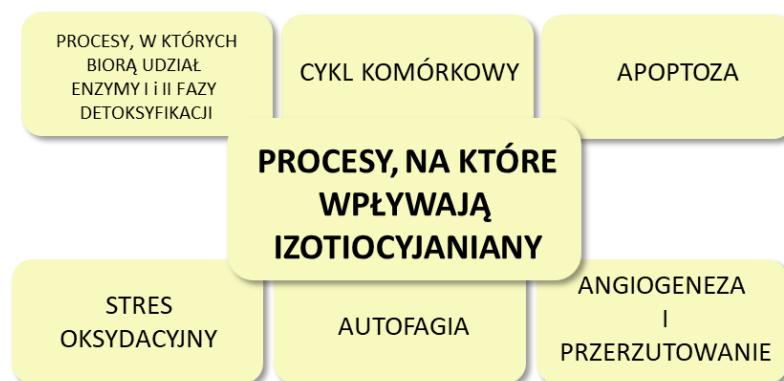
Zdolności izotiocyanianów do hamowania indukowanej chemicznie karcynogenezy zostały odkryte już ponad 30 lat temu. Pierwszym izotiocyanianem, w przypadku którego rozpoznano właściwości antykarcynogenne był izotiocyanian  $\alpha$ -naftyłu (Ryc. 8). Od tego czasu właściwości te wykazano dla wielu izotiocyanianów zarówno naturalnych jak i syntetycznych.



Ryc. 8. Struktura izotiocyanianu  $\alpha$ -naftyłu

Przeciwnowotworowe działanie izotiocyanianów wykazano także w modelach zwierzęcych nowotworów indukowanych różnymi czynnikami karcynogennymi takimi jak: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, barwniki azowe, etioniny oraz

nitrozoaminy [130]. Przeciwnowotworowe właściwości izotiocyjanianów wynikają z ich wpływu na szereg białek (**Tab. 13**) oraz procesów takich jak: cykl komórkowy, apoptoza, autofagia oraz przerzutowanie i angiogeneza (**Ryc. 9**) [118, 131]. Poniżej pokrótce opisano wyżej wymienione procesy oraz wpływ izotiocyjanianów na nie.



**Ryc. 9.** Procesy, na które wpływają izotiocyjaniany [131]

### 1.5.3.1 HAMOWANIE ENZYMÓW I FAZY ORAZ INDUKCJA ENZYMÓW II FAZY PRZEZ IZOTIOCYJANIANY

Enzymy I oraz II fazy odgrywają istotną rolę w procesach detoksyfikacji. Enzymy te oddziałują z różnymi związkami chemicznymi, m.in.: toksynami czy karcynogenami wpływając na ich metabolizm. Ostatecznie doprowadzają do usuwania szkodliwych substancji z organizmu [118]. Zaburzenie równowagi pomiędzy enzymami I i II fazy może przyczynić się do rozpoczęcia karcynogenezy [119].

Enzymy I fazy sprawiają, iż związki o charakterze rakotwórczym na drodze wielu reakcji utleniania, redukcji oraz hydrolizy stają się bardziej hydrofilowe co zwiększa ich reaktywność, czego konsekwencją jest uszkodzanie przez te związki DNA komórek [121]. Najważniejszymi enzymami I fazy są enzymy cytochromu P450 (CYP450), które dezaktywują, ale w niektórych przypadkach aktywują prokarcynogeny do ich aktywnej formy [118]. Enzymy II fazy pełnią głównie rolę ochronną, wchodząc w interakcje z substancjami o charakterze prokarcynogennym. Powodują, że stają się one bardziej rozpuszczalne w wodzie, eliminując je tym samym z organizmu wraz z moczem [118, 121]. Najważniejsze enzymy II fazy to, m.in.: S-transferaza glutationowa, UDP-glukuronylotransferazy, sulfotransferazy, N-acetylotransferazy oraz reduktaza chinonowa [118].

Izotiocyjaniany są bezpośrednimi oraz bardzo silnymi inhibitorami enzymów I fazy [130]. Poprzez swoje działanie zmniejszają ich aktywność hamując tym samym aktywację



związków o charakterze karcynogennym. Z drugiej strony izotiocyjaniiny zwiększają aktywność enzymów II fazy, co powoduje wzmocnienie procesów detoksyfikacji. Wydaje się, że izotiocyjaniiny indukują enzymy fazy II na poziomie transkrypcji, poprzez *ARE* (ang. *antioxidant response element*; element odpowiedzi antyoksydacyjnej) w regionie 5' mRNA. Element odpowiedzi antyoksydacyjnej jest aktywowany przez wiązanie czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), który może być regulowany przez MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*; kinaza aktywowana mitogenami), PI3K i inne kinazy oraz induktory enzymów fazy II. Uwolnienie Nrf2 z białka opiekuńczego powoduje jego przemieszczanie się do jądra komórkowego czego konsekwencją jest indukcja transkrypcji enzymów fazy II. Ponieważ indukcja zachodzi na poziomie transkrypcji, mechanizm ten jest najbardziej skuteczny pod kątem działania chemoprewencyjnego [121].

Jednym z izotiocyjanianów, który moduluje działanie enzymów I oraz II fazy jest SFN. Wpływa on na hamowanie enzymów CYP2B, CYP3A2 i CYP1A2, jak również indukuje ekspresję reduktazy chinonowej oraz transferazy glutationowej [121]. AITC posiada zdolność do indukcji reduktazy chinonowej oraz transferazy *S*-glutationowej. Izotiocyjaniiny hamują również różne izoformy CYP450. BITC posiada zdolność do hamowania CYP450 2E1, natomiast SFN hamuje CYP450 1A2 [119].

### **1.5.3.2 HAMOWANIE CYKLU KOMÓRKOWEGO**

Na cykl komórkowy składają się cztery fazy: G1, S, G2 oraz M. Przed wejściem w cykl komórkowy komórki znajdują się w fazie spoczynku tzw. w fazie G0. Przejścia komórek do kolejnych faz są regulowane przez cykliny oraz kinazy cyklinozależne CDK (ang. *cyclin-dependent kinases*). Natomiast w hamowaniu działania kompleksów CDK uczestniczą inhibitory CDK – m.in. białka p21 oraz p27. Zarówno działanie kompleksów CDK jak również ich inhibitorów w komórkach nowotworowych ulega rozregulowaniu, co prowadzi do niekontrolowanych podziałów komórek [118].

Izotiocyjaniiny powodują hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, poprzez zmiany w ekspresji cykliny oraz kinaz. Wykazano, że zastosowanie 15  $\mu$ M SFN hamuje cykl komórkowy komórek linii ludzkiego raka okrężnicy HT29 w fazie G2/M poprzez aktywację białek p21 oraz Cdc2 [118]. Izotiocyjaniiny wpływają również na zmniejszenie stężenia białek uczestniczących w cyklu komórkowym - cykliny B1, Cdc25B czy Cdc25C [129]. Ponadto izotiocyjaniiny wiążąc się z mirkotubulami doprowadzają do zatrzymania cyklu komórkowego i ostatecznie apoptozy [118]. AITC poprzez wiązanie się z resztami

cysteinowymi  $\alpha$ -tubuliny (Cys127, Cys 347 i Cys 376) oraz  $\beta$ -tubuliny (Cys12, Cys239, Cys303 i Cys354) prowadzi do ich ubiquitynacji, a następnie degradacji, czego konsekwencją jest zahamowanie mitozy. BITC, PEITC oraz SFN hamują również polimeryzację tubuliny [131].

### 1.5.3.3 APOPTOZA

Apoptoza uważana jest za jeden z mechanizmów chroniących organizm przed rozwojem nowotworu [132]. Cechami charakterystycznymi komórek apoptotycznych są: kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA, kurczenie się komórek oraz tworzenie ciałek apoptotycznych. W regulacji tego procesu uczestniczy wiele białek. Do najważniejszych zalicza się: kaspazy, białka z rodziny Bcl2 (ang. *B-cell Lymphoma 2*; białko Bcl2), a także białko p53 [118]. Na skutek eliminacji komórek z uszkodzonym materiałem genetycznym apoptoza zapobiega nowotworzeniu [132]. W komórkach nowotworowych proces apoptozy ulega deregulacji, m.in. poprzez nadekspresję Bcl2 oraz obniżenie ekspresji p53. W ten sposób komórki nowotworowe unikają śmierci. Dlatego związki, które mogą modulować ekspresję białek zaangażowanych w apoptozę mogą być potencjalnymi środkami terapeutycznymi. Związkami takimi są izotiocyjaniiny [118].

Rola izotiocyjaniinów w indukowaniu apoptozy jest złożona. Izotiocyjaniiny oddziałują na wiele czynników związanych z tym procesem. (1) Rozregulowują transkrypcję białek biorących udział w apoptozie [118]. (2) Aktywują kaspazy 3, 8 oraz 9 [130]. (3) Zwiększają poziom białka Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*, białko Bax) oraz obniżają poziom białka Bcl-2 [115]. (4) Aktywują szlak JNK. (5) Wpływają na wzrost ekspresji białka p53 [132].

Wpływ izotiocyjaniinów na indukcję apoptozy po raz pierwszy został odkryty przez Yu i *wsp.* [130]. Wykazano wówczas, iż PEITC oraz izotiocyjaniin fenylometylu, izotiocyjaniin fenylobutyli, a także izotiocyjaniin fenyloheksylu wywołały apoptozę w komórkach linii raka szyjki macicy HeLa. Efekt był zależny od czasu inkubacji komórek ze związkiem oraz jego stężenia [130]. W innym badaniu wykazano, iż SFN indukuje apoptozę w komórkach raka prostaty poprzez aktywację kaspaz, ERK1/2 (ang. *extracellular signaling-regulated kinase*; kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym) i Akt oraz zwiększenie ekspresji białka p53, a także Bax. Indukcję apoptozy obserwowano również w rdzeniakach oraz komórkach nowotworowych trzustki [133]. PEITC natomiast w komórkach linii HT-29 zwiększa aktywność kaspazy 3 oraz 9 [134]. Xu i *wsp.* wykazali natomiast, że SFN, PEITC oraz AITC zmniejszają żywotność

komórek linii raka prostaty PC-3 poprzez indukcję apoptozy. W badaniu tym stwierdzono wzrost poziomu fosforylacji następujących kinaz: ERK1/2 oraz JNK1/2 (ang. *c-Jun N-terminal kinase*; kinaza c-Jun N-terminalna). Wzrost poziomu fosforylacji wyżej wymienionych kinaz skutkowało wzrostem ekspresji białka AP-1 (ang. *activator protein 1*; białko aktywujące 1) które odgrywa ważną rolę w wielu procesach, w tym również apoptozie regulując transkrypcję genów kodujących białka prozapalne i immunomodulacyjne [135, 136].

#### **1.5.3.4 STRES OKSYDACYJNY**

Izotiocyjaniiny mogą prowadzić do śmierci komórek nowotworowych poprzez podwyższoną produkcję ROS (ang. *reactive oxygen species*; reaktywnych form tlenu). Dwa najbardziej popularne mechanizmy działania izotiocyjaniinów, odpowiadające za podwyższanie poziomu ROS i prowadzące do hamowania proliferacji komórek nowotworowych to zmniejszenie stężenia wewnątrzkomórkowego GSH oraz obniżenie ekspresji czynników transkrypcyjnych białek swoistości (Sp) oraz ich genów [118].

GSH to wewnątrzkomórkowy tiol, który chroni komórki przed ROS w postaci nadtlenków oraz wolnych rodników. Izotiocyjaniiny nasilają stres oksydacyjny prowadząc do zubożenia puli glutationu w komórce. Wykazano, iż BITC oraz PEITC prowadzą do obniżenia ilości glutationu w komórce w sposób dawko-zależny. W badaniu tym stwierdzono, iż izotiocyjaniiny już po pierwszych 3h inkubacji doprowadzają do obniżenia puli GSH i spada on cały czas aż do 6h inkubacji komórek ze związkami. Między 6 a 12h inkubacji komórek z izotiocyjaniinami dochodzi do podwyższenia ilości GSH w komórce, porównywalnej do ilości wyjściowej. Natomiast po upływie 12h następuje ponowny spadek ilości GSH w komórkach [137].

Czynniki transkrypcyjne białek swoistości Sp są m.in. zaangażowane w proliferację komórek, angiogenezę oraz oporność na terapeutyki. Podwyższony poziom ekspresji tych białek występuje w wielu nowotworach i wskazuje on na złe rokowanie dla pacjenta. Istotność obniżenia ekspresji białek Sp została przedstawiona w jednym z badań, gdzie obniżenie ekspresji białek Sp1, Sp3 oraz Sp4 w liniach komórkowych raka piersi, nerek, trzustki, płuc, a także okrężnicy poprzez izotiocyjaniiny spowodowało hamowanie proliferacji komórek nowotworowych, promowało apoptozę oraz zapobiegało inwazji oraz migracji komórek nowotworowych do odległych narządów [138-140].

### **1.5.3.5 AUTOFAGIA**

Autofagia to proces w trakcie którego dochodzi do degradacji uszkodzonych i wadliwych składników komórek. Jest on niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Autofagia występuje podczas narażania komórek na warunki stresowe takie jak: niski poziom tlenu czy akumulacja wadliwych organelli oraz białek. W przypadku rozwoju nowotworów autofagia może hamować transformację komórek poprzez usuwanie wadliwych organelli lub prowadzić do progresji nowotworów poprzez sprzyjanie przeżyciu oraz proliferacji komórek nowotworowych w warunkach hipoksji. Czynniki zdolne do hamowania tego procesu mogą znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej [118].

Izotiocyjaniiny mogą indukować autofagię dzięki czemu chronią komórki przed transformacją komórek do komórek nowotworowych lub mogą prowadzić do śmierci komórek w zależności od typu nowotworu oraz stadium zaawansowania. Ekspozycja komórek raka prostaty na BITC wywołuje autofagię poprzez hamowanie szlaku mTOR lub akumulację ROS. Ponadto stwierdzono również, iż hamowanie autofagii przez BITC nasila apoptozę komórek nowotworowych [141, 142]. W przypadku komórek raka piersi poddanych działaniu BITC dochodzi do autofagii w wyniku zwiększonej ekspresji białka FOXO1. Kwas merkapturowy SFN – SFN-NAC obniża ekspresję tubuliny w komórkach glejaka na skutek indukcji autofagii oraz aktywacji ERK1/2, co skutkuje hamowaniem cyklu komórkowego, czego następstwem jest hamowanie proliferacji komórek nowotworowych [143, 144].

### **1.5.3.6 WŁAŚCIWOŚCI ANTYANGIOGENNE ORAZ PRZECIWPRZERZUTOWE**

Przerzutowanie to proces podczas którego komórki nowotworowe tracą zdolność do adhezji, a następnie zasiedlają odległe narządy, gdzie dochodzi do ich proliferacji. W czasie przerzutowania ogromną rolę odgrywają metaloproteinazy – MMP (ang. *matrix metalloproteinases*; metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej), które biorą udział w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej: kolagenu, laminy oraz fibronektyny, przyczyniając się w ten sposób do migracji komórek. Ponadto dochodzi wówczas do uwolnienia czynników wzrostu, które oddziałują na komórki [145, 146].

Angiogeneza, podobnie jak przerzutowanie, jest procesem wieloetapowym, który rozpoczyna się od destabilizacji istniejących naczyń krwionośnych, następnie dochodzi do degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej. W kolejnym etapie komórki śródbłonna migrują, proliferują, a na końcu dochodzi do formowania i stabilizowania nowych naczyń

krwionośnych w obrębie guza. Angiogeneza jest regulowana przez cząsteczki takie jak: MMP czy integryny, jednak najintensywniej badanym czynnikiem proangiogenym jest VEGF. Utrata równowagi pomiędzy czynnikami proangiogenym a czynnikami antyangiogenymi odgrywa podstawową rolę w neoangiogenezie guzów nowotworowych. Neoangiogeneza guzów nowotworowych jest niezwykle istotnym procesem progresji oraz rozwoju guzów. W miarę wzrostu guza rośnie zapotrzebowanie komórek nowotworowych na składniki odżywcze oraz tlen, które są doprowadzane do guza poprzez naczynia krwionośne. W związku z powyższym tworzenie nowych naczyń krwionośnych w obrębie guza istotnie przyczynia się do jego wzrostu, a także inwazji oraz przerzutowania komórek nowotworowych [145, 147-149].

Izotiocyjaniiny wpływają na regulację zarówno procesu przerzutowania, jak i angiogenezy poprzez oddziaływanie na szlaki sygnałowe p38/MAPK oraz mTOR [150-152]. Związki te prowadzą również do zmniejszenia ekspresji VEGF, NF- $\kappa$ B (ang. *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*; czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B), białka AP-1 oraz MYC (ang. *Master Regulator of Cell Cycle Entry and Proliferative Metabolism*; główny regulator wejścia w cykl komórkowy i metabolizmu proliferacyjnego). Poddanie ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) działaniu AITC oraz PEITC powodowało obniżenie stężenia VEGF oraz cytokin prozapalnych: IL-1 (ang. *interleukin 1*; interleukina 1), IL-6 (ang. *interleukin 6*; interleukina 6) oraz TNF  $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ; czynnik martwicy nowotworów). Zauważono również zwiększenie stężenia IL-2 (ang. *interleukin 2*; interleukina 2) oraz TIMP (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*; inhibitorów metaloproteinaz), co zapobiegało migracji, inwazji oraz tworzeniu nowych naczyń krwionośnych. Ponadto SFN obniża stężenia białek HIF-1 oraz VEGF. Izotiocyjaniiny wpływają również na regulację procesu EMT. Sulforafan poprzez wpływ na szlaki sygnałowe PI3K/Akt oraz p38/ERK/JNK/MAPK hamuje EMT w komórkach nowotworowych tarczycy. W wyniku działania SFN na komórki nowotworowe dochodzi także do obniżenia poziomu E-kadheryny, MMP-2 oraz MMP-9, które biorą udział w przejściu EMT [152, 153].

**Tab. 13.** Białka, na które wpływają izotiocyjaniany [131]

<b>BIAŁKA, KTÓRYCH EKSPRESJA ULEGA PODWYŻSZENIU</b>	<b>BIAŁKA, KTÓRYCH EKSPRESJA ULEGA OBNIŻENIU</b>
kaspaza 3 oraz 9	cyklina A, B
p-Bcl-2	Cdc25C
p27	$\alpha$ -tubulina, $\beta$ - tubulina
JNK	surwiwina
kompleks cyklinaB1- Cdk1	Cox-2, PGE2
	VEGF
	EGFR

Ostatnie lata przyniosły wiele prac, w których badano opisane powyżej właściwości antykarcynogenne izotiocyjanianów. Dzięki temu wiemy w jaki sposób izotiocyjaniany oddziałują na komórki nowotworowe. Nie ma jednak zbyt wielu prac, w których przebadano zależność pomiędzy aktywnością izotiocyjanianów a ich strukturą chemiczną – SAR (ang. *Structure-Activity Relationship*; zależność struktura-aktywność). W ciągu ostatnich kilku lat w naszym zespole podjęto się badań dotyczących zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną izotiocyjanianów zawierających w swojej strukturze fosfor. Badania te pozwoliły na opracowanie nowych sposobów syntezy izotiocyjanianów oraz ustalenie pewnych zależności dotyczących SAR tychże izotiocyjanianów, które opublikowano w kilku międzynarodowych czasopismach [154-157]. W niniejszej pracy podjęto się natomiast syntezy oraz przebadania izotiocyjanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów z kilku względów. (1) Powszechnie badane ITC, jak np. BITC, PEITC oraz AITC są biosynteżowane z aminokwasów, więc synteza ITC będących pochodnymi estrów aminokwasów to niejako krok wstecz w biosyntezie naturalnych ITC. Badanie tego typu związków pozwala na ocenę w pewnym sensie „niewykończonych” ITC. (2) Wybór aminokwasów pozwala na jednoczesną ocenę dwóch ważnych aspektów, tj. wpływu podstawnika na atomie  $\alpha$  oraz wpływu obecności grupy estrowej oraz typu tej grupy na aktywność biologiczną ITC np. czy obecność dużych grup (jak w Phe) nie generuje zawady sterycznej, która utrudniałaby oddziaływanie ITC z ich celami molekularnymi. (3) Ponadto taka grupa związków nigdy wcześniej nie została tak kompleksowo przebadana, co stanowi dodatkowy wkład do zrozumienia SAR dla ITC.

---

## 2. CEL PRACY

---

Tematyka przedstawiona w niniejszej pracy dotyczy przede wszystkim aktywności biologicznej syntetycznych izotiocyanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów wobec komórek linii raka pęcherza moczowego, z uwzględnieniem korelacji pomiędzy aktywnością związków a ich strukturą chemiczną. Ponadto w niniejszej dysertacji pochyłono się nad zagadnieniami związanymi z lekoopornością nowotworów pęcherza moczowego.

Hipoteza niniejszej pracy zakłada, iż struktura chemiczna izotiocyanianów ma wpływ na ich aktywność biologiczną. W związku z tym celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było:

- ❖ wyprowadzenie lekoopornych linii komórkowych raka pęcherza moczowego na obecnie stosowane w terapii cytostatyki oraz ich charakterystyka molekularna
- ❖ zsyntetyzowanie zestawu strukturalnie zróżnicowanych izotiocyanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów
- ❖ ocena aktywności biologicznej zsyntetyzowanych izotiocyanianów wobec komórek linii raka pęcherza moczowego





---

## 3. MATERIAŁY I METODY

---

### 3.1 WYKORZYSTANE LINIE KOMÓRKOWE ORAZ ICH HODOWLA

W przeprowadzonych eksperymentach *in vitro* wykorzystano następujące

1. ludzkie linie raka pęcherza moczowego:

- ❖ UM-UC-3 (*ATCC* (ang. *American Type Culture Collection*; Amerykańska Kolekcja Kultur); Rockville, USA)
- ❖ RT-112 (*RCCL* (ang. *The Resistant Cancer Cell Line Collection*; Kolekcja Opornych Nowotworowych Linii Komórkowych); Frankfurt nad Menem, Niemcy)
- ❖ TCC-SUP (*RCCL*; Frankfurt nad Menem, Niemcy)
- ❖ KU-19-19 (*DSMZ* (niem. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*; Niemeicki Zbiór Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych); Braunschweig, Niemcy)
- ❖ HT-1376 (*DSMZ*; Braunschweig, Niemcy)
- ❖ 5637 (*RIKEN BRC* (ang. *BioResource Center*; centrum biozasobów) Cell Bank; Ibaraki, Japonia),

2. ludzkie linie raka pęcherza moczowego odporne na cisplatynę (CDDP):

- ❖ UM-UC-3<sup>CDDP</sup> (linia komórkowa wyprowadzona w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej IITD PAN z linii UM-UC-3 – rozdział 3.2)
- ❖ RT-112<sup>CDDP</sup> (*RCCL*; Frankfurt nad Menem, Niemcy)
- ❖ TCC-SUP<sup>CDDP</sup> (*RCCL*; Frankfurt nad Menem, Niemcy),

3. ludzkie linie raka pęcherza moczowego odporne na winblastynę (VBL):

- ❖ UM-UC-3<sup>VBL</sup> (linia komórkowa wyprowadzona w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej IITD PAN z linii UM-UC-3 – rozdział 3.2)
- ❖ RT-112<sup>VBL</sup> (*RCCL*; Frankfurt nad Menem, Niemcy)
- ❖ TCC-SUP<sup>VBL</sup> (*RCCL*; Frankfurt nad Menem, Niemcy),

4. ludzkie linie raka pęcherza moczowego odporne na gemcytabinę (GEM):

- ❖ UM-UC-3<sup>GEM</sup> (linia komórkowa wyprowadzona w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej IITD PAN z linii UM-UC-3 – rozdział 3.2)
- ❖ RT-112<sup>GEM</sup> (*RCCL*; Frankfurt nad Menem, Niemcy)
- ❖ TCC-SUP<sup>GEM</sup> (*RCCL*; Frankfurt nad Menem, Niemcy),

5. ludzkie linie raka pęcherza moczowego odporne na cisplatynę oraz gemcytabinę:

- ❖ UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> (linia komórkowa wyprowadzona w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej IITD PAN z linii UM-UC-3 – rozdział 3.2)
- ❖ RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> (RCCL; Frankfurt nad Menem, Niemcy)
- ❖ TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> (RCCL; Frankfurt nad Menem, Niemcy).

Wszystkie wymienione powyżej linie komórkowe hodowano w medium hodowlanym: DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; podłoże hodowlane; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) z 10% FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*; bydlęca surowica płodowa; GE Healthcare HyClone, Logan, USA), 2 mM L-Gln (L-glutamina) (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) oraz antybiotykami: streptomycyna 100 µg/mL, penicylina 100 U/mL (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska). Ponadto media linii lekoopornych zawierały dodatkowo odpowiednie cytostatyki: cisplatynę (Ebewe, Unterach nad Attersee, Austria) w stężeniu 2,5 µg/ml dla linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, 1 µg/ml dla linii RT-112<sup>CDDP</sup> oraz TCC-SUP<sup>CDDP</sup>, gemcytabinę (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) w stężeniu 500 nM dla linii UM-UC-3<sup>GEM</sup>, 75 nM dla linii RT-112<sup>GEM</sup> oraz TCC-SUP<sup>GEM</sup>, winblastynę w stężeniu 5 nM dla linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>, 20 nM dla linii RT-112<sup>VBL</sup> oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup> (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska).

Linie komórkowe hodowano w plastikowych butelkach hodowlanych przeznaczonych do hodowli komórek adherentnych (TC-treated; Sarstedt, Newton, NC, USA) w 37°C, wilgotnej atmosferze nasyconej 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Wszystkie linie komórkowe pasażowano jałowo w komorze laminarnej, dwa razy w tygodniu przy użyciu trypsynowersenu (pH=8; Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN Wrocław).

### 3.2 WYPROWADZENIE LINII KOMÓREK OPORNYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO NA WYBRANE CYOSTATYKI Z LINII KOMÓRKOWEJ UM-UC-3

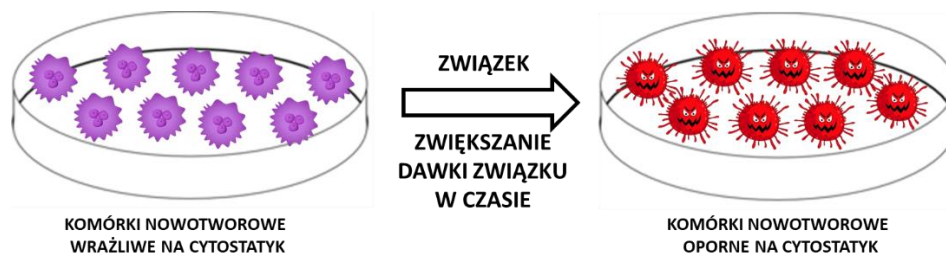
Cztery linie komórkowe raka pęcherza moczowego odporne odpowiednio na: cisplatynę, gemcytabinę, winblastynę oraz linia komórkowa oporna łącznie na cisplatynę oraz gemcytabinę zostały wyprowadzone z linii komórkowej UM-UC-3. Linie te zostały wyprowadzone poprzez stałą hodowlę w medium hodowlanym zawierającym odpowiednie stężenie cytostatyku. Komórki pasażowano dwa razy w tygodniu z użyciem medium wolnego od cytostatyku, a następnego dnia po pasażu do każdej z hodowli dodawany był cytostatyk w odpowiednim stężeniu. Stężenie cytostatyków było zwiększane w czasie (*Tab. 14*). Oporność komórek wyprowadzanych linii na cytostatyki była regularnie sprawdzana za pomocą testu SRB (szczegóły jego wykonania znajdują się w rozdziale 3.3.1), a następnie obliczano RI (*ang. Resistance Index*; indeks oporności). Linie uznano za odporne po ustabilizowaniu się parametru RI.

$$\text{Resistance Index (RI)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ linii odpornej}}{\text{IC}_{50} \text{ linii wrażliwej}}$$

*Tab. 14. Stosowane stężenia cytostatyków w trakcie wyprowadzania lekoopornych linii komórkowych raka pęcherza moczowego*

CZAS CYTOSTATYK	CZAS					
	MIESIĄC 0	MIESIĄC 3	MIESIĄC 5	MIESIĄC 7	MIESIĄC 9	MIESIĄC 12
CISPLATYNA (CDDP)	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml
GEMCYTABINA (GEM)	10 nM, 20 nM	40 nM, 60 nM	125 nM, 250 nM	250 nM, 500 nM	500 nM	500 nM
WINBLASTYNA (VBL)	0,1 nM	0,5 nM	1 nM	2 nM	5 nM	5 nM
CISPLTYNA ORAZ GEMCYTABINA (CDDP/GEM)	Gemcytabinę zaczęto dodawać w 9 miesiącu wyprowadzania linii UM-UC-3 gdy stężenie cisplatyny wynosiło 2,5 µg/ml				2,5 µg/ml CDDP + 500 nM GEM	2,5 µg/ml CDDP + 500 nM GEM

Ostatecznie otrzymano następujące linie komórkowe: UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, UM-UC-3<sup>VBL</sup>, UM-UC-3<sup>GEM</sup>, oraz UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup>. Linie te zostały zbankowane w banku linii komórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. W kolejnym etapie wykonano szereg doświadczeń pozwalających na scharakteryzowanie otrzymanych linii komórkowych (rozdział 3.3).



Ryc. 10. Schemat wyprowadzenia linii lekoopornych raka pęcherza moczowego

Cytostatyki używane do wyprowadzenia linii opornych:

- ❖ Cisplatyna - roztwór *ready-to-use* (1 mg/ml), przechowywany w temperaturze pokojowej (Ebewe, Unterach nad Attersee, Austria)
- ❖ Winblastyna - 50 mM roztwór w DMSO (ang. *dimethylsulfoxide*; dimetylosulfotlenek; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w  $-80^{\circ}\text{C}$  (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ Gemcytabina - 50 mM roztwór przygotowywany w wodzie do iniekcji bezpośrednio przed użyciem (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)

### **3.3 CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA KOMÓREK LINII LEKOOPORNYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO ORAZ LINII WRAŻLIWYCH (WYJŚCIOWYCH)**

We wszystkich opisanych poniżej testach charakteryzowano komórki 12 linii lekoopornych oraz 3 linii wrażliwych: UM-UC-3, RT-112 oraz TCC-SUP raka pęcherza moczowego. Wśród linii lekoopornych znajdują się linie odporne wyprowadzone z linii UM-UC-3 (rozdział 3.2): UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, UM-UC-3<sup>GEM</sup>, UM-UC-3<sup>VBL</sup>, UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> oraz linie odporne raka pęcherza moczowego otrzymane w ramach współpracy z The Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection: RT-112<sup>CDDP</sup>, TCC-SUP<sup>CDDP</sup>, RT-112<sup>CDDP/GEM</sup>, TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup>, RT-112<sup>GEM</sup>, TCC-SUP<sup>GEM</sup>, RT-112<sup>VBL</sup> oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup>.

#### **3.3.1 OPORNOŚĆ KRZYŻOWA KOMÓREK LINII LEKOOPORNYCH ORAZ LINII WRAŻLIWYCH NA ZWIĄZKI O ZRÓŻNICOWANYCH MECHANIZMACH DZIAŁANIA STOSOWANE W LECZENIU ONKOLOGICZNYM**

W teście oceniano wrażliwość komórek linii raka pęcherza moczowego: lekoopornych oraz wrażliwych na związki o zróżnicowanym mechanizmie działania oraz celach molekularnych stosowane w leczeniu onkologicznym (**Tab. 15**). Test ten przeprowadzono metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem sulforodaminy B (test SRB). Istotą tej metody jest zdolność wiązania się sulforodaminy B z zasadowymi aminokwasami białek komórkowych, a następnie tworzenie barwnych połączeń, absorbujących światło w zakresie 500-550 nm.

##### **3.3.1.1 MATERIAŁY**

- ❖ płytki 384-dołkowe do hodowli komórek adherentnych (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria)
- ❖ badane związki (**Tab. 15**)
- ❖ medium do testów O-R: medium hodowlane składające się z dwóch pożywek podstawowych RPMI 1640 oraz Opti-MEM zmieszanych w stosunku 1: 1
- ❖ 20% (w/v) kwas TCA (trójchlorooctowy) – (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska)
- ❖ 0,1% (w/v) SRB (sulforodamina B) - (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) w 1% kwasie octowym
- ❖ 1% (v/v) kwas octowy (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska)
- ❖ 10 mM TRIS tris(hydroksymetylo)aminometan (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska)

### 3.3.1.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA (TEST SRB)

- A. Komórki wysiano na płytki 384-dołkowe w gęstości  $1 \times 10^3$  komórek/dołek w 50  $\mu\text{l}$  medium hodowlanego.
- B. Następnego dnia po całonocnej inkubacji w  $37^\circ\text{C}$  i adhezji komórek do dna dołków płytki, komórki zostały poddane ekspozycji na związki (**Tab. 15**) w różnych stężeniach (co najmniej 8 stężeń; związki w każdym stężeniu testowano w 3 powtórzeniach technicznych).
- C. Po 72h inkubacji komórek ze związkami, w  $37^\circ\text{C}$ , w wilgotnej atmosferze nasyconej 5%  $\text{CO}_2$ , odebrano 50  $\mu\text{l}$  medium hodowlanego z każdego dołka, a następnie dodano 30  $\mu\text{l}$  20% (w/v) kwasu TCA.
- D. Po 40 minutach inkubacji komórek z kwasem TCA, płytki kilkakrotnie płukano pod bieżącą wodą, a następnie do każdego dołka dodano 20  $\mu\text{l}$  0,1% (w/v) barwnika SRB. Z roztworem SRB płytki inkubowano 30 minut.
- E. Po zakończeniu 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej niezwiązany barwnik został odpłukany za pomocą 1% (v/v) kwasu octowego, natomiast związany barwnik został rozpuszczony w 70  $\mu\text{l}$  10 mM TRIS.
- F. Całą procedurę wykonano przy użyciu stacji Biotek EL-406 (BioTek Instruments, USA). Absorbancję odczytano za pomocą czytnika Biotek Hybrid H4 (BioTek Instruments, USA) przy długości fali 540 nm, natomiast zahamowanie proliferacji (%Inh) obliczono według następującego wzoru:

$$\%Inh = \left[ \left( \frac{A_p - A_m}{A_k - A_m} \right) \times 100 \right] - 100$$

Gdzie :  $A_m$  – absorbancja medium hodowlanego (próba ślepa),  $A_k$  – absorbancja komórek traktowanych nośnikiem (kontrola),  $A_p$  – absorbancja komórek traktowanych związkiem.

Na podstawie obliczonych wartości %Inh wykreślana jest krzywa zależności efektu od stężenia badanego związku. Na osi X przedstawiane jest stężenie badanego związku w skali logarytmicznej, natomiast na osi Y zahamowanie proliferacji. Następnie wykreślana jest prosta odcięta przy 50% zahamowania proliferacji. Punkt przecięcia krzywej wyznaczonej doświadczalnie oraz linii 50%, to punkt z jakiego odczytuje się stężenie związku, przy którym nastąpiło 50% zahamowanie proliferacji komórek –  $\text{IC}_{50}$ . Na podstawie wartości  $\text{IC}_{50}$  uzyskanych z kolejnych powtórzeń testów obliczane jest średnie  $\text{IC}_{50}$  oraz 95% CI (ang. *confidence interval*; przedział ufności) [158]. Jako związek kontrolny zastosowano cisplatynę.

**Tab. 15.** Związki, ich postać oraz mechanizm działania, które były testowane podczas sprawdzania oporności krzyżowej panelu linii lekoopornych raka pęcherza moczowego oraz trzech linii wrażliwych

ZWIĄZEK (Źródło związku)	POSTAĆ	MECHANIZM DZIAŁANIA
BORTEZOMIB (selleckchem.com, Monachium, Niemcy)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Wybiórczy odwracalny inhibitor proteasomu. Hamuje czynność proteasomu 26S – degradującego białka z przyłączoną do nich ubikwityną [159].
CISPLATYNA (Ebewe, Unterach nad Attersee, Austria)	roztwór <i>ready-to-use</i> (1 mg/mL), przechowywany w temperaturze pokojowej	Kompleksy platyny reagują z DNA, tworząc wiązania krzyżowe w obrębie cząsteczki oraz pomiędzy cząsteczkami DNA. Skutkuje to powstaniem nieprawidłowych wiązań, zaburzeniem struktury DNA, przyczynia się do powstawania pęknięć w nici DNA oraz zakłóca syntezę DNA i RNA co uniemożliwia podział komórki [159].
DOKSORUBICZYNA (Accord Healthcare Polska, Warszawa, Polska)	roztwór <i>ready-to-use</i> (2 mg/mL), przechowywany w +4°C	Wbudowuje się w strukturę DNA, powodując jego rozerwanie oraz fragmentację. Prowadzi to do zahamowania replikacji DNA oraz uniemożliwia transkrypcję DNA na RNA [159].
GEMCYTABINA (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Hamuje syntezę DNA poprzez hamowanie aktywności reduktazy rybonukleotydowej [159].
IMATYNYB (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Lek został opracowany w celu leczenia chorych na przewlekłą białaczkę szpikową z obecnością chromosomu Philadelphia. Wykazuje dużą selektywność w stosunku do komórek zawierających chromosom Philadelphia [159].
KAMPTOTECZYNA (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Wiąże się z kompleksem topoiizomerazy I oraz z DNA, tworząc kompleks trójściadnikowy, stabilizuje go, zapobiegając ponownej ligacji DNA. Powoduje uszkodzenie DNA, które skutkuje apoptozą [160].
KOLCHICZYNA (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Wiąże się z mikrotubulami w metafazie podziału komórki, hamując ich polimeryzację, wpływając na wrzeciono kariokinetyczne. Zmniejsza ruchy i degranulację wewnątrzkomórkowych lizosomów i uwalnianie lizosomów, chemoatraktantów oraz kwasu mlekowego [153].
KOMBRETASTATYNA A4 (selleckchem.com Monachium, Niemcy)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Destabilizuje tubulinę wskutek przyłączenia się do jej podjednostki $\beta$ , co wywołuje apoptozę namnażających się komórek śródbłonna oraz posiada działanie cytotoksyczne [161].
PAKLITAKSEL (Cytoskeleton Inc., Denver, USA)	2 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Hamuje podziały komórkowe. Wiąże się z białkami uczestniczącymi w tworzeniu mikrotubul. Sprzyja powstawaniu mikrotubul i stabilizuje je hamując ich rozpad. Uniemożliwia to reorganizację mikrotubul, co prowadzi do zatrzymania mitozy [159].
TRICHOSTATYNA A (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Hamuje działanie deacetylazy histonowej oraz cykl komórkowy komórek eukariotycznych w początkowej fazie [162].
WINBLASTYNA (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Wiąże się z tubuliną prowadząc do zahamowania powstawania mikrotubul oraz zaburzeń powstawania wrzeciona podziałowego czego efektem jest zatrzymanie mitozy z fazy metafazy [163].
WINFLUNINA (selleckchem.com, Monachium, Niemcy)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Hamuje cykl komórkowy w fazie G2, poprzez zaburzenia w tworzeniu cytoszkieletu [164].
WINORELBINA (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)	50 mM roztwór w dimetylosulfotlenku (DMSO; Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska); przechowywany w -80°C	Hamuje podziały komórkowe poprzez wiązanie się z tubuliną oraz hamuje powstawanie mikrotubul. W większych stężeniach prowadzi do ich rozpadu. Uniemożliwia reorganizację mikrotubul

### **3.3.2 OZNACZENIE EKSPRESJI GENÓW ZWIĄZANYCH Z LEKOPORNOŚCIĄ W LIZATACH KOMÓRKOWYCH PANELU LINII LEKOOPORNYCH ORAZ WRAŻLIWYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO ZA POMOCĄ TECHNIKI REAL-TIME PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*)**

Metodą Real-Time PCR (PCR w czasie rzeczywistym) oceniono ekspresję wybranych genów charakterystycznych dla fenotypu lekoopornych komórek nowotworowych oraz związanych z agresywnym przebiegiem choroby nowotworowej, a także inwazyjnością komórek linii lekoopornych oraz wrażliwych raka pęcherza moczowego (**Tab. 16**). W tym celu wykonano lizaty komórkowe pochodzące z hodowli *in vitro*, a następnie przeprowadzono analizę ekspresji genów techniką Real-Time PCR. Technika ta pozwala na określenie ilości badanego genu w próbce za pomocą pomiaru fluorescencji. Do wizualizacji fluorescencyjnej wykorzystuje się barwniki interkalujące DNA np. SYBR Green lub sondy fluorescencyjne, tzn. znakowane fluorescencyjnie nukleotydy, które są komplementarne do badanej sekwencji. W metodzie opisywanej poniżej stosowano sondy fluorescencyjne typu TaqMan. Sondy te posiadają na końcu 5' barwnik tzw. reporter a na końcu 3' barwnik wygaszający. Dzięki takiej budowie sondy, które nie zostały przyłączone do cząsteczki DNA nie będą dawać fałszywego sygnału. Fluorescencja uzyskiwana jest dzięki aktywności 5'-3' polimerazy egzonukleazowej, która prowadzi do hydrolizy sondy [165].

#### **3.3.2.1 MATERIAŁY**

Do przygotowania lizatów komórkowych oraz izolacji RNA z tychże lizatów wykorzystano następujące materiały:

- ❖ 100-mm szalki Petriego (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- ❖ bufor fosforanowy PBS (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN Wrocław)
- ❖ TRI Reagent (Molecular Research Center; Cincinnati, USA)
- ❖ zestaw do izolacji RNA Total RNA Zol-Out™ (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska)

Do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji oraz reakcji Real-Time PCR wykorzystano następujące materiały:

- ❖ woda do biologii molekularnej DEPC (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ DNAza I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ❖ bufor DNAzy I + MgCl<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ❖ inhibitor RNaz (EURx, Gdańsk, Polska)
- ❖ 50 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)



- ❖ iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, USA)
- ❖ sondy TaqMan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (**Tab. 16**)
- ❖ TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ❖ płytki Real-Time PCR 96×0,1 ml typu fast (BIOplastics, Landgraaf, Holandia)

**Tab. 16.** Geny badane w lizatach komórkowych panelu linii lekoopornych raka pęcherza moczowego oraz linii wrażliwych za pomocą techniki Real-Time PCR

GEN	BIĄŁKO KODOWANE PRZEZ BADANY GEN	REF.	ASSAY ID
<b>ABCBI</b> (ang. <i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1</i> )	translokaza zależna od ATP	UniProt no. P08183	Hs00184500_m1
<b>ASS1</b> (ang. <i>Argininosuccinate Synthase 1</i> )	syntaza argininobursztynianu	UniProt no. P00966	Hs01597989_g1
<b>ATP7A</b> (ang. <i>ATPase Copper Transporting Alpha</i> )	ATPaza 1 transportująca miedź	UniProt no. Q04656	Hs00163707_m1
<b>dCK</b> (ang. <i>Deoxycytidine Kinase</i> )	kinaza deoksycytydynowa	UniProt no. P27707	Hs01040726_m1
<b>ECHDC1</b> (ang. <i>Ethylmalonyl-CoA Decarboxylase 1</i> )	dekarboksylaza etylomalonylo-CoA	UniProt no. Q9NTX5	Hs00929453_m1
<b>hENT1</b> (ang. <i>Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1</i> )	ludzki równoważny transporter nukleozydów 1	UniProt no. Q99808	Hs01085706_m1
<b>MT2A</b> (ang. <i>Metallothionein 2A</i> )	metalotioneina 2	UniProt no. P02795	Hs02379661_g1
<b>SAT1</b> (ang. <i>Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1</i> )	acetylotransferaza diaminowa 1	UniProt no. P21673	Hs00161511_m1
<b>SLC3A1</b> (ang. <i>Solute Carrier Family 3 Member 1</i> )	glikoproteina rBAT - podjednostka transportera aminokwasów nabłonka kanalików proksymalnych jelita cienkiego	UniProt no. Q07837	Hs00741015_m1
<b>TUBβ3</b> (ang. <i>Tubulin beta 3 Class III</i> )	β III-tubulina	UniProt no. Q13509	Hs00801390_s1

### 3.3.2.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA

#### Lizaty komórkowe:

- A. Około  $2 \times 10^6$  komórek wysiano na 100 mm szalki i inkubowano przez 24h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- B. Z szalek, na które zostały wysiane komórki odebrano medium, a następnie opłukano je trzykrotnie buforem PBS.
- C. Po opłukaniu szalek, do każdej dodano 1000 µl odczynnika TRI Reagent, a następnie zebrano je do probówek typu Eppendorf.
- D. W takiej formie zebrane próbki przechowywano w -80°C do dalszych analiz.

Izolacja RNA (postępowano według protokołu dołączonego do zestawu Total RNA Zol-Out™ (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska); w skrócie:

- A. Upřednio zebrane lizaty komórkowe rozmrożono i dodano do nich po 1000 µl 96% etanolu.
- B. Całość dokładnie wymieszano i naniesiono na minikolumny do izolacji RNA w trzech porcjach po około 700 µl. Po każdym naniesieniu jednej porcji mieszaniny, minikolumny wirowano 1 minutę, 10 000-12 000 RPM, a przesącz usuwano.
- C. Minikolumny przeniesiono do nowych próbek 2 ml, a następnie dodano po 700 µl roztworu płuczającego A1, wirowano 1 minutę, 10 000-12 000 RPM.
- D. Minikolumny wyjęto z próbek 2 ml, wylano przesącz i ponownie umieszczono w tych samych próbkach. Następnie dodano do nich po 200 µl roztworu płuczającego A1, wirowano 2 minuty, 10 000-12 000 RPM.
- A. Minikolumny umieszczono w nowych jałowych, wolnych od RNAz próbkach elucyjnych. Do złoza znajdującego się na dnie minikolumny dodano po 100 µl wody jałowej. Pozostawiano na 3 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie wirowano 1 minutę, 10 000-12 000 RPM. Minikolumny usunięto, a oczyszczone RNA znajdujące się w próbkach przechowywano w -80°C do dalszych analiz.

Odwrotna transkrypcja wyizolowanego RNA z zastosowaniem iScript cDNA Synthesis Kit:

- A. Czystość oraz stężenie wyizolowanego w poprzednim etapie RNA sprawdzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm za pomocą NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).
- B. Następnie w celu oczyszczenia próbek z gDNA (ang. *genomic DNA*; genomowe DNA) odpipetowano 1000 ng RNA i uzupełniono H<sub>2</sub>O DEPC do 9,5 µl oraz dodano po 3,5 µl mieszaniny składającej się z: DNAzy I, buforu DNAzy+MgCl<sub>2</sub> oraz inhibitora RNAz. Tak przygotowane próbki inkubowano w termocyklerze Verriti™ 9902 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA): w 37°C przez 15 minut.
- C. Po zakończonej inkubacji próbki wyjęto z termocyklera, do każdej dodano po 2 µl 50 mM EDTA i ponownie umieszczono w termocyklerze na 10 minut w temperaturze 65°C.
- D. Po 10 minutowej inkubacji w 65°C, próbki wyjęto na lód po czym dodano do każdej odwrotną transkryptazę oraz mieszaninę reakcyjną. Tak przygotowane próbki inkubowano w termocyklerze w następujących warunkach:
  - priming: 5 minut 25°C
  - odwrotna transkrypcja: 20 minut, 46°C

- inaktywacja odwrotnej transkryptazy: 1 minuta, 95°C

E. Po zakończeniu odwrotnej transkrypcji próbki przechowywano w -20°C.

Reakcja Real-Time PCR z zastosowaniem sond TaqMan:

- A. Do każdej reakcji PCR wykorzystano 50 ng cDNA. Każdą reakcję przeprowadzono w trzech powtórzeniach technicznych.
- B. Do przygotowanych próbek typu Eppendorf odpipetowano: wodę do biologii molekularnej DEPC, odpowiednią próbkę cDNA, TaqMan Gene Expression Master Mix oraz odpowiednią sondę typu TaqMan (**Tab. 16**).
- C. Z przygotowanych w ten sposób mieszanin reakcyjnych odpipetowano po 10 µl do dołka płytki reakcyjnej.
- D. Każdy cykl amplifikacji prowadzono w temperaturze 95°C przez 15 sekund, a następnie w temperaturze 60°C przez 1 minutę (łącznie 40 cykli) w systemie ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Jako gen referencyjny został wybrany gen *GAPDH* (ang. *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*; dehydrogenaza aldehydu 3-fosforanowego gliceryny).

Całą procedurę mającą na celu zbadanie ekspresji wybranych genów (**Tab. 16**) w panelu komórek 15 linii raka pęcherza moczowego wykonano wykorzystując lizaty komórkowe, pochodzące z trzech niezależnych pasaży. Wyniki tzn. względną ocenę ilościową (krotność zmiany) genów badanych obliczono w oparciu o  $\Delta\Delta C_t$  za pomocą programu DataAssist 3.01 oraz GraphPad Prism 7.03.

### **3.3.3 OZNACZANIE POZIOMU WYBRANYCH BIAŁEK W LIZATACH KOMÓRKOWYCH PANELU LINII LEKOOPORNYCH ORAZ LINII WRAŻLIWYCH RAKA PECHERZA MOCZOWEGO ZA POMOCĄ TECHNIKI WESTERN BLOT**

Celem oceny poziomu białek związanych m.in. z regulacją cyklu komórkowego, hamowaniem apoptozy lub będących wskaźnikami lekooporności (**Tab. 17**) komórek linii lekoopornych raka pęcherza moczowego przygotowano lizaty komórkowe pochodzące z hodowli *in vitro*, a następnie przeprowadzono analizę poziomu białek techniką western blot. Technika ta opiera się na denaturacji termicznej mieszaniny białek a następnie ich rozdziale w żelu poliakrylamidowym. Po rozdziale w żelu, białka są przenoszone na membrany nitrocelulozowe lub PVDF (ang. *polivinylidene difluoride*; polifluorek winylidenu) pod wpływem pola elektrycznego. Detekcja białek opiera się na użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko badanemu białku [166].

#### **3.3.3.1 MATERIAŁY**

Do przygotowania lizatów komórkowych oraz przeprowadzenia pomiaru stężenia białek w tychże lizatach wykorzystano następujące materiały:

- ❖ 100-mm szalki Petriego (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- ❖ bufor fosforanowy PBS (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN Wrocław)
- ❖ bufor RIPA (Sigma – Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ inhibitory fosfataz nr kat: P5726-5ML oraz P0044-5ML (Sigma – Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ inhibitory proteaz nr kat: P8340-5ML (Sigma – Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ zestaw do pomiaru stężenia białka w lizatach komórkowych - Pierce™ Coomassie Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Do zbadania poziomu wybranych białek (**Tab. 17**) za pomocą techniki western blot wykorzystano następujące materiały:

- ❖ żel poliakrylamidowy do prowadzenia elektroforezy, 4-12% Tris – Glycine
  - żel rozdzielający:
    - 30% akrylamid-bisakrylamid 37,5:1 (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy)
    - woda demineralizowana - dH<sub>2</sub>O (Roth, Warszawa, Polska)
    - 50% glicerol (VWR Life Sciences, Gdańsk, Polska)
    - bufor rozdzielający pH 8.8
      - 1,5 M Tris-Base (VWR Life Sciences, Gdańsk, Polska)
      - woda demineralizowana - dH<sub>2</sub>O (Roth, Warszawa, Polska)
      - pH buforu doprowadzono do wartości 8,8 przy użyciu stężonego HCl (POCH, Gliwice, Polska)

- 10% (w/v) APS (ang. *ammonium persulfate*; nadsiarczan amonu) (Merck, Warszawa, Polska)
- TEMED (ang. *tetrametyloetylenodiamina*; tetrametyloetylenodiamina) (Roth, Warszawa, Polska)
- żel zagęszczający
  - 30% akrylamid-bisakrylamid 37,5:1 (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy)
  - woda demineralizowana - dH<sub>2</sub>O (Roth, Warszawa, Polska)
  - bufor zagęszczający pH 6.8
    - 0,5 M Tris-Base (VWR Life Sciences, Gdańsk, Polska)
    - woda demineralizowana - dH<sub>2</sub>O (Roth, Warszawa, Polska)
    - pH buforu doprowadzono do wartości 6,8 przy użyciu stężonego HCl (POCH, Gliwice, Polska)
  - 10% APS (Merck, Warszawa, Polska)
  - TEMED (Roth, Warszawa, Polska)
- ❖ bufor do nanoszenia próbek:
  - bufor obciążający 5×LB (ang. *loading buffer*)
    - 50% glicerol (VWR Life Sciences, Gdańsk, Polska)
    - 2,5% (v/v) błękit bromofenolowy (POCH, Gliwice, Polska)
    - 10% (w/v) SDS (ang. *sodium dodecylsulfate*; dodecylosiarczan sodu) (Calbiochem, Warszawa, Polska)
    - 12,5% (v/v) 2,5 M Tris-HCl pH 6.8 (Roth, Warszawa, Polska)
  - 1:5 (v/v) β-merkaptoetanol w stosunku do buforu obciążającego 5x LB (Calbiochem, Warszawa, Polska)
  - PBS
    - 10 mM fosforan sodu (POCH, Gliwice, Polska)
    - 137 mM NaCl (VWR Life Sciences, Gdańsk, Polska)
    - 2,7 mM KCl (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)
- ❖ uprzednio przygotowane lizaty komórkowe
- ❖ wzorce masy: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder nr kat. 26630; Pierce™ Presteined Protein MW Marker nr kat. 26612 (ThermoFisher Scientific, Warszawa, Polska)
- ❖ bufor do elektroforezy 10×:
  - 250 mM Tris-Base (VWR Life Sciences, Gdańsk, Polska)
  - 1,92 M glicyna (Roth, Warszawa, Polska)
  - 3,5 mM SDS (Applichem, Legnica, Polska)

- ❖ 0,1% bufor TBST:
  - bufor TBS
    - 20 mM Tris-base (VWR Life Sciences, Gdańsk, Polska)
    - 13,7 mM NaCl pH 7.6 (VWR Life Sciences, Gdańsk, Polska)
  - 0,1% Tween-20 (Sigma Aldrich)
- ❖ bufor do transferu:
  - 25 mM Tris-base (VWR Life Sciences, Gdańsk, Polska)
  - 192 mM glicyna (Roth, Warszawa, Polska)
  - 20% metanol (POCH, Gliwice, Polska)
- ❖ bibuły do transferu Whatman GB003 (GE Healthcare, Warszawa, Polska)
- ❖ membrana nitrocelulozowa 0,45  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ❖ roztwór blokujący: 5% roztwór mleka odtłuszczonego (Mlekovita, Wysokie Mazowieckie, Polska) w buforze TBST
- ❖ przeciwciała pierwszorzędowe (*Tab. 17*)
- ❖ przeciwciała drugorzędowe:
  - mysie przeciwciało przeciw króliczym IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową A6154 (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
  - królicze przeciwciało przeciw mysim IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową M7023 (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ chemiluminescencyjny substrat peroksydazy WestPico (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

**Tab. 17.** Białka badane w lizatach komórkowych w panelu linii lekoopornych raka pęcherza moczowego oraz linii wrażliwych za pomocą techniki western blot

<b>BIAŁKO</b>	<b>PRZECIWCIAŁO</b>	<b>Nr katalogowy</b>	<b>Rozcieńczenie</b>
<b>aktyna</b>	Mysie przeciwciało IgG - anty <b>β-aktyna</b>	MA5-15739 (Invitrogen)	1:4 000
<b>GAPDH</b> (ang. <i>Glyceraldehyde 3- Phosphate Dehydrogenase</i> )	Mysie przeciwciało IgG anty- <b>GAPDH</b>	MA5-15738 (Invitrogen)	1: 2 000
<b>ABCB1</b> (ang. <i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1</i> )	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>MDR1/ABCB1</b>	13342S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b>ASS1</b> (ang. <i>Argininosuccinate Synthase 1</i> )	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>ASS1</b>	70720S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b>βIII tubulina</b>	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>βIII tubulina</b>	5568S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b>β-tubulina</b>	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>β- tubulina</b>	2146S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b>cyklina B1</b>	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>Cyklina B1</b>	4138S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b>Eg5</b>	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>Eg5</b>	14404S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b>MCL1</b> (ang. <i>Myeloid Leukemia 1</i> )	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>Mcl-1</b>	94296S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b>p21</b>	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>p21</b>	2947S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b>p27</b>	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>p27</b>	3686S (Cell Signaling Technology)	1:1 000

### 3.3.3.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA

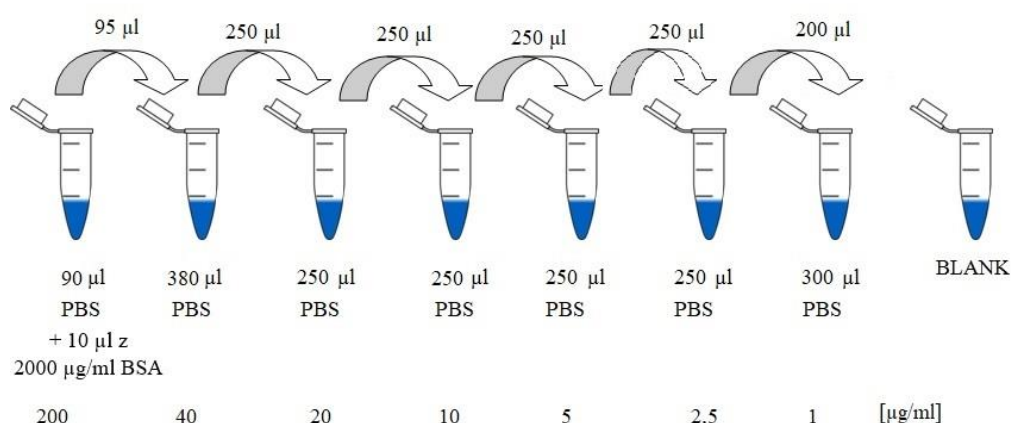
#### Lizaty komórkowe:

- B. Około  $2 \times 10^6$  komórek wysiano na 100 mm szalki i inkubowano przez 24h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- C. Z szalek, na które zostały wysiane komórki odebrano medium, a następnie opłukano je trzykrotnie buforem PBS.
- D. Po opłukaniu szalek, do każdej z nich dodano 100 μl buforu RIPA z 100× rozcieńczonymi inhibitorami.
- E. Komórki zebrano z szalek skrobaczką do kultur komórkowych i przeniesiono do probówek typu Eppendorfa.
- F. Zebrane w ten sposób komórki inkubowano na lodzie przez 15 minut.
- G. Po upływie 15 minut próbki zwirowano w następujących warunkach: 10 minut, 10 000 g, 4°C.

- H. Supernatant przeniesiono do nowej probówki i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz.
- I. Lizaty komórkowe zbierano z hodowli komórkowych pochodzących z trzech niezależnych pasaży.

Pomiar stężenia białka w lizatach komórkowych za pomocą zestawu Pierce™ Coomassie Plus:

- A. Przygotowano krzywą standardową – rozcieńczenia standardu BSA (ang. Bovine Serum Albumin; surowicza albumina wołowa w PBS o następujących stężeniach: 200; 40; 20; 10; 5; 2,5 oraz 1  $\mu\text{g/ml}$  (uwzględniono również próbkę ślepą (BLANK); **Ryc. 11**).
- B. Następnie przygotowano następujące rozcieńczenia: 800 $\times$ , 1600 $\times$ , 3200 $\times$ , 6400 $\times$  próbek badanych w PBS.
- C. Zarówno krzywą standardową jak i próbki badane nałożono w objętości 90  $\mu\text{l}$  na płytkę 96-dołkową, a następnie do każdego dołka, w którym znajdowała się krzywa standardowa lub próbka badana dodano po 90  $\mu\text{l}$  odczynnika Coomassie Plus.
- D. Tak przygotowane próbki na płytce 96-dołkowej inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie dokonano odczytu absorbancji przy długości fali 595 nm.
- E. Stężenia białka w próbkach badanych obliczono na podstawie równania otrzymanej dla krzywej standardowej. Wyniki analizowano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc).



**Ryc. 11.** Schemat przygotowania rozcieńczeń BSA do krzywej standardowej



### Western blot

#### Elektroforeza w żelu:

- A. Lizaty komórkowe rozmrożono i przygotowano próbki do rozdzielania elektroforetycznego w warunkach redukujących. Na studzienkę nanoszono próbki w których całkowita ilość białka wynosiła 25 µg. Do próbek dodano bufor LB z dodatkiem β-merkaptoetanolu oraz PBS tak aby całkowita objętość próbki wynosiła 20 µl/studzienkę.
- B. Próbki inkubowano w 100°C przez 5 minut w bloku grzeijnym.
- C. Na uprzednio przygotowany żel poliakrylamidowy (4-12%) naniesiono po 20 µl próbek oraz 5 µl wzorców mas.
- D. Elektroforezę prowadzono w następujących warunkach: 120V (stałe), 60-120 mA, 15 minut.; 150V (stałe), 100-200 mA, 75-90 minut do momentu gdy czoło elektroforezy znalazło się ok. 1 cm od dolnej krawędzi żelu.
- E. Żel po zakończonej elektroforezie moczo w buforze do transferu.

#### Transfer na membranę oraz inkubacja membrany z przeciwciałem:

- A. Bibuły, gąbki oraz membranę nitrocelulozową umieszczono w kuwetach wypełnionych buforem do transferu na ok. 15 minut.
- B. W aparacie służącym do przeprowadzenia transferu ułożono „kanapkę” w następującej kolejności: dwie gąbki, bibuła, membrana, żel, bibuła, dwie gąbki.
- C. Transfer prowadzono w aparacie przeznaczonym do transferu półsuchego (Cleaver Scientific, Rugby, UK) przez 35 minut, 200 mA/membranę.
- D. Po zakończonym transferze membranę nitrocelulozową umieszczono na 5 minut w buforze TBS, a następnie na 1h w roztworze blokującym, na kołyszce laboratoryjnej.
- E. Zablockowaną membranę płukano trzykrotnie przez 5 minut w buforze TBST.
- F. Po wypłukaniu membrany dodano roztwór przeciwciała I-rzędowego w 5% BSA w TBST (**Tab. 17**) i pozostawiono na noc w temperaturze 4°C na kołyszce laboratoryjnej.
- G. Po całonocnej inkubacji z przeciwciałem membranę płukano trzykrotnie przez 5 minut w buforze TBST.
- H. Następnie dodano przeciwciała II-rzędowe (mysie przeciwciała przeciw króliczemu IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową nr kat: A6154)

1:1000 w 5% BSA w TBST. Membranę z przeciwciałem II-rzędowym inkubowano przez 1h w temperaturze pokojowej.

- I. Po inkubacji membrany z roztworem przeciwciała, ponownie płukano ją trzykrotnie przez 5 minut w buforze TBST.
- J. Po zakończeniu ostatniego płukania membrany, przygotowano substrat chemiluminescencyjny, membranę z substratem inkubowano 5 minut.
- K. Odczytu chemiluminescencji dokonano za pomocą aparatu GelLogic 1500 (Carestream, Rochester, NY, USA).
- L. Po zakończonym odczycie membranę płukano trzykrotnie przez 10 minut w PBST, a następnie inkubowano z mysim przeciwciałem IgG anty  $\beta$ -aktyna lub mysim przeciwciałem IgG anty GAPDH (mysie przeciwciało IgG anty GAPDH było używane jako kontrola ładowania wyłącznie dla białka ASS1) w 0,5% odtłuszczonym mleku w PBST (dla anty  $\beta$ -aktyny) oraz w 0,5% odtłuszczonym mleku w TBST (dla anty GAPDH) przez 1h w temperaturze pokojowej.
- M. Po zakończonej inkubacji membranę ponownie płukano trzykrotnie przez 10 minut w PBST lub TBST i rozpoczęto inkubację z przeciwciałem II-rzędowym (królicze przeciwciało przeciw mysiemu IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową M7023) 1:2000 w 0,5% odtłuszczonym mleku w PBST oraz w 0,5% odtłuszczonym mleku w TBST (dla anty GAPDH) przez 1h w temperaturze pokojowej.
- N. Po upływie 1h, membranę płukano trzykrotnie przez 5 minut w PBST, a następnie dokonano odczytu chemiluminescencji po inkubacji z substratem za pomocą aparatu GelLogic 1500 (Carestream, Rochester, NY, USA).

Białkami będącymi kontrolą ładowania zostały wybrane  $\beta$ -aktyna oraz GAPDH.

Całą procedurę mającą na celu zbadanie poziomu wybranych białek w panelu 15 linii komórkowych raka pęcherza moczowego wykonano wykorzystując lizaty komórkowe pochodzące z trzech niezależnych pasaży. Densytometrię przeanalizowano w programie ImagJ, 1.8.0, następnie wykonano normalizację wyników do poziomu  $\beta$ -aktyny lub GAPDH (w przypadku białka ASS1) w MS Excel. Ostateczną analizę statystyczną oraz wykresy wykonano w programie GraphPad Prism 7.03.

### **3.3.4 OZNACZENIE ILOŚCI GLUTATIONU UTLENIONEGO I ZREDUKOWANEGO W KOMÓRKACH LINII LEKOOPORNYCH ORAZ WRAŻLIWYCH RAKA PECHERZA MOCZOWEGO**

W celu zbadania ilości glutationu utlenionego oraz zredukowanego w komórkach linii lekoopornych oraz wrażliwych raka pęcherza moczowego wykorzystano komercyjnie dostępny test GSH/GSSG-Glo™ assay (Promega GmbH, Walldorf, Niemcy). Działanie testu opiera się na zastosowaniu buforu zawierającego substrat o charakterze luminescencyjnym dla S-transferazy glutationowej (GST). W obecności glutationu enzym GST przekształca syntetyczny substrat w lucyferynę, której ilość jest określana luminometrycznie przy użyciu drugiego buforu dołączonego do zestawu testowego.

#### **3.3.4.1 MATERIAŁY**

- ❖ test GSH/GSSG-Glo™ assay nr kat. V6611 (Promega GmbH, Walldorf, Niemcy)
- ❖ woda MiliQ (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)
- ❖ płytki 96-dołkowe do hodowli komórek adherentnych (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- ❖ płytki 384-dołkowe do odczytu luminescencji, białe, LUMITRAC 200 (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria)

#### **3.3.4.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

Test przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, z drobnymi modyfikacjami, w skrócie:

- A. Komórki wysiano na płytce 96-dołkowej w liczbie  $2 \times 10^3$  komórek/dołek w objętości 100  $\mu$ l.
- B. Po 24h inkubacji komórek w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub> przygotowano odpowiednie bufony (**Tab. 18**) do pomiaru ilości glutationu całkowitego (Total Glutathione Lysis Reagent) oraz utlenionego (Oxidized Glutathione Lysis Reagent). Bufory przygotowano zgodnie z instrukcją producenta.
- C. Z płytek hodowlanych, w których znajdowały się komórki usunięto medium, a następnie dodano po 25  $\mu$ l odpowiednich buforów do odpowiednich dołeków płytki 96-dołkowej.
- D. Płytki w których znajdowały się bufony inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez około 10 minut.

**Tab. 18.** Składy buforów wykorzystywanych w teście GSH/GSSG-Glo™ assay

TOTAL GLUTATHIONE LYSIS REAGENT	OXIDIZED GLUTATHIONE LYSIS REAGENT
LuciferinNT	LuciferinNT
Passive Lysis Buffer 5x	Passive Lysis Buffer 5x
Woda MiliQ	25mM NEM
dCK	Woda MiliQ

- E. Po zakończonej inkubacji przygotowano odczynnik „Luciferin Generation Reagent” składający się z: 100 mM DTT (ang. *Dithiotreitol*; ditotretitol), S-transferazy glutationowej oraz Glutathione Reaction Buffer, a następnie dodano go po 25 µl do każdego dołka, w którym znajdowały się komórki wraz z jednym z buforów.
- F. Płytki, w których znajdowały się zarówno bufor jak i „Luciferin Generation Reagent” inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 45 minut.
- G. Po zakończonej inkubacji do każdego dołka płytki 24-dołkowej dodano po 50 µl Reconstitution Buffer i inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 15 minut.
- H. Po 15 minutach z każdego dołka płytki 24-dołkowej przeniesiono 80 µl roztworu na białą płytkę 384-dołkową celem odczytania luminescencji, która jest proporcjonalna do ilości glutationu w komórkach, za pomocą czytnika Biotek Hybrid H4 (BioTek Instruments, USA).

Wyniki normalizowano do zawartości białka określanego za pomocą testu SRB. Otrzymane w ten sposób dane analizowano za pomocą programów: MS Excel oraz GraphPad Prism 7.03.

### 3.4 SYNTEZA NOWYCH IZOTIOCYJANIANÓW (ITC)

#### 3.4.1 MATERIAŁY

- ❖ aminokwasy: alanina (Ala), fenyloalanina (Phe), fenyloglicyna (Phg), norwalina (Nva), norleucyna (Nle), leucyna (Leu), izoleucyna (Ile), kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA),  $\beta$ -alanina ( $\beta$ -Ala), glicyna (Gly), walina (Val), metionina (Met), kwas  $\alpha$ -aminomasłowy (Abu) oraz kwas 2-aminoizomasłowy (Aib)
- ❖ alkohole: metylowy (Me), etylowy (Et), izopropylowy (*i*Pr), butylowy (Bu), cykloheksylowy (Heks), benzylowy (Bzl)
- ❖ chlorek tionylu
- ❖ metanol
- ❖ eter dietylowy
- ❖ dichlorometan i nasycony roztwór wodorowęglanu sodu
- ❖ tiofosgen

Wszystkie odczynniki wymienione powyżej pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Poznań, Polska)

#### 3.4.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA

Synteza izotiocyjnianów przebiegła w II etapach:

##### I. synteza estrów:

- A. 1 eq aminokwasu zawieszono w odpowiednim alkoholu, a następnie powoli wkroplono 3 eq chlorku tionulu.
- B. Powstałą mieszaninę ogrzewano przez 3 godziny pod chłodnicą zwrotną.
- C. Lotne składniki usunięto na wyparce rotacyjnej, a pozostały osad/olej rozpuszczono w jak najmniejszej ilości metanolu i zalano eterem dietylowym.
- D. Mieszaninę umieszczono w lodówce do krystalizacji.
- E. Uzyskany osad przesączono na lejku ze spiekami otrzymując gotowy produkt.

##### II. synteza izotiocyjnianów:

- A. 1 eq otrzymanego estru aminokwasu (bez uprzedniego oczyszczenia) rozpuszczono w mieszaninie dichlorometanu i nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu (*v/v*, 1:1).
- B. Tak uzyskaną mieszaninę schłodzono w łaźni lodowej i intensywnie mieszano na mieszadle magnetycznym.
- C. Następnie bardzo powoli dodawano 1,3 eq tiofosgeny.
- D. Po wkropleniu roztwór pozostawiono do ogrzania.

E. Po 2 dniach mieszaninę reakcyjną przeniesiono do rozdzielacza, oddzielono warstwę organiczną. Następnie przemyto ją NaHCO<sub>3</sub> oraz solanką, po czym wysuszono przy użyciu MgSO<sub>4</sub> i odparowano otrzymując gotowy izotiocyanian.

Związki uzyskano w postaci mieszaniny racemicznej (jeśli dotyczy), której nie rozdzielono. Zsyntetyzowane izotiocyaniany w takiej postaci używano w testach aktywności biologicznej *in vitro*. Struktura wszystkich zsyntetyzowanych związków została scharakteryzowana za pomocą <sup>1</sup>H NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*; spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego). Widma NMR zostały zmierzone na spektrometrze Jeol ECZ 400S (400 MHz dla <sup>1</sup>H NMR) w roztworze CDCl<sub>3</sub>. Przesunięcia chemiczne (δ) wyrażono w ppm (parts per milion), stałe sprzężenia (*J*) wyrażono w Hz, natomiast multipletowość wyrażono jako: s = singlet, d = dublet, q = kwartet, dd = dublet dubletu, ddd = dublet dubletów dubletów, m = multiplet. Czystość określono za pomocą HPLC (ang. *high-performance liquid chromatography*; wysokosprawna chromatografia cieczowa) Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 UHPLC sprzężony ze spektrometrem mas Thermo Scientific™ ISQ EC. Wykorzystano kolumnę analityczną UPTISPHERE STRATEGY C18-HQ 5μm, 250 × 4.6mm oraz następujący program:

roztwór A - woda do LCMS z 0,05% kwasu mrówkowego

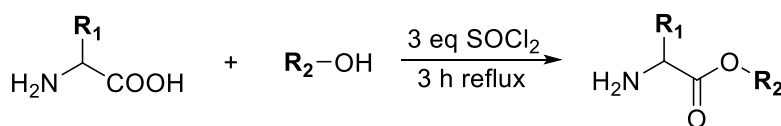
roztwór B - acetonitryl do LCMS z 0,05% kwasu mrówkowego

0-20 min - gradient od 5%-95% B

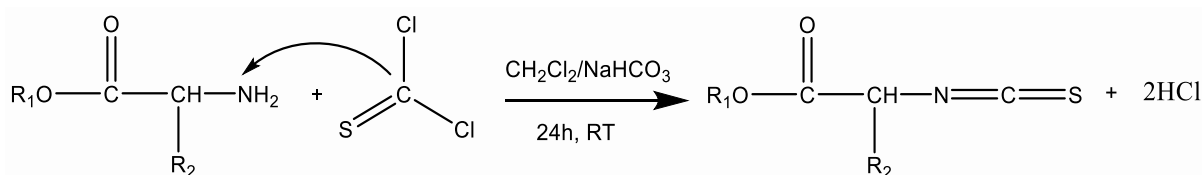
20-23 min - izokrata 95% B

23-26 min - gradient od 95%-5% B

26-30 min - izokrata 5% B



**Reakcja 1.** Ogólny schemat estryfikacji aminokwasów



**Reakcja 2.** Ogólny schemat syntezy izotiocyanianów

### **3.5 WSTĘPNA OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ ZSYNTEZOWANYCH IZOTIOCYJANIANÓW WOBEC KOMÓREK LINII RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO**

Wstępna ocena aktywności biologicznej zsyntezowanych izotiocyanianów polegała na zbadaniu aktywności antyproliferacyjnej zsyntezowanych 29 izotiocyanianów (opis syntezy izotiocyanianów - rozdział 3.4; lista zsyntezowanych izotiocyanianów – rozdział 4.2) oraz 3 izotiocyanianów dostępnych komercyjnie wobec komórek 18 linii raka pęcherza moczowego w tym również linii lekoopornych (rozdział 3.1).

Testy antyproliferacyjne wykonano stosując metodę SRB (rozdział 3.3.1).

#### **3.5.1 MATERIAŁY**

- ❖ materiały niezbędne do wykonania testów zostały wymienione w rozdziale 3.3.1.1
- ❖ związki badane tzn. zsyntetyzowane izotiocyaniany zostały wymienione rozdziale 4.2

#### **3.5.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

Doświadczenie wykonano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.1.2

### **3.6 BADANIE AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ IZOTIOCYJANIANÓW WOBEC KOMÓREK WYBRANYCH LINII RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO**

We wszystkich opisanych poniżej testach badano aktywność biologiczną izotiocyjnianów (rozdział 4.4) poprzez przeprowadzenie testów związanych m.in., z apoptozą, cyklem komórkowym, zmianami w ilości glutationu oraz właściwościami klonogennymi w komórkach wybranych linii (rozdział 4.4) raka pęcherza moczowego po ich ekspozycji na działanie izotiocyjnianów. Ponadto przeprowadzono analizy western blot oraz PCR mające na celu sprawdzenie poziomu wybranych białek oraz względnego poziomu ekspresji wybranych genów w lizatach komórkowych pochodzących z hodowli *in vitro*, które wcześniej zostały poddane działaniu izotiocyjnianów. Zobrazowano również  $\alpha$ -tubulinę oraz  $\beta$ -tubulinę za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego w komórkach linii raka pęcherza moczowego po ekspozycji komórek na działanie badanych związków.

#### **3.6.1 BADANIE WPLYWU IZOTIOCYJANIANÓW NA AKTYWNOŚĆ KASPAZY 3/7 W KOMÓRKACH LINII RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO**

W teście oceniano aktywność kaspazy 3/7 w komórkach wybranych linii komórkowych raka pęcherza moczowego po 24h inkubacji komórek z badanymi związkami. Test polega na wykorzystaniu fluorogenicznego substratu Ac-DEVD-AMC (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin) dla kaspazy 3. W trakcie testu substrat zawierający specyficzną sekwencję aminokwasową ulega „pocięciu” przez aktywną kaspazę 3, w wyniku czego generowana jest wysoce fluorescencyjna 7-amino-4-metylokumaryna (AMC). AMC wykrywana jest za pomocą czytnika fluorescencji ( $\lambda_{ex}=360$  nm,  $\lambda_{em}=420-460$  nm). „Cięcie” fluorogenicznego substratu zachodzi tylko w komórkach apoptotycznych, w związku z czym ilość AMC jest proporcjonalna do poziomu apoptozy w badanej próbce [167].

##### **3.6.1.1 MATERIAŁY**

- ❖ płytki 24-dołkowe do hodowli komórek adherentnych (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- ❖ płytki 384-dołkowe do odczytu fluorescencji, białe, LUMITRAC 200 (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria)
- ❖ 50 mM roztwory wyjściowe badanych izotiocyjnianów w DMSO (rozdział 4.4)
- ❖ bufor reakcyjny (20 mM HEPES, 10% (w/v), sacharoza, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02% (v/v) Triton X-100, pH 7.3 – Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)
- ❖ bufor lizujący (50 mM HEPES, 10% (w/v), sacharoza, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, pH 7.3 – Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)
- ❖ DTT (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)



- ❖ substrat - 10 mM Ac-DEVD-ACC (Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA)
- ❖ Medium do testów O-R: medium hodowlane składające się z dwóch pożywek podstawowych RPMI 1640 oraz Opti-MEM zmieszanych w stosunku 1: 1

### **3.6.1.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

- A. Komórki wysiano na płytki 24-dołkowe w liczbie  $4 \times 10^4$  komórek/dołek w objętości 500  $\mu$ l.
- B. Po 24h inkubacji komórek w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub> przygotowano następujące rozcieńczenia badanych związków: 15  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oraz 1  $\mu$ M w medium (każde rozcieńczenie badanych związków nakładano na płytkę 24-dołkową w trzech powtórzeniach technicznych w objętości 500  $\mu$ l).
- C. Komórki wraz z odpowiednio rozcieńczonymi związkami badanymi inkubowano przez 24h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- D. Po 24h z płytek hodowlanych usunięto medium, a komórki poddano lizie dodając do każdego dołka płytki 35  $\mu$ l zimnego buforu do lizy z dodatkiem 10 mM DTT. Lizę komórek prowadzono przez około 5-10 minut w 4°C.
- E. Płytkę 384-dołkową oraz bufor reakcyjny ogrzano do około 45°C, a następnie dodano do niego 10 mM DTT oraz substrat - 10 mM Ac-DEVD-ACC. Tak przygotowany bufor reakcyjny наносono po 75  $\mu$ l do dołków ogrzanej, białej, 384-dołkowej płytki przeznaczonej do odczytu luminescencji.
- F. Po zakończeniu lizy komórek przeniesiono po 25  $\mu$ l zlizowanych komórek do płytki 384-dołkowej.
- G. Odczyt fluorescencji prowadzono w sposób ciągły przez 2h, w temperaturze 37°C przy użyciu czytnika Biotek Synergy H4 Hybrid Reader ( $\lambda_{ex}=360\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=460\text{nm}$ ).

Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane związkami.

Wyniki normalizowano do zawartości białka określanego za pomocą testu SRB.

Na podstawie uzyskanych wartości fluorescencji obliczono maksymalną szybkość reakcji (bezpośrednio w programie Gen5.11), a po normalizacji do zawartości białka została przeanalizowana i przedstawiona jako średnia względna aktywność kaspazy 3/7 w stosunku do komórek kontrolnych – nietraktowanych związkami. Wyniki analizowano za pomocą programów: MS Excel oraz GraphPad Prism 7.03.

### **3.6.2 BADANIE APOPTOZY W KOMÓRKACH LINII RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI PRZY UŻYCIU ANEKSYNY V ORAZ JODKU PROPIDYNY**

W celu zbadania wpływu izotiocyanianów na liczbę komórek nekrotycznych, apoptotycznych oraz żywych w wybranych liniach komórkowych raka pęcherza moczowego po 24h inkubacji komórek z badanymi związkami wykonano test z użyciem aneksyny V oraz jodku propidyny. Aneksyna V wykorzystywana jest do znakowania komórek apoptotycznych. Komórki takie charakteryzują się wyeksponowaną fosfatydyloseryną w zewnętrznej warstwie błony komórkowej. Aneksyna V posiada zdolność do wiązania ujemnie naładowanych fosfolipidów takich jak fosfatydyloseryna [168]. Jodek propidyny wnika do komórek nekrotycznych, ale nie wczesno-apoptotycznych, komórki żywe natomiast nie będą wyznakowane zarówno aneksyną V jak i jodkiem propidyny dzięki czemu można odróżnić komórki żywe, apoptotyczne oraz nekrotyczne.

#### **3.6.2.1 MATERIAŁY**

- ❖ płytki 24-dołkowe do hodowli komórek adherentnych (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- ❖ probówki do cytometrii (Sarstedt)
- ❖ 50 mM roztwory wyjściowe badanych izotiocyanianów w DMSO (rozdział 4.4)
- ❖ bufor PBS (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)
- ❖ bufor wiążący HEPES (10 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 – Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)
- ❖ przeciwciało skoniugowane z APC do aneksyny V (Becton Dickinson, New Jersey, USA)
- ❖ jodek propidyny 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ medium do testów O-R: medium hodowlane składające się z dwóch pożywek podstawowych RPMI 1640 oraz Opti-MEM zmieszanych w stosunku 1: 1

#### **3.6.2.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

- A. Komórki wysiano na płytki 24-dołkowe w ilości  $4 \times 10^4$  komórek/dołek w objętości 500  $\mu$ l.
- B. Po 24h inkubacji komórek w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub> przygotowano następujące rozcieńczenia badanych związków: 15  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oraz 1  $\mu$ M w medium (każde rozcieńczenie badanych związków nakładano na płytkę 24-dołkową w trzech powtórzeniach technicznych w objętości 500  $\mu$ l).
- C. Komórki wraz z odpowiednio rozcieńczonymi związkami inkubowano przez 24h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.

- D. Po 24h inkubacji komórki zebrano za pomocą trypsyny i obliczono ich liczbę przy użyciu roztworu Trypan Blue.
- E. Po przeliczeniu, 200 tys. komórek odpipetowano do probówek i uzupełniono do 500  $\mu$ l buforem PBS.
- F. Próbkę przygotowaną w ten sposób odwirowano w następujących warunkach: 4°C, 400 g, 5 minut.
- G. Supernatant usunięto, a osad komórkowy zawieszono w 500  $\mu$ l PBS i ponownie zwirowano w tych samych warunkach.
- H. Po wirowaniu supernatant usunięto, a osad komórkowy zawieszono w 195  $\mu$ l buforu wiążącego oraz dodano 5  $\mu$ l przeciwciała do aneksyny V (1 mg/ml) skoniugowanego z APC. Próbkę z przeciwciałem inkubowano przez 30 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej.
- I. Po zakończonej inkubacji, tuż przed odczytem do każdej próbki dodano jodek propidyny w stężeniu 0,1 mg/ml.
- J. Próbkę analizowano używając cytometru przepływowego BD LSR Fortessa.

Komórki kontrolne stanowiły komórki nietraktowane związkami.

Dane otrzymano jako wykresy 2D typu dot-plot APC-Aneksyna V vs. PI.

Żywe komórki to komórki podwójnie ujemne PI<sup>-</sup>/Aneksyna V<sup>-</sup>, komórki późno apoptotyczne to komórki podwójnie pozytywne PI<sup>+</sup>/Aneksyna V<sup>+</sup>, komórki wczesno apoptotyczne to komórki dodatnie pod względem aneksyny V PI<sup>-</sup>/Aneksyna V<sup>+</sup>, a komórki nekrotyczne to komórki pozytywne wyłącznie pod względem jodku propidyny PI<sup>+</sup>/Aneksyna V<sup>-</sup>.

Wyniki analizowano używając programów: Flowing software 2.5.1 oraz GraphPad Prism 7.03.

### **3.6.3 BADANIE ZMIAN W CYKLU KOMÓRKOWYM KOMÓREK LINII RAKA PECHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI**

Aby określić zmiany w cyklu komórkowym w komórkach wybranych linii komórkowych raka pęcherza moczowego po 24h ekspozycji komórek na badane izotiocyjaniany przeprowadzono test z użyciem odczynnika BrdU (*ang. bromodeoxyuridine*; bromodeoksyurydyna). BrdU to syntetyczny analog tymidyny, który wbudowuje się do nowopowstającego DNA w czasie jego replikacji w fazie S cyklu komórkowego. Detekcja wbudowanego BrdU odbywa się przy użyciu przeciwciała [169].

#### **3.6.3.1 MATERIAŁY**

- ❖ płytki 24-dołkowe do hodowli komórek adherentnych (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- ❖ 50 mM roztwory wyjściowe badanych izotiocyjanianów w DMSO (rozdział 4.4)
- ❖ BrdU (Becton Dickinson, New Jersey, USA)
- ❖ 70% etanol do utrwalania komórek (Avantor Performance Materials Poland SA, Gliwice, Polska)
- ❖ 2 M HCl + 0,5% Triton X-100 (Laboratorium Chemii Biomedycznej IITD PAN)
- ❖ 0,1 M boran sodu pH 8,5 (Laboratorium Chemii Biomedycznej IITD PAN)
- ❖ RNase A (Thermo Fisher Scientific, Warszawa, Polska)
- ❖ przeciwciało anti-BrdU FITC nr kat. 347583 (Becton Dickinson, New Jersey, USA)
- ❖ jodek propidyny 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ BSA (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ Tween 20 (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ bufor PBS (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)
- ❖ Medium do testów OR: FBS 5% (HyClone), L-Gln 2mM (Sigma-Aldrich), antybiotyki (Polfa Tarchomin), RPMI 1640 (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN Wrocław), OPTI-MEM (Gibcco)

#### **3.6.3.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

- A. Komórki wysiano na płytki 24-dołkowe w ilości  $4 \times 10^4$  komórek /dołek w objętości 500  $\mu$ l.
- B. Po 24h inkubacji komórek w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub> przygotowano następujące rozcieńczenia badanych związków: 15  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oraz 1  $\mu$ M w medium (każde rozcieńczenie badanych związków nakładano na płytkę 24-dołkową w trzech powtórzeniach technicznych w objętości 500  $\mu$ l).
- C. Komórki wraz z odpowiednio rozcieńczonymi związkami badanymi inkubowano przez 24h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.

- D. Po 24h inkubacji komórek ze związkami rozcieńczono 100× odczynnik BrdU w medium hodowlanym do linii UM-UC-3. Przygotowany w ten sposób odczynnik dodano w objętości 100 µl do dołków płytki 24-dołkowej, pozostawiając 2 dołki bez BrdU i inkubowano 1h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- E. Następnie komórki zebrano za pomocą trypsyny. Po zebraniu komórki wirowano w następujących warunkach: 10 minut, 4°C, 500 g.
- F. Po wirowaniu supernatant usunięto, a pellet komórek zawieszono w ok. 1 ml 70% etanolu przeznaczonym do utrwalania komórek i przechowywano przez co najmniej 24h w -20°C.

#### Przygotowanie próbek do odczytu

- A. Do komórek, które były utrwalone 70% etanolem dodano około 500 µl PBS, a następnie je odwirowano: 5 minut, 4°C, 500 g.
- B. Supernatant usunięto, a pellet komórek zawieszono w 1 ml 2 M HCl + 0,5% Triton X-100. Próbkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 25°C. Po zakończonej inkubacji próbkę wirowano przez 10 minut, 4°C, 500 g.
- C. Supernatant usunięto, a pellet komórek zawieszono w 1 ml 0,1 M boranu sodu pH 8,5, następnie je odwirowano: 5 minut, 4°C, 500 g.
- D. Po wirowaniu pellet komórek zawieszono w 500 µl PBS z dodatkiem 1% BSA, 0,5% Tween 20 oraz 500× rozcieńczonej RNase A.
- E. Do próbek dodano 20 µl przeciwciała anti-BrdU FITC. Próbkę z przeciwciałem inkubowano przez 30 minut w 24°C.
- F. Po zakończeniu inkubacji próbkę wirowano w następujących warunkach: 10 minut, 4°C, 500 g.
- G. Uzyskany pellet komórek zawieszono w 500 µl PBS. Tuż przed odczytem do każdej próbki dodano jodek propidyny w stężeniu 0,1 mg/ml.
- H. Próbkę analizowano używając cytometru przepływowego BD LSR Fortessa.

Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane związkami oraz komórki, które nie były inkubowane z BrdU. Dane otrzymano jako dwukolorowe wykresy typu dot-plot FITC anti-BrdU vs. PI oraz wykresy w formie histogramów.

Wyniki analizowano używając programów: Flowing software 2.5.1 oraz GraphPad Prism 7.03

### **3.6.4 BADANIE WPŁYWU DZIAŁANIA IZOTIOCYJANIANÓW NA WŁAŚCIWOŚCI KLONOGENNE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH WYBRANYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PECHERZA MOCZOWEGO**

W teście oceniano zdolność do wzrostu w postaci klonów komórek nowotworowych wybranych linii komórkowych raka pęcherza moczowego po ich inkubacji z badanymi izotiocyjanianami. Test klonogenny jest nazywany inaczej testem liczebności kolonii, jest on często stosowany aby ocenić zdolność do przeżycia komórek i tworzenia kolonii w warunkach *in vitro*. Po działaniu na komórki badanymi związkami, wysiewa się w liczbie 200-300 komórek na szalki lub płytki 6-dołkowe, a następnie hoduje w inkubatorze w standardowych warunkach 5-14 dni. Po zakończeniu hodowli, kolonie należy utrwalić, a następnie zliczyć [170].

#### **3.6.4.1 MATERIAŁY**

- ❖ płytki 24-dołkowe do hodowli komórek adherentnych (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- ❖ 50 mM roztwory wyjściowe badanych izotiocyjanianów w DMSO (rozdział 4.4)
- ❖ medium do testów O-R: medium hodowlane składające się z dwóch pożywek podstawowych RPMI 1640 oraz Opti-MEM zmieszanych w stosunku 1: 1
- ❖ trypan Blue (Sigma Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ płytki 6-dołkowe do hodowli komórek adherentnych (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria)
- ❖ 20% (w/v) TCA (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska)
- ❖ 0,1% (w/v) SRB (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) w 1% kwasie octowym
- ❖ 1% kwas octowy (v/v) (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska)

#### **3.6.4.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

- A. Komórki wysiano na płytki 24-dołkowe w liczbie  $4 \times 10^4$  komórek/dołek w objętości 500  $\mu$ l.
- B. Po 24h inkubacji komórek w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub> przygotowano następujące rozcieńczenia badanych związków: 15  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oraz 1  $\mu$ M w medium (każde rozcieńczenie badanych związków nakładano na płytkę 24-dołkową w trzech powtórzeniach technicznych w objętości 500  $\mu$ l).
- C. Komórki wraz z odpowiednio rozcieńczonymi związkami badanymi inkubowano przez 72h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- D. Po 72h inkubacji komórek ze związkami, komórki zebrano za pomocą trypsyny, a następnie przeliczono w kamerze Bürkera.

- E. Po przeliczeniu na płytki 6-dołkowe wysiano po 300 komórek każdej z linii komórkowej po traktowaniu izotiocyjanianami w każdym stężeniu w objętości 3 ml medium.
- F. Komórki na płytkach 6-dołkowych inkubowano przez 7 dni w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- G. Po upływie 7 dni przystąpiono do wybarwiania powstałych kolonii z zastosowaniem barwnika SRB.
- H. Z każdego dołka płytki 6-dołkowej odebrano 1 ml medium i dodano 1 ml 20% (w/v) kwasu trójchlorooctowego – TCA. Komórki z kwasem TCA inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej.
- I. Po zakończeniu inkubacji każdy dołek płytki został dokładnie, kilkakrotnie opłukany wodą destylowaną, a następnie do każdego dołka płytki dodano 500 µl barwnika SRB. Płytki z barwnikiem inkubowano 30 minut, w temperaturze pokojowej, na kołyszce laboratoryjnej.
- J. Następnie każdy dołek płytki został dokładnie i kilkakrotnie opłukany 1% kwasem octowym (v/v).
- K. Płytki pozostawiono do wyschnięcia, a kolonie przeliczono.

Kontrolę stanowiły komórki nie traktowane badanymi związkami.

Otrzymane wyniki analizowano za pomocą programu GraphPad Prism 7.0

### **3.6.5 OZNACZENIE ILOŚCI GLUTATIONU ZREDUKOWANEGO ORAZ UTLENIONEGO W KOMÓRKACH LINII RAKA PEČHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI**

W teście badano zmiany w ilości glutationu utlenionego oraz zredukowanego w komórkach wybranych linii komórkowych raka pęcherza moczowego po 24h inkubacji komórek z badanymi izotiocyjnianami. W tym celu wykonano komercyjnie dostępny test GSH/GSSG-Glo™ assay (Promega GmbH, Walldorf, Niemcy; zasada działania testu została opisana w rozdziale 3.3.4)

#### **3.6.5.1 MATERIAŁY**

- ❖ 50 mM roztwory wyjściowe badanych izotiocyjnianów w DMSO (rozdział 4.4)
- ❖ pozostałe odczynniki niezbędne do wykonania testu wymieniono w rozdziale 3.3.4.1

#### **3.6.5.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

- A. Komórki wysiano na płytce 96-dołkowej w liczbie  $2 \times 10^3$  komórek/dołek w objętości 100  $\mu$ l.
- B. Po 24h inkubacji komórek w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub> przygotowano następujące rozcieńczenia badanych związków: 15  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oraz 1  $\mu$ M w medium (każde rozcieńczenie badanych związków nakładano na płytkę 24-dołkową w trzech powtórzeniach technicznych w objętości 100  $\mu$ l).
- C. Komórki wraz z odpowiednio rozcieńczonymi związkami inkubowano przez 24h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- D. Po 24h inkubacji komórek w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub> wraz ze związkami przygotowano odpowiednie bufony (**Tab. 18**) do pomiaru ilości glutationu całkowitego (Total Glutathione Lysis Reagent) oraz utlenionego (Oxidized Glutathione Lysis Reagent). Bufory przygotowano zgodnie z instrukcją producenta.

*Pozostałe etapy testu wykonano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.4.2 – od punktu C*



### **3.6.6 BADANIE POLIMERYZACJI TUBULINY POD WPLYWEM ZSYNTETYZOWANYCH ITC**

Aby zbadać wpływ zsyntetyzowanych izotiocyjanianów na szybkość polimeryzacji tubuliny wykorzystano komercyjnie dostępny test Tubulin Polymerization Assay Kit (Cytoskeleton, Inc., Acoma St. Denver, CO 80223 USA). W teście tym, w czasie polimeryzacji tubuliny dochodzi do przyłączania fluorescencyjnego reportera do powstałych mikrotubul, dzięki czemu możliwe jest śledzenie szybkości tego procesu za pomocą fluorescencji.

#### **3.6.6.1 MATERIAŁY**

- ❖ Tubulin Polymerization Assay Kit nr kat. BK011P (Cytoskeleton, Inc., Acoma St. Denver, CO 80223 USA)
- ❖ 50 mM roztwory wyjściowe badanych izotiocyjanianów w DMSO (rozdział 4.4)
- ❖ woda MiliQ (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)

#### **3.6.6.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

Test przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, w skrócie:

- A. Przygotowano następujące rozcieńczenia badanych związków: 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M oraz 25  $\mu$ M.
- B. Następnie zgodnie z protokołem przygotowano bufor reakcyjny składający się z: tubuliny (roztwór wyjściowy 10 mg/ml), 100 mM GTP, buforu glicerolowego tubuliny oraz buforu 1. Ostateczne stężenie tubuliny w przygotowanym buforze wynosiło 2 mg/ml.
- C. Po przygotowaniu tubuliny związki badane nałożono do dołków 96-dołkowej płytki testowej w objętości 5  $\mu$ l/dołek, następnie do każdego dołka, w którym znajdował się związek dodano po 45  $\mu$ l buforu reakcyjnego.
- D. Po dodaniu buforu reakcyjnego do wszystkich dołków płytki, w których znajdowały się związki, rozpoczęto odczyt fluorescencji. Odczyt prowadzono w sposób ciągły przez 2h, w temperaturze 37°C przy użyciu czytnika Biotek Synergy H4 Hybrid Reader.
- E. 3  $\mu$ M winblastyna stanowiła pozytywną kontrolę techniczną.

Otrzymane dane analizowano za pomocą programów: MS Excel oraz GraphPad Prism 7.03

### **3.6.7 OZNACZENIE WZGLĘDNEGO POZIOMU EKSPRESJI $\alpha$ - ORAZ $\beta$ -TUBULINY W LIZATACH KOMÓRKOWYCH WYBRANYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI METODĄ REAL-TIME PCR**

W celu oceny względnego poziomu genów *TUBA8* ( $\alpha$ -tubulina) oraz *TUBB6* ( $\beta$ -tubulina) (*Tab. 19*) wykonano lizaty komórkowe pochodzące z hodowli *in vitro* wybranych linii komórkowych raka pęcherza moczowego po traktowaniu badanymi izotiocyanianami, a następnie techniką Real-Time PCR określono względną ilość badanych genów (zasada działania metody została opisana w rozdziale 3.3.3).

#### **3.6.7.1 MATERIAŁY**

Do przygotowania lizatów komórkowych oraz izolacji RNA z tychże lizatów wykorzystano następujące materiały:

- ❖ 50 mM roztwory wyjściowe badanych izotiocyanianów w DMSO (rozdział 4.4)
- ❖ pozostałe odczynniki niezbędne do przygotowania lizatów oraz izolacji RNA wymieniono w rozdziale 3.3.2.1

Do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji oraz reakcji Real-Time PCR wykorzystano następujące materiały:

- ❖ sondy TaqMan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (*Tab. 19*)
- ❖ pozostałe odczynniki niezbędne do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji oraz reakcji Real-Time PCR wymieniono w rozdziale 3.3.2.1

*Tab. 19. Geny badane w lizatach komórkowych po traktowaniu ITC w wybranych liniach komórkowych raka pęcherza moczowego za pomocą techniki Real-Time PCR*

<b>GEN</b>	<b>BIAŁKO KODOWANE PRZEZ BADANY GEN</b>	<b>REF.</b>	<b>ASSAY ID</b>
<i>TUBA8</i>	$\alpha$ -tubulina 8	UniProt no. Q9NY65	Hs01026795_m1
<i>TUBB6</i>	$\beta$ -tubulina 6 klasa V	UniProt no. Q9BUF5	Hs00603164_m1

#### **3.6.7.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

Lizaty komórkowe:

- A. Około  $2 \times 10^6$  komórek wysiano na 100 mm szalki i inkubowano przez 24h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- B. Po 24h inkubacji komórek przygotowano następujące rozcieńczenia badanych związków: 15  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oraz 1  $\mu$ M w medium hodowlanym.
- C. Szalki wraz z odpowiednio rozcieńczonymi związkami badanymi inkubowano przez 24h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.

- D. Po 24h inkubacji komórek ze związkami z szalek, na które zostały wysiane komórki odebrano medium, a następnie opłukano je trzykrotnie buforem PBS.
- E. Po opłukaniu szalek, do każdej dodano 1000 µl odczynnika TRI Reagent, a następnie zebrano je do probówek typu Eppendorf.
- F. W ten sposób zebrane próbki przechowywano w -80°C do dalszych analiz.

*Izolację RNA, odwrotną transkrypcję wyizolowanego RNA z zastosowaniem iScript cDNA Synthesis Kit oraz reakcję Real-Time PCR z zastosowaniem sond TaqMan wykonano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.2*

### **3.6.8 OZNACZENIE POZIOMU WYBRANYCH BIAŁEK W LIZATACH KOMÓRKOWYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PECHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU IZOTIOCYJANIANAMI METODA WESTERN BLOT**

Za pomocą techniki western blot określono ilość następujących białek: p21,  $\alpha$ -tubuliny oraz  $\beta$ -tubuliny (**Tab. 20**) w lizatach pochodzących z hodowli *in vitro* wybranych linii komórkowych raka pęcherza moczowego po traktowaniu badanymi izotiocyanianami (zasada działania metody została opisana w rozdziale 3.3.2).

#### **3.6.8.1 MATERIAŁY**

Do przygotowania lizatów komórkowych oraz przeprowadzenia pomiaru stężenia białek w tychże lizatach wykorzystano następujące materiały:

- ❖ 50 mM roztwory wyjściowe badanych izotiocyanianów w DMSO (rozdział 4.4)
- ❖ pozostałe odczynniki niezbędne do przygotowania lizatów wymieniono w rozdziale 3.3.3.1

Do zbadania ilości wybranych białek (**Tab. 20**) za pomocą techniki western blot wykorzystano następujące materiały:

- ❖ uprzednio przygotowane lizaty komórkowe
- ❖ przeciwciała pierwszorzędowe (**Tab. 20**)
- ❖ przeciwciała drugorzędowe:
  - mysie przeciwciało przeciw króliczemu IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową A6154 (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
  - królicze przeciwciało przeciw mysiemu IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową 43R1424 (bioNova, Niedenstein, Niemcy)
- ❖ pozostałe odczynniki niezbędne do wykonania analizy western blot wymieniono w rozdziale 3.3.3.1

**Tab. 20.** Białka badane w lizatach komórkowych po traktowaniu ITC w wybranych liniach komórkowych raka pęcherza moczowego za pomocą techniki western blot

<b>BIAŁKO</b>	<b>PRZECIWCIAŁO</b>	<b>Nr katalogowy</b>	<b>Rozcieńczenie</b>
<b>GAPDH</b>	Mysie przeciwciało IgG anty- <b>GAPDH</b>	MA5-15738 (Invitrogen)	1:5 000
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	2144S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b><math>\beta</math>-tubulina</b>	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b><math>\beta</math>-tubulina</b>	2146S (Cell Signaling Technology)	1:1 000
<b>p21</b>	Królicze monoklonalne przeciwciało IgG anty- <b>p21</b>	2947S (Cell Signaling Technology)	1:1 000

### 3.6.8.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA

#### Lizaty komórkowe:

- A. Około  $2 \times 10^6$  komórek wysiano na 100 mm szalki, które następnie inkubowano przez 24h w  $37^\circ\text{C}$ , w wilgotnej atmosferze nasyconej 5%  $\text{CO}_2$ .
- B. Po 24h inkubacji komórek przygotowano następujące rozcieńczenia badanych związków: 15  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  oraz 1  $\mu\text{M}$  w medium hodowlanym.
- C. Szalki wraz z odpowiednio rozcieńczonymi związkami badanymi inkubowano przez 24h w  $37^\circ\text{C}$ , w wilgotnej atmosferze nasyconej 5%  $\text{CO}_2$ .
- D. Po 24h inkubacji komórek ze związkami z szalek, na które zostały wysiane komórki odebrano medium, a następnie opłukano je trzykrotnie buforem PBS.
- E. Po opłukaniu szalek, do każdej z nich dodano 100  $\mu\text{l}$  buforu RIPA z inhibitorami.
- F. Komórki zebrano z szalek skrobaczką do kultur komórkowych i przeniesiono do probówek typu Eppendorf.
- G. Zebrane w ten sposób komórki inkubowano na lodzie przez 15 minut.
- H. Po upływie 15 minut próbki zwirowano w następujących warunkach: 10 minut, 10 000 g,  $4^\circ\text{C}$ .
- I. Supernatant przeniesiono do nowej probówki i przechowywano w  $-80^\circ\text{C}$  do dalszych analiz.
- J. Lizaty komórkowe zbierano z hodowli komórkowych pochodzących z trzech niezależnych pasaży.

Pomiar stężenia białka w lizatach komórkowych za pomocą zestawu Pierce™ Coomassie Plus:  
wykonano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.3.2.

Western blot: wykonano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.3.2, z drobnymi zmianami, tzn.:

Elektroforeza w żelu:

- A. Lizaty komórkowe rozmrożono i przygotowano próbki do rozdzielania elektroforetycznego w warunkach redukujących. Na studzienkę nanoszono próbki, w których całkowita ilość białka wynosiła 10  $\mu\text{g}$  (w przypadku  $\alpha$ -tubuliny oraz  $\beta$ -tubuliny) oraz 20  $\mu\text{g}$  (w przypadku białka p21). Do próbek dodano bufor LB z dodatkiem  $\beta$ -merkaptetanolu oraz PBS tak aby całkowita objętość próbki wynosiła 20  $\mu\text{l}$ /studzienkę.

Transfer na membranę:

- H. Następnie dodano przeciwciało II-rzędowe - mysie przeciwciało przeciw króliczemu IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową nr kat.: A6154 (1:1000 dla białka p21; 1: 5000 dla  $\alpha$ -tubuliny oraz  $\beta$ -tubuliny) w 5% BSA w TBST.
- L. Po zakończonym odczycie membranę płukano trzykrotnie przez 10 minut w PBST, a następnie inkubowano z mysim przeciwciałem IgG anty GAPDH w 0,5% odłuszczonego mleku w PBST przez 1h w temperaturze pokojowej.
- M. Po zakończonej inkubacji membranę ponownie płukano trzykrotnie przez 10 minut w PBST i rozpoczęto inkubację z przeciwciałem II-rzędowym - królicze przeciwciało przeciw mysiemu IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową 43R1424 (1:2500) w 0,5% odłuszczonego mleku w PBST przez 1h w temperaturze pokojowej.

### **3.6.9 OBRAZOWANIE TUBULINY W KOMÓRKACH WYBRANYCH LINII RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU BADANYMI IZOTIOCYJANIANAMI Z ZASTOSOWANIEM MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ**

Aby ocenić wpływ izotiocyanianów na strukturę  $\beta$ -tubuliny w komórkach wybranych linii raka pęcherza moczowego przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne, a następnie obrazowano  $\beta$ -tubulinę za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Barwienie immunofluorescencyjne pozwala na umiejscowienie w komórkach lub tkankach badanych białek za pomocą specyficznych przeciwciał.

#### **3.6.9.1 MATERIAŁY**

- ❖ płytki 96-dółkowe z przezroczystym dnem oraz czarnymi ściankami (Corning, Amsterdam, Holandia)
- ❖ 50 mM roztwory wyjściowe badanych izotiocyanianów w DMSO (rozdział 4.4)
- ❖ medium do testów O-R: medium hodowlane składające się z dwóch pożywek podstawowych RPMI 1640 oraz Opti-MEM zmieszanych w stosunku 1: 1
- ❖ PBS (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)
- ❖ 4% paraformaldehyd (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska)
- ❖ 0,25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland)
- ❖ 1% BSA w PBST (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ 0,1% PBST
  - PBS (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)
  - Tween 20 (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
- ❖ przeciwciało I-rzędowe rabbit monoclonal anti  $\beta$ -tubulin IgG #2146S (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)
- ❖ przeciwciało II-rzędowe anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Conjugate #4412 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)
- ❖ 3 mM DAPI (Thermo Fisher Scientific, Warszawa, Polska)

#### **3.6.9.2 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA**

- A. Na płytce 96-dółkowej z przezroczystym dnem oraz czarnymi ściankami wysiano po  $2 \times 10^3$  komórek/dółek w 100  $\mu$ l medium hodowlanego. Płytkę inkubowano przez 24h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- B. Następnie przygotowano rozcieńczenia badanych związków: 15  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oraz 1  $\mu$ M w medium (każde rozcieńczenie badanych związków nakładano na płytkę 24-dółkową w trzech powtórzeniach technicznych w objętości 100  $\mu$ l).

- C. Komórki wraz z odpowiednio rozcieńczonymi związkami inkubowano przez 24h lub 72h w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.
- D. Po zakończeniu inkubacji komórek ze związkami, usunięto medium oraz delikatnie przemyto komórki za pomocą PBS. Następnie utrwalono je przy użyciu 4% paraformaldehydu (100 µl/ dołek) przez 15 minut, w temperaturze pokojowej.
- E. Utrwalone komórki dwukrotnie opłukano PBS, po czym dokonano permabilizacji komórek za pomocą 0,25% Tritonu X-100 (100 µl/dolek) przez 15 minut, w temperaturze pokojowej.
- F. Komórki po permabilizacji zostały ponownie dwukrotnie opłukane za pomocą PBS, a następnie wykonano blokowanie 1% BSA w PBST (50 µl/dolek) przez 30 minut, w temperaturze pokojowej.
- G. Po 30 minutach blokowania roztwór BSA został usunięty i dodano przeciwciało I-rzędowe (1:200 w PBST 50 µl/dolek). Komórki z przeciwciałem I-rzędowym inkubowano przez noc w 4°C.
- H. Po całonocnej inkubacji roztwór przeciwciała usunięto, komórki trzykrotnie opłukano PBS, a następnie dodano przeciwciało II-rzędowe (1:300 w PBST 50 µl/dolek). Komórki z przeciwciałem II-rzędowym inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej, w ciemności.
- I. Po zakończonej inkubacji z przeciwciałem II-rzędowym komórki zostały ponownie trzykrotnie opłukane PBS, a następnie rozpoczęto ich inkubację z DAPI (1:1 500 w PBS 50 µl/dolek) przez 15 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Po 15 minutach komórki ponownie trzykrotnie wypłukano w PBS.
- J. Po zakończonym procesie barwienia komórek rozpoczęto obrazowanie  $\beta$ -tubuliny za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX81 wyposażonego w kamerę XC10 (Olympus Polska, Warszawa, Polska).

Otrzymane obrazy analizowano za pomocą oprogramowania CellSens Dimension software (Olympus Polska, Warszawa, Polska).



### **3.7 ANALIZA STATYSTYCZNA**

Wszystkie opisane powyżej doświadczenia wykonano przynajmniej w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenie standardowe ( $\pm$ SD; ang. *Standard Deviation*) lub 95%CI. Uzyskane wyniki badań analizowano za pomocą programu statystycznego GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., USA). Przeprowadzono jednoczynnikowe analizy wariancji (ANOVA) z odpowiednimi testami post hoc opisanymi w podpisach rycin. Za statystycznie istotne uznano wartości p mniejsze niż 0,05.



---

## 4. WYNIKI

---

### 4.1 WYPROWADZONE LINIE OPORNE RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO NA WYBRANE CYTOSTATYKI Z LINII KOMÓRKOWEJ UM-UC-3

Z linii komórkowej raka pęcherza moczowego UM-UC-3 wyprowadzono cztery nowe linie komórkowe odporne na:

- ❖ cisplatynę, tj. UM-UC-3<sup>CDDP</sup>
- ❖ winblastynę tj. UM-UC-3<sup>VBL</sup>
- ❖ gemcytabinę tj. UM-UC-3<sup>GEM</sup>
- ❖ cisplatynę oraz gemcytabinę, tj. UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup>

Wyprowadzenie lekoopornych linii komórkowych trwało 12 miesięcy. Przez ten okres komórki były pasażowane 2 razy w tygodniu, co daje łącznie 104 pasaże.

Linie komórkowe zostały uznane za odporne po ustabilizowaniu się parametru RI.

**Tabela 21** przedstawia uzyskane RI dla wyprowadzonych linii komórkowych.

*Tab. 21. Indeksy oporności (RI) uzyskane dla wyprowadzonych lekoopornych linii komórkowych raka pęcherza moczowego*

<b>Linia komórkowa</b>	<b>RI</b>
UM-UC-3 <sup>CDDP</sup>	RI <sup>CDDP</sup> = 7,7
UM-UC-3 <sup>VBL</sup>	RI <sup>VBL</sup> = 6,3
UM-UC-3 <sup>GEM</sup>	RI <sup>GEM</sup> = 56,3
UM-UC-3 <sup>CDDP/GEM</sup>	RI <sup>CDDP</sup> = 8,8; RI <sup>GEM</sup> = 14

## 4.2 CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA LEKOOPORNYCH ORAZ WRAŻLIWYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO

Poza liniami lekoopornymi wyprowadzonymi w ramach niniejszej pracy, w ramach współpracy z profesorem Martinem Michaelisem z Resistant Cancer Cell Line Collection pozyskano kolejnych osiem lekoopornych linii komórkowych raka pęcherza moczowego oraz dwie linie wyjściowe – rodziny linii RT-112 oraz TCC-SUP. Dokonano charakterystyki fenotypowej oraz molekularnej wszystkich piętnastu linii komórkowych, które w przyszłości mogłyby posłużyć jako modele do badań nad lekoopornością nowotworów pęcherza moczowego. Wykonano szereg doświadczeń mających na celu zbadanie m.in. oporności krzyżowej i jej mechanizmów, ekspresji wybranych genów oraz białek związanych z regulacją cyklu komórkowego, cytoszkieletem oraz lekoopornością. Ponadto oznaczono stosunek glutationu zredukowanego do utlenionego oraz ilość glutationu całkowitego, który ma istotne znaczenie w nabywaniu lekooporności przez komórki nowotworowe.

### 4.2.1 OCENA ROZWOJU OPORNOŚCI KRZYŻOWEJ KOMÓREK BADANYCH LINII RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO NA ZWIĄZKI O ZRÓŻNICOWANYM MECHANIZMIE DZIAŁANIA

W celu określenia profilu lekooporności komórek panelu linii wyjściowych (wrażliwych) oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego przeprowadzono 72-godzinne testy antyproliferacyjne SRB. Wykorzystano zestaw trzynastu związków o charakterze przeciwnowotworowym, o zróżnicowanym mechanizmie działania oraz celach molekularnych. Wyniki zostały zestawione w *tabeli 22* oraz *23* jako wartości RI. Ponadto w *tabeli 24* przedstawiono wartości  $IC_{50}$  (95% CI), wyznaczone za pomocą programu statystycznego GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., USA).

Dla komórek linii wyjściowych nie zaobserwowano dużych różnic pomiędzy wartościami  $IC_{50}$  wyznaczonymi dla większości badanych związków. Jedynie w przypadku cisplatyny oraz kamptotecyny różnice pomiędzy najmniej i najbardziej wrażliwą linią były większe niż pięciokrotne (*Tab. 24*). Komórki linii RT-112 wykazały wyraźnie niższą wrażliwość na cisplatynę (3,5-krotnie wyższe  $IC_{50}$  niż komórek linii UM-UC-3 oraz 6-krotnie wyższe niż komórek linii TCC-SUP) oraz kamptotecynę (7-krotnie wyższe  $IC_{50}$  niż komórek linii UM-UC-3 oraz 3-krotnie wyższe niż komórek linii TCC-SUP) aniżeli pozostałe dwie linie wyjściowe.

W przypadku linii opornych zaobserwowano szereg różnic w stopniu uzyskanej lekooporności (*Tab. 22* oraz *23*) w obrębie linii adaptowanych do wzrostu w obecności

tego samego leku. RI dla cisplatyny ( $RI^{CDDP}$ ) wynosił 18,3, 2,7 oraz 7,7 odpowiednio dla komórek linii TCC-SUP<sup>CDDP</sup>, RT-112<sup>CDDP</sup> i UM-UC-3<sup>CDDP</sup> (**Tab. 22**). Rozwój niewielkiej oporności krzyżowej zaobserwowano dla doksorubicyny (DOX) w przypadku linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup> ( $RI^{DOX} = 2,7$ ) i TCC-SUP<sup>CDDP</sup> ( $RI^{DOX} = 2,1$ ) oraz bortezomibu (BZT) dla komórek linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup> ( $RI^{BZT} = 3,2$ ). Zaobserwowano także oporność na gemcytabinę (GEM) ( $RI^{GEM} = 9,4$ ), która rozwinęła się w przypadku linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, podczas gdy komórki linii TCC-SUP<sup>CDDP</sup> wykazują nieznacznie zwiększoną wrażliwość na ten związek ( $RI^{GEM} = 0,31$ ) (**Tab. 22**).

Linie TCC-SUP<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>VBL</sup> (oporne na winblastynę (VBL)) wykazały  $RI^{VBL}$  na poziomie odpowiednio 104,8; 15,6 oraz 6,3. Bardzo wysoką oporność krzyżową, która w wielu przypadkach przewyższa oporność na winblastynę, zaobserwowano dla niektórych innych związków o charakterze antymitotycznym, tzn.: kolchicyny, paklitakselu, winfluniny oraz winorelbiny. Efekt ten jest szczególnie widoczny w przypadku komórek linii TCC-SUP<sup>VBL</sup> (**Tab. 22**). Jednakże w przypadku żadnej z linii opornych na winblastynę nie zaobserwowano oporności krzyżowej na kombretastatynę A4, która również należy do grupy antymitotyków (**Tab. 22**). Wszystkie omawiane linie komórkowe wykazały również oporność na doksorubicynę (najwyższy  $RI^{DOX} = 19$  wykazała linia TCC-SUP<sup>VBL</sup>), a linia UM-UC-3<sup>VBL</sup> dodatkowo rozwinęła wyraźną oporność na gemcytabinę ( $RI^{GEM} = 14,5$ ).

Komórki linii TCC-SUP<sup>GEM</sup>, RT-112<sup>GEM</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> oporne na gemcytabinę wykazały  $RI^{GEM}$  odpowiednio 12,8; 27,3 oraz 56,3 (**Tab. 23**). Linia TCC-SUP<sup>GEM</sup> rozwinęła silną oporność krzyżową na kombretastatynę A4 (CA4) ( $RI^{CA4} = 47,8$ ), paklitaksel (PTX) ( $RI^{PTX} = 19,1$ ), winblastynę ( $RI^{VBL} = 10,4$ ) oraz winorelbinę (VRL) ( $RI^{VRL} = 14,1$ ), a dodatkowo rozwinęła niewielką oporność krzyżową na cisplatynę ( $RI^{CDDP} = 4,5$ ) oraz doksorubicynę ( $RI^{DOX} = 4,9$ ). Tak szerokiej oporności krzyżowej nie zaobserwowano ani dla komórek linii RT-112<sup>GEM</sup>, ani dla komórek linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> (**Tab. 23**). Warto zaznaczyć, iż tak szerokiej oporności krzyżowej nie zaobserwowano także dla komórek linii TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> ( $RI^{CDDP} = 10,1$ ,  $RI^{GEM} = 9,1$ ), dla której obserwuje się wzrost wrażliwości na winfluninę (VFL) ( $RI^{VFL} = 0,23$ ).

Komórki linii RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> rozwinęły jedynie niewielką oporność na cisplatynę ( $RI^{CDDP} = 2,0$ ), umiarkowaną na gemcytabinę ( $RI^{GEM} = 6,0$ ) oraz niewielką oporność krzyżową wobec doksorubicyny ( $RI^{DOX} = 2,2$ ; **Tab. 23**). Natomiast komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> rozwinęły umiarkowaną oporność na cisplatynę ( $RI^{CDDP} = 8,8$ ),

gemcytabinę ( $RI^{GEM} = 6,0$ ) oraz niewielką opornością krzyżową wobec bortezomibu ( $RI^{BZT} = 2,8$ ) (**Tab. 23**).

Zbadanie profilu lekooporności dla 15 linii komórkowych ujawniło znaczne różnice pomiędzy komórkami linii opornych na ten sam związek ale pochodzących z różnych linii wyjściowych. W przypadku niektórych linii rozwinęła się szeroka oporność krzyżowa (linia TCC-SUP<sup>VBL</sup>), podczas gdy komórki innej linii (RT-112<sup>CDDP/GEM</sup>) nie rozwinęły żadnej oporności krzyżowej. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, iż badane linie komórkowe rozwinęły lekooporność dzięki różnym mechanizmom molekularnym.

**Tab. 22. Indeksy oporności (RI) uzyskane dla komórek linii raka pęcherza moczowego opornych na cisplatynę oraz winblastynę**

RI linii komórkowych raka pęcherza moczowego opornych na <u>cisplatynę</u> oraz <u>winblastynę</u>						
	UM-UC-3 <sup>CDDP</sup>	RT-112 <sup>CDDP</sup>	TCC-SUP <sup>CDDP</sup>	UM-UC-3 <sup>VBL</sup>	RT-112 <sup>VBL</sup>	TCC-SUP <sup>VBL</sup>
RI <sup>BZT</sup>	3,2	0,8	0,7	1,3	1,0	2,0
RI <sup>CDDP</sup>	7,7	2,7	18,3	1,0	0,8	1,0
RI <sup>DOX</sup>	2,7	0,7	2,1	2,5	6,9	19,0
RI <sup>GEM</sup>	9,4	1,0	0,31	14,5	0,6	0,6
RI <sup>IMA</sup>	0,8	0,6	1,5	1,0	0,8	1,0
RI <sup>CAMPTO</sup>	1,1	0,9	1,3	0,9	0,7	0,6
RI <sup>COL</sup>	1,7	0,7	1,3	5,7	3,4	15,8
RI <sup>CA4</sup>	0,9	0,6	1,1	1,0	0,6	1,7
RI <sup>PTX</sup>	1,4	2,2	0,8	25,4	37,3	61,0
RI <sup>TSA</sup>	0,8	0,7	0,7	1,2	0,7	1,0
RI <sup>VBL</sup>	0,9	0,7	0,9	6,3	15,6	104,8
RI <sup>VFL</sup>	1,0	0,9	0,7	3,8	6,8	30,4
RI <sup>VRL</sup>	1,9	1,0	0,8	49,0	70,1	92,0

**Tab. 23. Indeksy oporności (RI) uzyskane dla komórek linii raka pęcherza moczowego opornych na gemcytabinę oraz zarówno na cisplatynę jak i gemcytabinę**

RI linii komórkowych raka pęcherza moczowego opornych na <u>gemcytabinę</u> oraz zarówno na <u>cisplatynę</u> jak i <u>gemcytabinę</u>						
	UM-UC-3 <sup>GEM</sup>	RT-112 <sup>GEM</sup>	TCC-SUP <sup>GEM</sup>	UM-UC-3 <sup>CDDP/GEM</sup>	RT-112 <sup>CDDP/GEM</sup>	TCC-SUP <sup>CDDP/GEM</sup>
RI <sup>BZT</sup>	1,1	1,1	1,4	2,8	0,9	0,52
RI <sup>CDDP</sup>	1	0,9	4,5	8,8	2,0	10,1
RI <sup>DOX</sup>	0,9	0,8	4,9	1,7	2,2	10,0
RI <sup>GEM</sup>	56,3	27,3	12,8	6,0	6,0	9,1
RI <sup>IMA</sup>	0,9	0,5	1,3	0,7	0,8	1,3
RI <sup>CAMPTO</sup>	1	0,1	1,7	1,4	1,3	1,4
RI <sup>COL</sup>	0,9	0,8	1,8	0,9	0,7	0,9
RI <sup>CA4</sup>	0,7	0,4	47,8	0,9	0,5	0,7
RI <sup>PTX</sup>	2	1,4	19,1	1,2	1,8	0,7
RI <sup>TSA</sup>	0,7	1,0	0,6	1,0	0,6	0,6
RI <sup>VBL</sup>	0,4	0,7	10,4	0,6	0,4	0,5
RI <sup>VFL</sup>	0,6	0,7	3,7	0,8	0,5	0,23
RI <sup>VRL</sup>	0,9	70,1	14,1	1,9	0,6	0,6

**Tab. 24.** Profil lekooporności komórek panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach. Wyniki przedstawiono jako  $IC_{50}^{72h}$  (95% CI)

$IC_{50}^{72h}$ (95% CI)					
Rodzina linii UM-UC-3					
Związek	UM-UC-3	UM-UC-3 <sup>CDDP</sup>	UM-UC-3 <sup>VBL</sup>	UM-UC-3 <sup>GEM</sup>	UM-UC-3 <sup>CDDP/GEM</sup>
Bortezomib [nM]	5,4 (4,8 – 6,1)	17,5 (15,3 – 20,0)	6,8 (6,0 – 7,8)	6,2 (5,5 – 7,0)	15,4 (12,9 – 18,2)
Cisplatyna [μM]	2,6 (2,2 – 2,9)	20,0 (17,9 – 22,2)	2,6 (1,8 – 3,4)	2,5 (1,7 – 3,3)	22,9 (20,1 – 26,0)
Dokсорubicyna [nM]	34,8 (27,5 – 42,8)	95,7 (82,4 – 110,1)	85,9 (62,6 – 112,9)	33,4 (29,6 – 37,6)	58,5 (45,8 – 72,8)
Gemcytabina [nM]	16,0 (15,3 – 16,7)	150,5 (123,8 – 181,7)	232,0 (211,2 – 255,2)	900,7 (753,6 – 1066,0)	224,0 (199,7 – 250,0)
Imatynib [μM]	21,0 (17,7 – 24,8)	17,6 (15,4 – 20,2)	20,5 (17,4 – 24,3)	18,3 (16,1 – 20,8)	14,2 (12,6 – 16,3)
Kamptotecyna [nM]	17,0 (14,7 – 19,8)	19,0 (16,8 – 21,4)	15,1 (11,9 – 18,5)	17,0 (14,6 – 20,0)	23,6 (20,5 – 27,0)
Kolchicyna [nM]	9,9 (8,4 – 11,7)	16,7 (13,7 – 20,4)	56,5 (44,5 – 72,2)	9,5 (7,4 – 11,4)	9,0 (7,7 – 10,2)
Kombretastatyna A4 [nM]	1,8 (1,4 – 2,1)	1,6 (1,2 – 1,9)	1,8 (1,5 – 2,1)	1,3 (1,1 – 1,6)	1,6 (1,3 – 2,0)
Paklitaksel [nM]	1,6 (1,1 – 2,1)	2,2 (1,9 – 2,6)	40,6 (36,1 – 45,9)	3,2 (2,3 – 4,3)	1,9 (1,5 – 2,3)
Trichostatyna A [nM]	49,6 (38,5 – 63,0)	42,2 (23,1 – 63,6)	61,7 (50,3 – 74,6)	36,4 (27,8 – 46,1)	52,3 (40,8 – 65,3)
Winblastyna [nM]	0,83 (0,5 – 1,2)	0,72 (0,61 – 0,86)	5,2 (4,1 – 6,5)	0,33 (0,27 – 0,41)	0,53 (0,3 – 0,8)
Winflunina [nM]	55,8 (45,7 – 67,8)	56,7 (39,0 – 96,6)	210,8 (158,9 – 279,1)	32,9 (24,4 – 44,5)	45,0 (35,0 – 58,4)
Winorelbina [nM]	0,86 (0,7 – 1,0)	1,6 (1,4 – 1,8)	42,2 (30,6 – 59,7)	0,76 (0,6 – 1,0)	1,6 (0,9 – 2,7)

Rodzina linii RT-112					
Związek	RT-112	RT-112 <sup>CDDP</sup>	RT-112 <sup>VBL</sup>	RT-112 <sup>GEM</sup>	RT-112 <sup>CDDP/GEM</sup>
Bortezomib [nM]	5,7 (5,4 – 6,0)	4,8 (4,3 – 5,3)	6,0 (5,6 – 6,6)	6,4 (5,9 – 7,2)	5,3 (4,5 – 6,3)
Cisplatyna [μM]	9,1 (7,8 – 10,4)	24,2 (20,8 – 28,1)	7,3 (5,8 – 9,1)	8,3 (6,0 – 11,1)	17,9 (15,5 – 20,8)
Dokсорubicyna [nM]	74,6 (56,4 – 96,3)	50,7 (38,5 – 64,9)	513,7 (387,0 – 675,0)	60,6 (44,8 – 80,0)	166,0 (140,1 – 195,2)
Gemcytabina [nM]	11,9 (7,7 – 17,4)	11,6 (3,1 – 19,4)	7,1 (3,9 – 11,1)	325,0 (254,5 – 413,5)	70,9 (44,8 – 103,5)
Imatynib [μM]	13,5 (12,1 – 14,8)	8,9 (6,8 – 10,8)	10,8 (9,9 – 11,9)	6,2 (5,7 – 7,1)	10,6 (9,2 – 12,3)
Kamptotecyna [nM]	123,6 (83,5 – 172,3)	106,8 (72,3 – 147,6)	86,4 (58,0 – 122,2)	17,6 (7,7 – 30,5)	162,6 (101,3 – 238,3)
Kolchicyna [nM]	21,2 (19,4 – 23,3)	15,4 (14,4 – 16,5)	72,4 (66,5 – 78,7)	16,7 (15,9 – 17,7)	14,0 (12,8 – 15,5)
Kombretastatyna A4 [nM]	7,7 (6,6 – 9,0)	4,9 (4,5 – 5,3)	4,6 (4,2 – 5,0)	2,7 (2,5 – 2,9)	3,9 (3,4 – 4,5)
Paklitaksel [nM]	1,2 (0,9 – 1,6)	2,6 (2,3 – 3,0)	44,8 (39,6 – 50,9)	1,7 (1,6 – 1,8)	2,1 (1,8 – 2,3)
Trichostatyna A [nM]	112,4 (104,4 – 121,1)	82,6 (68,2 – 98,0)	76,3 (64,2 – 89,4)	118,8 (108,5 – 129,6)	70,0 (58,3 – 83,2)
Winblastyna [nM]	0,50 (0,4 – 0,6)	0,34 (0,3 – 0,4)	7,8 (7,1 – 8,6)	0,35 (0,3 – 0,4)	0,21 (0,2 – 0,3)
Winflunina [nM]	64,4 (57,6 – 71,8)	56,4 (52,5 – 60,6)	439,6 (384,0 – 506,8)	43,3 (41,1 – 45,6)	33,4 (28,6 – 38,1)
Winorelbina [nM]	0,92 (0,8 – 1,1)	0,90 (0,8 – 1,0)	64,5 (58,4 – 71,8)	0,74 (0,7 – 0,8)	0,53 (0,4 – 0,7)

Rodzina linii TCC-SUP					
Związek	TCC-SUP	TCC-SUP <sup>CDDP</sup>	TCC-SUP <sup>VBL</sup>	TCC-SUP <sup>GEM</sup>	TCC-SUP <sup>CDDP/GEM</sup>
Bortezomib [nM]	5,7 (5,2 – 6,2)	4,2 (3,8 – 4,6)	11,8 (11,2 – 12,5)	7,7 (7,4 – 8,1)	3,0 (2,7 – 3,1)
Cisplatyna [μM]	1,5 (1,2 – 1,8)	27,5 (24,4 – 31,0)	1,5 (1,3 – 1,7)	6,7 (6,0 – 7,4)	15,1 (13,4 – 17,4)
Dokсорubicyna [nM]	69,6 (52,8 – 89,5)	144,7 (109,4 – 185,6)	1326 (1155 – 1517)	341,3 (274,9 – 418,3)	68,2 (49,1 – 90,1)
Gemcytabina [nM]	10,4 (3,4 – 20,6)	3,2 (1,5 – 4,9)	6,6 (5,8 – 7,5)	133,2 (73,2 – 205,1)	95,1 (80,4 – 111,5)
Imatynib [μM]	13,1 (12,3 – 13,9)	19,4 (18,2 – 20,6)	12,7 (11,8 – 13,7)	17,3 (16,7 – 17,9)	16,5 (15,4 – 17,7)
Kamptotecyna [nM]	43,5 (34,9 – 53,5)	55,3 (35,1 – 81,3)	24,2 (22,1 – 26,4)	71,8 (46,1 – 103,5)	59,8 (44,5 – 78,2)
Kolchicyna [nM]	8,8 (8,1 – 9,6)	11,0 (9,7 – 12,6)	139,1 (100,3 – 192,6)	15,9 (13,1 – 19,5)	7,8 (6,9 – 8,6)
Kombretastatyna A4 [nM]	2,3 (2,1 – 2,6)	2,6 (2,3 – 2,9)	3,8 (3,2 – 4,6)	110,0 (99,8 – 123,6)	1,6 (1,4 – 1,9)
Paklitaksel [nM]	1,6 (1,4 – 1,8)	1,2 (1,1 – 1,4)	97,6 (89,6 – 106,0)	30,6 (27,6 – 33,9)	1,1 (1,0 – 1,3)
Trichostatyna A [nM]	140,6 (124,5 – 159,4)	101,9 (90,7 – 114,2)	144,3 (123,5 – 166,3)	90,6 (60,5 – 120,5)	89,5 (69,4 – 108,0)
Winblastyna [nM]	0,25 (0,2 – 0,3)	0,22 (0,2 – 0,3)	26,2 (23,2 – 29,6)	2,6 (2,2 – 3,2)	0,13 (0,11 – 0,15)
Winflunina [nM]	23,7 (20,6 – 27,0)	16,9 (14,1 – 20,1)	720,4 (636,8 – 820,0)	86,7 (76,2 – 98,4)	5,5 (4,1 – 7,0)
Winorelbina [nM]	0,75 (0,7 – 0,8)	0,60 (0,5 – 0,7)	69,0 (57,7 – 82,0)	10,6 (8,8 – 12,7)	0,42 (0,36 – 0,49)



#### 4.2.2 ANALIZA EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW W LIZATACH KOMÓRKOWYCH

Wpływ na rozwój lekooporności w komórkach nowotworowych ma szereg genów związanych m.in. z: fenotypem lekoopornym komórek nowotworowych, agresywnością oraz inwazyjnością komórek nowotworowych. Otrzymane w poprzednim badaniu różnice w profilach oporności krzyżowej w komórkach linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego mogą mieć związek ze zmianami w ekspresji tychże genów. W związku z czym przeanalizowano ekspresję wybranych genów (**Tab. 25**) w komórkach wszystkich charakteryzowanych 15 linii komórkowych za pomocą techniki Real-Time PCR. Komórki przed wykonaniem lizatów były hodowane na szalkach przez 24h. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresów słupkowych jako krotność zmiany ekspresji badanych genów w odniesieniu do odpowiedniej kontroli  $\pm$ SD.

*Tab. 25. Badane geny oraz ich funkcje*

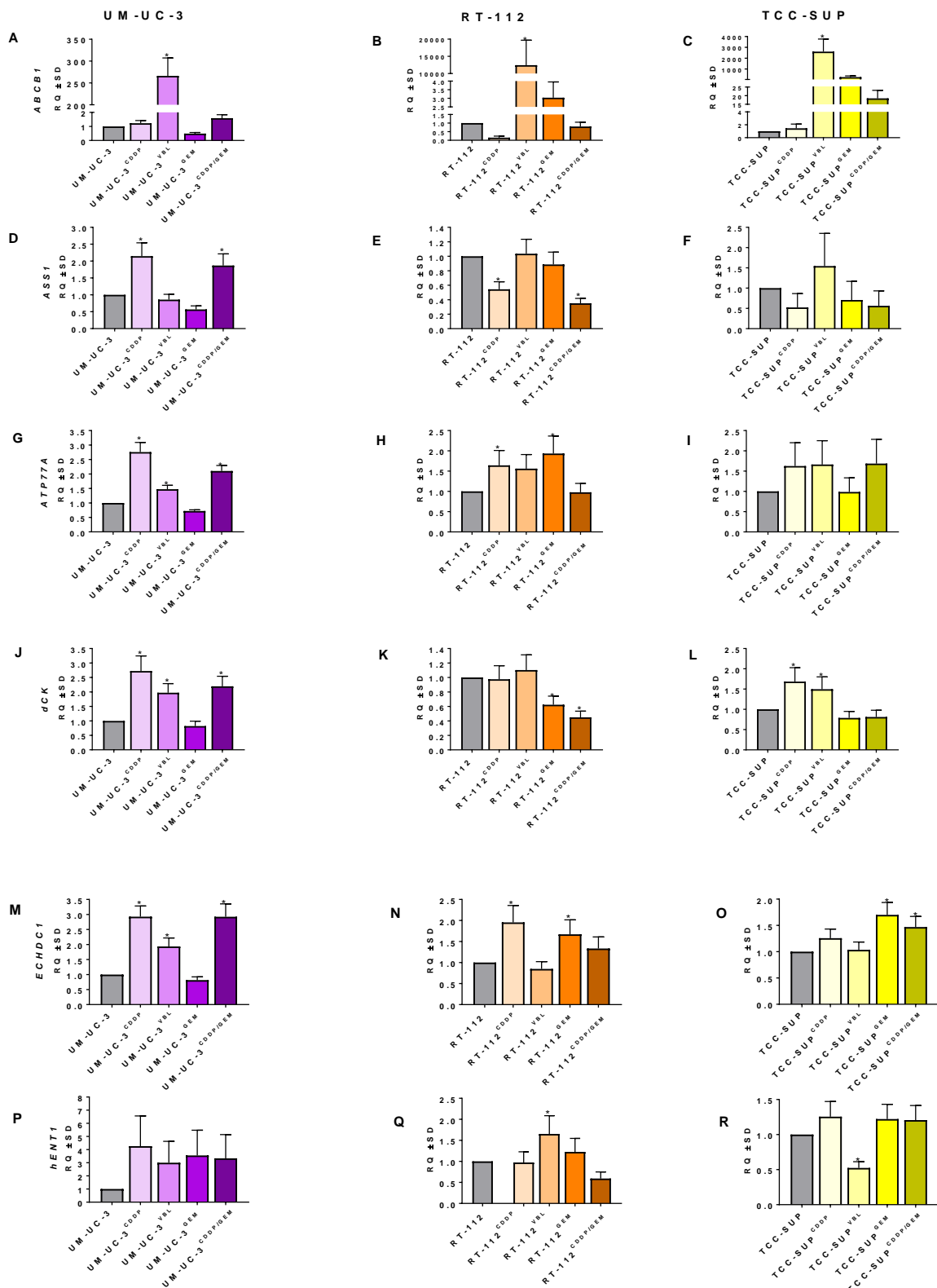
BADANY GEN	FUNKCJA
<i>ABCB1</i>	koduje białko o tej samej nazwie. Białko o charakterze pompy błonowej, posiadające szeroką specyficzność substratową Białko ABCB1 związane jest z opornością na alkaloidy <i>vinca</i> . [171].
<i>ASS1</i>	syntaza argininobursztynianowa 1, koduje białko o tej samej nazwie. Zmniejszona ekspresja <i>ASS1</i> często obserwowana jest w inwazyjnym oraz opornym na cisplatynę raku pęcherza moczowego, co wskazuje, iż tego typu nowotwory są zależne od zewnątrzkomórkowej argininy, sprzyjającej wzrostowi nowotworów [172].
<i>ATP7A</i>	gen kodujący białko odpowiedzialne za wypompowywanie cisplatyny z komórek [173].
<i>dCK</i>	jest niezbędny do fosforylacji kilku dezoksyrybonukleozydów i ich analogów nukleozydowych. Niska ekspresja <i>dCK</i> jest związana z opornością na chemioterapeutyki [174].
<i>ECHDC1</i>	bierze udział w rozwoju lekooporności komórek nowotworowych na gemcytabinę. Ponadto bierze udział w beta-oksydacji kwasów tłuszczowych [174].
<i>hENT1</i>	jest członkiem rodziny transporterów nukleozydów. Koduje glikoproteinę transbłonową, która lokalizuje się w błonach mitochondrialnych Bierze udział w wychwytywaniu nukleozydów z otaczającego środowiska. Obniżenie ekspresji tego genu jest związane z opornością na gemcytabinę [174].
<i>MT2A</i>	gen kodujący metalotioneinę 2. Jest to wewnątrzkomórkowe białko bogate w cysteinę, inaktywujące cisplatynę poprzez interakcję z nią oraz usuwanie reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach poddanych działaniu cisplatyną [175].
<i>SAT1</i>	gen uważany za predykcyjny biomarker w ponownym uwrażliwieniu raka pęcherza moczowego na cisplatynę. Jego niska ekspresja występuje w komórkach nowotworowych opornych na cisplatynę [176].
<i>SLC3A1</i>	koduje białko CTR1, które jest odpowiedzialne za transport cisplatyny [174].
<i>TUB<math>\beta</math>3</i>	koduje $\beta$ III tubulinę. Nadekspresja tego genu obserwowana jest w lekoopornych nowotworach [174].

Komórki linii opornych na dany lek, ale pochodzące z różnych linii wyjściowych wykazały znacząco różny profil ekspresji badanych genów (**Ryc. 12, 13**). Statystycznie istotne zmiany zaobserwowano tylko w kilku przypadkach komórek linii opornych na cisplatinę. Komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup> jako jedyne spośród trzech linii opornych na cisplatinę wykazały 2-krotny wzrost ekspresji następujących genów: *ASS1* (**Ryc. 12D**), *MT2A* (**Ryc. 13A**), *SLC3A1* (**Ryc. 13G**) oraz *TUBβ3* (**Ryc. 13J**), a także 3-krotny wzrost ekspresji *ATP7A* (**Ryc. 12G**), *dCK* (**Ryc. 12J**) oraz *ECHDC1* (**Ryc. 12M**) w porównaniu do linii wyjściowej UM-UC-3. Natomiast komórki linii RT-112<sup>CDDP</sup> jako jedyne spośród linii opornych na cisplatinę wykazały zmniejszoną ekspresję następujących genów: *ABCB1* 6-krotnie (**Ryc. 12B**), *ASS1* 2-krotnie (**Ryc. 12E**) oraz *MT2A* 5-krotnie (**Ryc. 13B**), a także 2-krotnie zwiększoną ekspresję genów: *ATP7A* (**Ryc. 13H**) oraz *ECHDC1* (**Ryc. 13N**) w porównaniu do komórek linii wyjściowej RT-112. Ponadto komórki linii TCC-SUP<sup>CDDP</sup> jako jedyne spośród komórek linii opornych na cisplatinę wykazały 3-krotnie obniżony poziom *SAT1* (**Ryc. 13F**), ale także 3-krotnie zwiększoną ekspresję *TUBβ3* (**Ryc. 13L**) w porównaniu do komórek linii wyjściowej TCC-SUP.

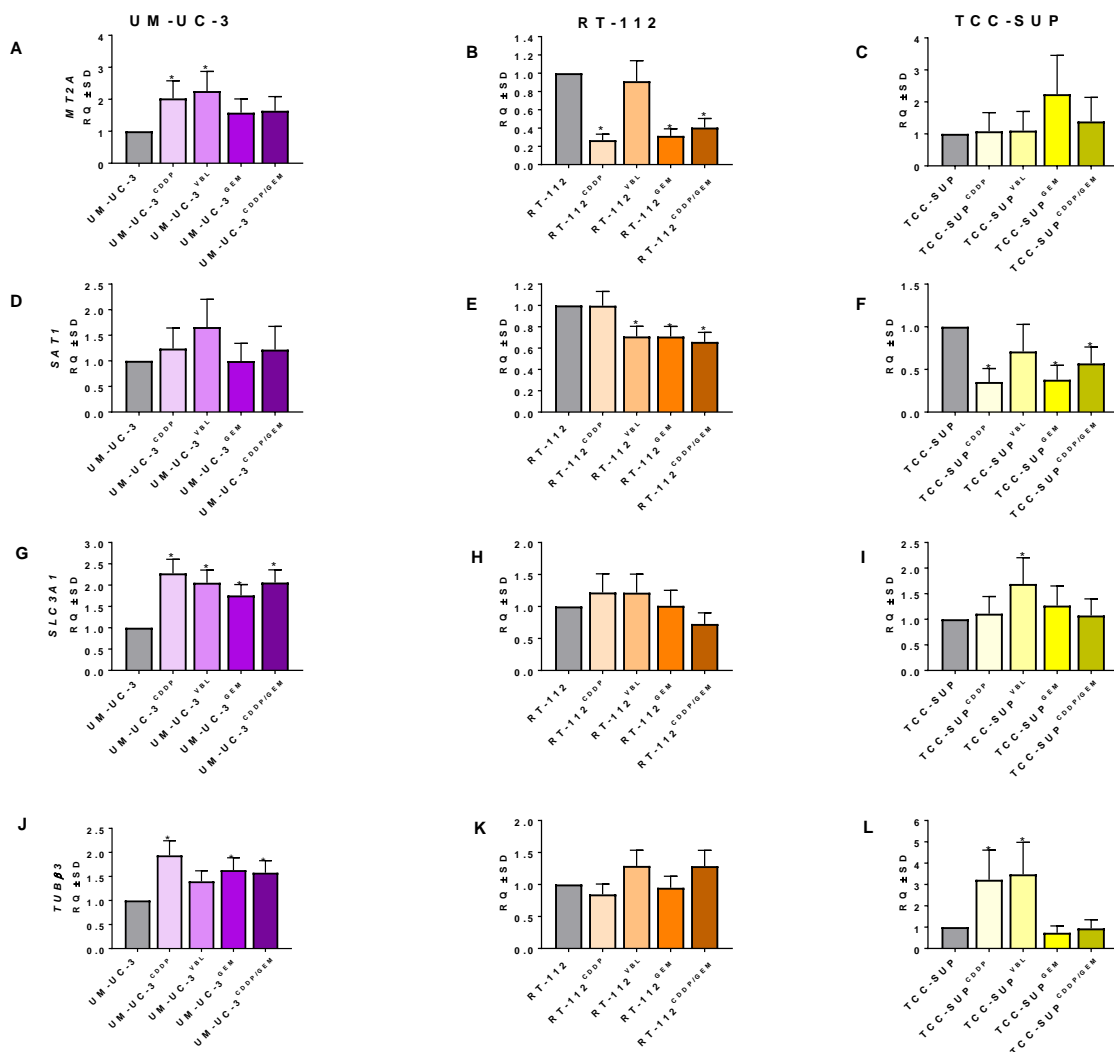
Komórki wszystkich trzech linii opornych na winblastynę charakteryzowały się istotnie zwiększoną ekspresją genu *ABCB1*, z najwyższym poziomem w komórkach RT-112<sup>VBL</sup> (**Ryc. 12B**) oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup> (**Ryc. 12C**); odpowiednio większy 12 433 razy oraz 2 271 razy w stosunku do komórek odpowiednich linii wyjściowych. Komórki linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> jako jedyne spośród linii opornych na winblastynę wykazały 2-krotnie wyższą ekspresję następujących genów: *ATP7A* (**Ryc. 12G**), *dCK* (**Ryc. 12J**), *ECHDC1* (**Ryc. 12M**), *MT2A* (**Ryc. 13A**) oraz *SLC3A1* (**Ryc. 13G**) w porównaniu do komórek linii wyjściowej UM-UC-3. Natomiast komórki linii TCC-SUP<sup>VBL</sup> dodatkowo, jako jedyne spośród linii opornych na winblastynę, wykazały 2-krotnie obniżoną ekspresję *hENTI* (**Ryc. 12R**), a także 3-krotnie zwiększoną ekspresję *TUBβ3* (**Ryc. 13L**), podczas gdy komórki linii RT-112<sup>VBL</sup> wykazały nieznacznie obniżoną ekspresję *SAT1*, tzn. 1,25 razy w porównaniu do komórek odpowiednich linii wyjściowych (**Ryc. 13E**).

Zarówno komórki linii UM-UC-3<sup>GEM</sup>, jak i UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> wykazały 2-krotnie podwyższoną ekspresję genu *SLC3A1* (**Ryc. 13G**) oraz prawie 2-krotny wzrost ekspresji *TUBβ3* w porównaniu do komórek linii wyjściowej UM-UC-3 (**Ryc. 13J**). Dodatkowo zaobserwowano, iż komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> wykazały 2-krotny wzrost ekspresji genów: *ASS1* (**Ryc. 12D**), *ATP7A* (**Ryc. 12G**), *dCK* (**Ryc. 12J**) oraz 3-krotny wzrost ekspresji *ECHDC1* (**Ryc. 12M**) w porównaniu do komórek linii UM-UC-3. Komórki linii RT-112<sup>GEM</sup>, jak i RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> cechowały się 2-krotnie obniżoną ekspresją

następujących genów: *dCK* (**Ryc. 12K**) oraz *SAT1* (**Ryc. 13E**), a także 3-krotnie obniżoną ekspresją *MT2A* (**Ryc. 13B**) Ponadto zaobserwowano 3-krotnie zmniejszoną ekspresję genu *ASS1* w komórkach RT-112<sup>GEM/CDDP</sup> (**Ryc. 12E**) oraz 2-krotnie zwiększoną ekspresję genów: *ATP7A* (**Ryc. 12H**) oraz *ECHDC1* (**Ryc. 12N**) w komórkach RT-112<sup>GEM</sup> w porównaniu do komórek linii wyjściowej RT-112. Komórki linii TCC-SUP<sup>GEM</sup> oraz TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> jako jedyne odporne na gemcytabinę wykazały 2-krotnie podwyższoną ekspresję genu *ECHDC1* (**Ryc. 12O**), ale również posiadają 2-krotnie obniżoną ekspresję *SAT1* w porównaniu do komórek linii TCC-SUP (**Ryc. 13F**).

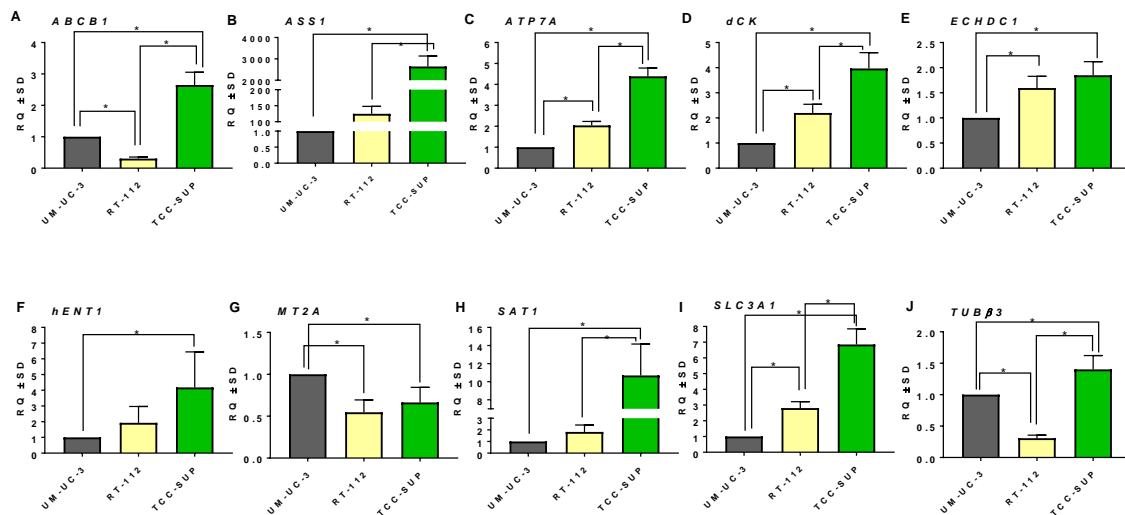


**Ryc. 12.** Porównanie ekspresji wybranych genów w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego. Wyniki normalizowano do ilości mRNA GAPDH i odniesiono je do linii wyjściowych (wrażliwych) w każdym panelu. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$



Ryc. 13. Porównanie ekspresji wybranych genów w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego. Wyniki normalizowano do ilości mRNA GAPDH i odniesiono je do linii wyjściowych (wrażliwych) w każdym panelu. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$

Komórki linii wyjściowych wykazały bardzo zróżnicowany profil ekspresji większości testowanych genów (Ryc. 14). Statystycznie istotne różnice zaobserwowano m.in. dla genów: *ABCB1* (Ryc. 14A) oraz *TUB $\beta$ 3* (Ryc. 14J), gdzie komórki linii RT-112 wykazały najniższą ekspresję tych genów, ale także dla genów: *ATP7A*, *dCK*, *SAT1* oraz *SLC3A1* (Ryc. 14C, D, H oraz I), gdzie komórki linii TCC-SUP wykazały najwyższą ekspresję wymienionych powyżej genów. Znacznie wyższą ekspresję genu *ASS1* zaobserwowano szczególnie w komórkach linii TCC-SUP, ale również RT-112 – wzrost ekspresji tego genu w porównaniu do komórek linii UM-UC-3 wynosił odpowiednio 2 646 razy i 124 razy (Ryc. 14B).



**Ryc. 14.** Porównanie ekspresji wybranych genów w komórkach linii wyjściowych raka pęcherza moczowego. Wyniki normalizowano do ilości mRNA GAPDH i odniesiono je do linii UM-UC-3. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD).  
 Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukey. \*  $p < 0,05$

Zbadanie zmian w ekspresji 10 genów związanych m.in. z fenotypem lekoopornym komórek nowotworowych, agresywnością oraz inwazyjnością w komórkach 15 linii lekoopornych pokazało znaczne różnice w ekspresji tychże genów pomiędzy liniami opornymi na ten sam związek ale wywodzącymi się z różnych linii wyjściowych.

#### 4.2.3 ANALIZA POZIOMU WYBRANYCH BIAŁEK W LIZATACH KOMÓRKOWYCH

W rozwój lekooporności komórek nowotworowych zaangażowanych jest szereg białek związanych m.in. z cyklem komórkowym czy też będących składowymi cytoszkieletu. W związku z tym, następny etap charakteryzowania komórek panelu linii lekoopornych oraz wrażliwych raka pęcherza moczowego obejmował przeprowadzenie analizy poziomu wybranych białek (**Tab. 26**) za pomocą techniki western blot. Komórki przed wykonaniem lizatów były hodowane na szlakach przez 24h. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresów słupkowych jako średni poziom badanych białek  $\pm$ SD.

*Tab. 26. Badane białka oraz ich funkcje*

BADANE BIAŁKO	FUNKCJA
<b>ABCB1</b>	ABCB1 to białko związane z opornością na alkaloidy <i>vinca</i> . Należy do rodziny białek ABC. Białko o charakterze pompy błonowej, posiadające szeroką specyficzność substratową [177].
<b>ASS1</b>	Syntaza argininobursztynianowa 1. ASS1 uważane jest za wskaźnik inwazyjności nowotworów. Niezbędny enzym w trakcie biosyntezy argininy [178].
<b>cyklina B1</b>	Jest to białko regulujące progresję cyklu komórkowego, tworząc kompleks z Cdc2. Wzrost ekspresji cykliny B prowadzi do oporności na cisplatinę [177].
<b><math>\beta</math>-tubulina</b>	$\beta$ -tubulina to białko będące składnikiem cytoszkieletu. Buduje mikrotubule, niezbędne do podziału komórki.
<b><math>\beta</math>III tubulina</b>	$\beta$ III tubulina uważana jest za „wskaźnik” mówiący o agresywności nowotworu. Najczęściej wzrost ekspresji tego białka świadczy o złym rokowaniu dla pacjenta [178].
<b>Eg5</b>	Eg5 to białko związane z cyklem komórkowym oraz z lekoopornością. Białko to uczestniczy w budowaniu wrzeciona kinezoyny. Odgrywa jedną z kluczowych ról podczas tworzenia dwubiegunowych wrzecion oraz rozdzielania zduplikowanych chromosomów we wczesnej fazie mitozy [179].
<b>MCL1</b>	MCL1 to białko związane z lekoopornością. MCL1 należy do wielodomenowej podrodziny Bcl-2, posiadającej cechy inhibitorów apoptozy [180]. Wzrost ekspresji MCL1 jest odpowiedzialny za rozwój oporności na cisplatinę w wielu typach nowotworów, m.in.: w niedrobnokomórkowym raku płuc [181].
<b>p21</b>	p21 jest inhibitorem kinaz cyklinozależnych, wpływa na regulację cyklu komórkowego w fazie G1 oraz G2/M. Obniżenie ekspresji tego białka skutkuje rozwojem wielu nowotworów [182].
<b>p27</b>	białko to należy do inhibitorów kinaz cyklinozależnych hamujących progresję cyklu komórkowego. p27 oddziałuje z Cdk2 oraz cyklina E aby uniemożliwić wejście komórki w fazę S. Ponadto białko p27 posiada wiele innych funkcji, m.in.: bierze udział w adhezji komórek czy apoptozie [183].

Poziom badanych białek w komórkach linii opornych na ten sam cytostatyk, ale wywodzących się z innych linii wyjściowych jest znacząco różny. Statystycznie istotne zmiany poziomu białek w komórkach linii opornych na cisplatinę w porównaniu do linii

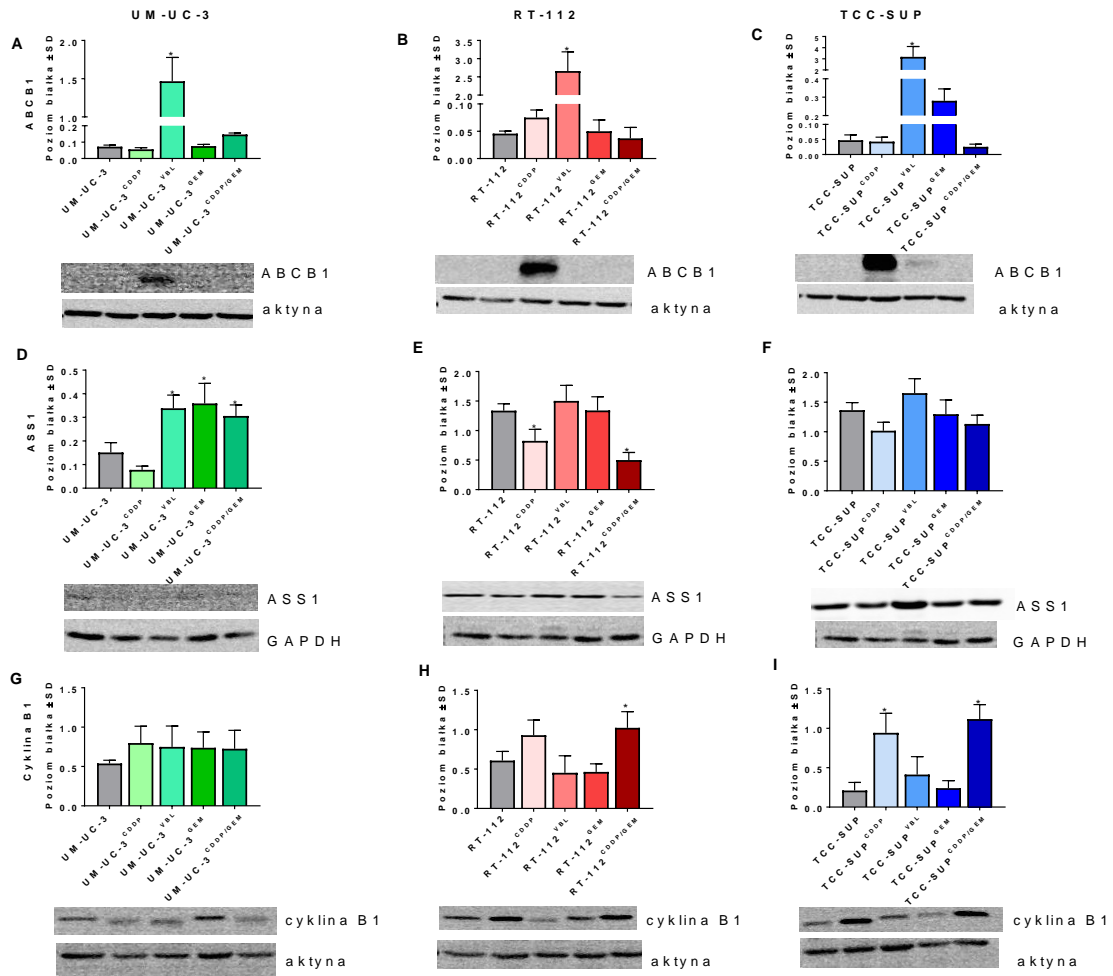
wyjściowych zaobserwowano w następujących przypadkach: (1) Komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup> jako jedyne spośród trzech linii opornych na cisplatynę wykazywały prawie 2-krotny wzrost poziomu białka Eg5 (**Ryc. 16G**), (2) Komórki linii RT-112<sup>CDDP</sup> jako jedyne wykazywały 2-krotnie obniżony poziom białka ASS1 (**Ryc. 15E**) oraz 2-krotnie podwyższony poziom białka MCL1 (**Ryc. 17B**), a także 3-krotnie podwyższony poziom białka p27 (**Ryc. 17H**), (3) Komórki linii TCC-SUP<sup>CDDP</sup> również jako jedyne spośród trzech linii opornych na cisplatynę wykazywały 5-krotny wzrost poziomu cykliny B1 (**Ryc. 15I**), ale również 3-krotne obniżenie poziomu białka p21 (**Ryc. 17F**).

Komórki wszystkich trzech linii opornych na winblastynę wykazywały istotnie podwyższony poziom białka ABCB1: 21-krotnie, 68-krotnie oraz 79-krotnie odpowiednio w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>VBL</sup> oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup> w porównaniu do komórek swoich linii wyjściowych (**Ryc. 15A, B, C**). Ponadto komórki linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> jako jedyne spośród linii opornych na winblastynę wykazywały 2-krotnie podwyższony poziom białka ASS1 w porównaniu do komórek linii wyjściowej (**Ryc. 15D**). Komórki linii RT-112<sup>VBL</sup>, również jako jedyne spośród linii opornych na winblastynę, charakteryzowały się 2-krotnie obniżonym poziomem białka Eg5 (**Ryc. 16H**) oraz 3-krotnie  $\beta$ III tubuliny w porównaniu do komórek linii wyjściowej (**Ryc. 16E**). Natomiast komórki linii TCC-SUP<sup>VBL</sup> wykazywały 2-krotnie obniżony poziom białka p21 w porównaniu do komórek linii wyjściowej (**Ryc. 17F**).

Spośród komórek linii opornych na gemcytabinę jedyne komórki linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> wykazywały 2-krotnie podwyższony poziom białka ASS1 (**Ryc. 15D**) oraz Eg5 w porównaniu do komórek linii wyjściowej (**Ryc. 16G**).

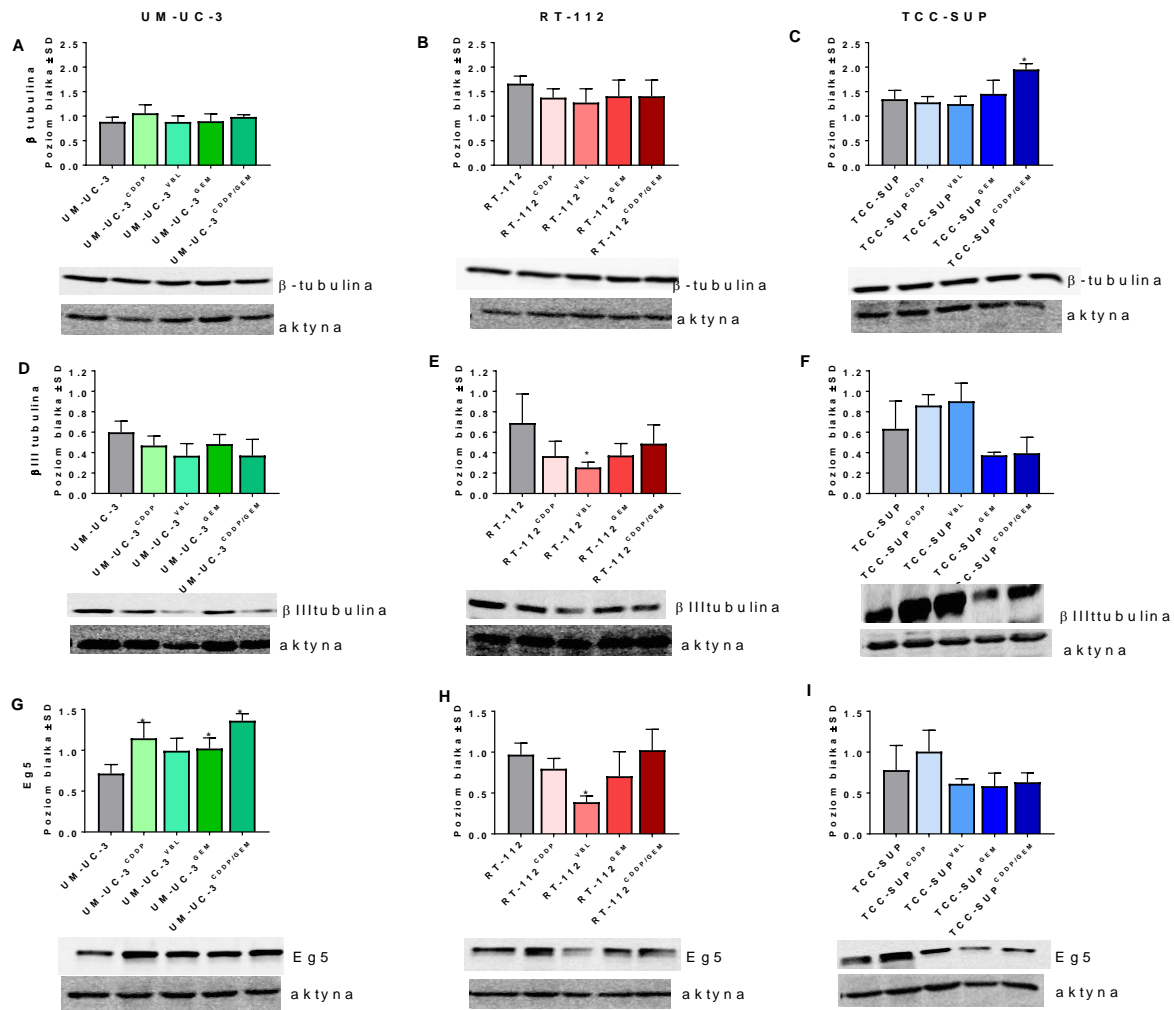
Zarówno komórki linii RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> oraz TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> wykazywały istotnie podwyższony poziom cykliny B1: 2-krotnie oraz 6-krotnie w porównaniu do komórek odpowiednich linii wyjściowych (**Ryc. 15H, I**). Ponadto komórki linii RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> jako jedyne spośród trzech linii opornych na cisplatynę oraz gemcytabinę wykazywały także 3-krotnie obniżony poziom białka ASS1 w porównaniu do komórek linii wyjściowej (**Ryc. 15E**). Natomiast w komórkach linii TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> wykazano prawie 2-krotnie podwyższony poziom  $\beta$ -tubuliny (**Ryc. 16C**) oraz 3-krotnie podwyższony poziom MCL1 (**Ryc. 17C**), a 4-krotnie obniżony poziom białka p21 w porównaniu do komórek linii wyjściowej (**Ryc. 17F**). Warto również zaznaczyć, iż komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> jako jedyne wykazały 2-krotnie podwyższone poziomy białek: ASS1 (**Ryc. 15D**) oraz Eg5 (**Ryc. 16G**) w porównaniu do komórek linii wyjściowej.





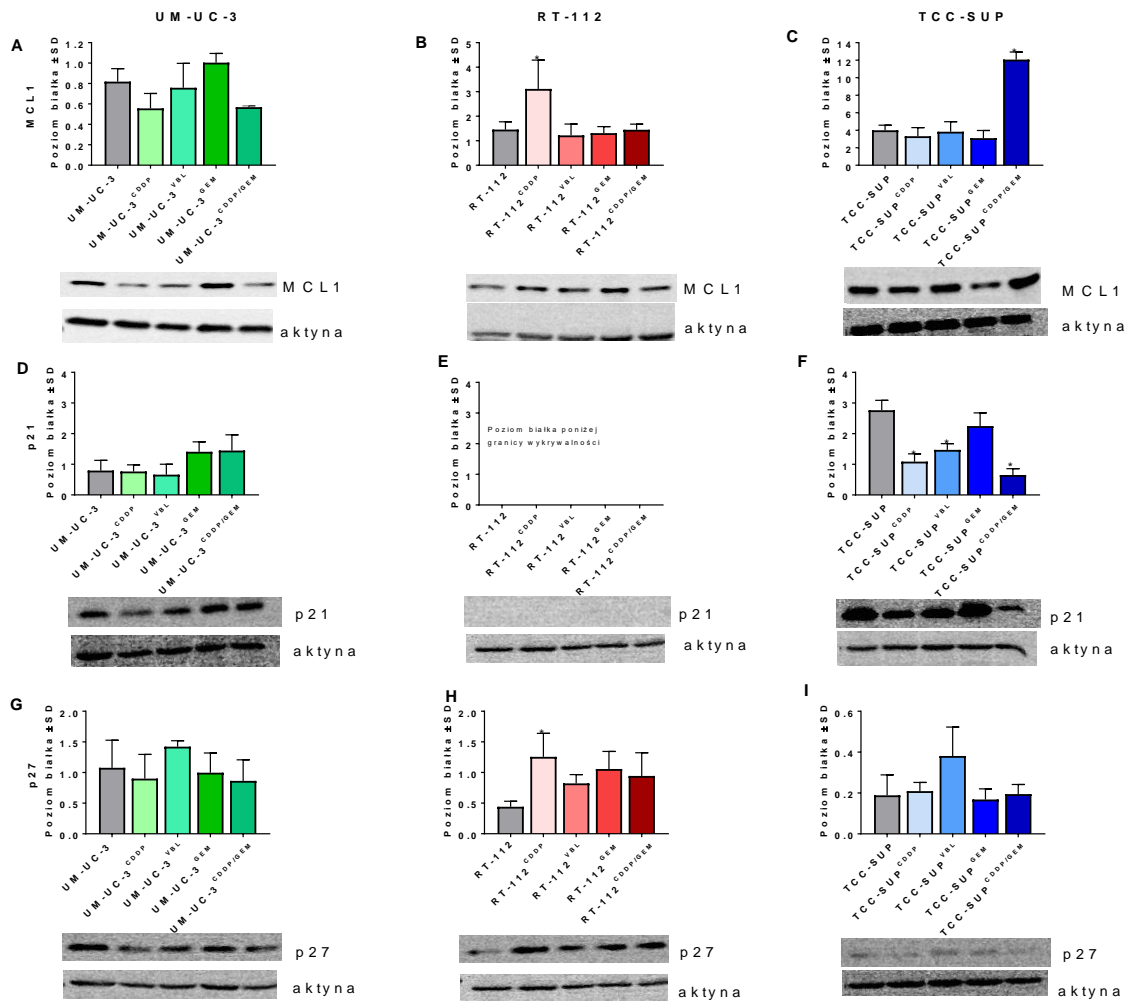
**Ryc. 15.** Porównanie poziomu wybranych białek w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego. Wyniki (densytometrię) normalizowano do poziomu  $\beta$ -aktyny lub GAPDH (w przypadku białka ASS1) i przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Pod wykresami przedstawiono reprezentatywne zdjęcia western blot

Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta \*  $p < 0,05$



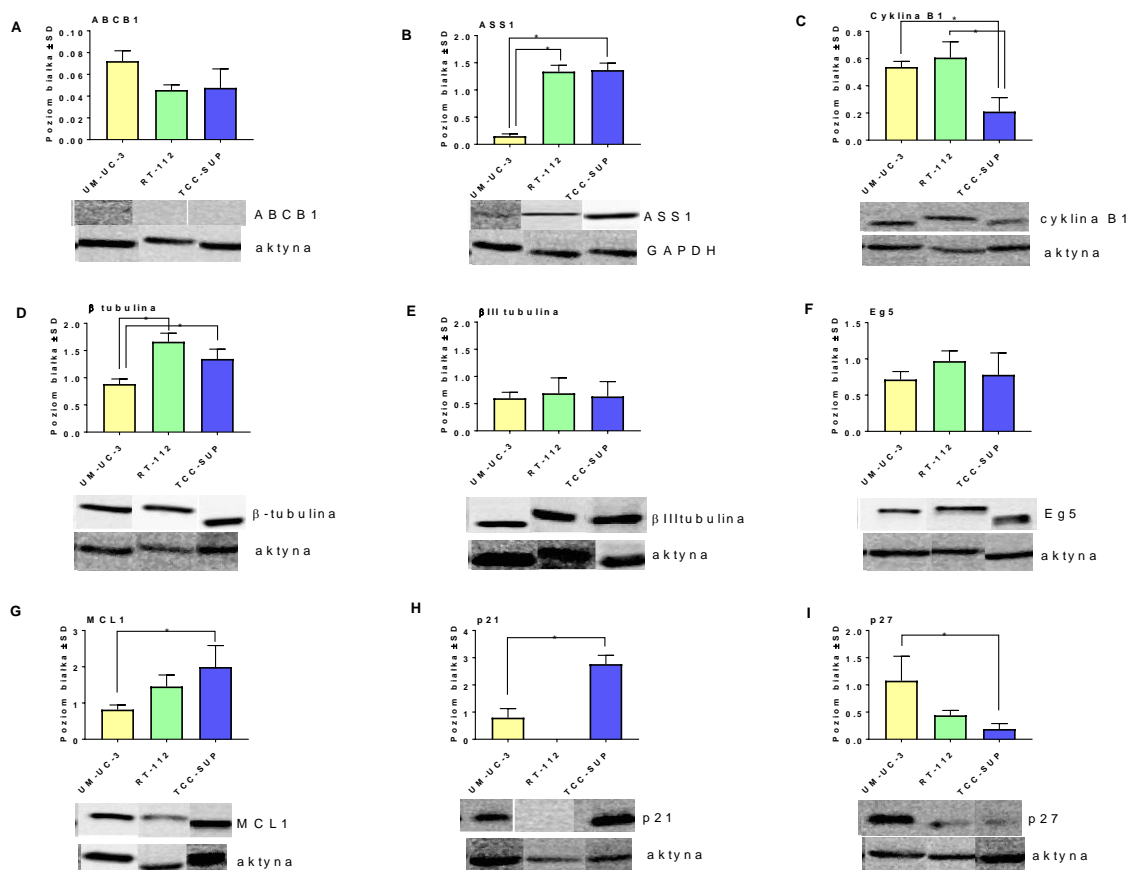
**Ryc. 16.** Porównanie poziomu wybranych białek w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego. Wyniki (densytometrię) normalizowano do poziomu  $\beta$ -aktyny lub GAPDH (w przypadku białka ASS1) i przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Pod wykresami przedstawiono reprezentatywne zdjęcia western blot

Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$



**Ryc. 17.** Porównanie poziomu wybranych białek w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego. Wyniki (densytometrię) normalizowano do poziomu  $\beta$ -aktyny lub GAPDH (w przypadku białka ASS1) i przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Pod wykresami przedstawiono reprezentatywne zdjęcia western blot  
 Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$

W przypadku komórek linii wyjściowych (**Ryc. 18**) zaobserwowano istotne różnice w ekspresji następujących białek: ASS1 (**Ryc. 18B**), MCL1 (**Ryc. 18G**), p21 (**Ryc. 18H**), p27 (**Ryc. 18I**),  $\beta$ -tubuliny (**Ryc. 18D**) oraz cykliny B1 (**Ryc. 18C**) zwłaszcza pomiędzy komórkami linii TCC-SUP oraz UM-UC-3. Białka p21 nie wykryto w komórkach linii RT-112 (**Ryc. 18H**), co jest zgodne z danymi literaturowymi [184].



**Ryc. 18.** Porównanie poziomu wybranych białek w komórkach linii wyjściowych raka pęcherza moczowego. Wykonano analizę densytometryczną. Wyniki normalizowano do poziomu β-aktyny lub GAPDH (w przypadku białka ASS1) i przedstawiono w formie wykresów słupkowych jako średni poziom badanych białek ± odchylenie standardowe (SD). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukey (z wyjątkiem wyników dla białka p21, dla którego zastosowano test t). \*  $p < 0,05$

Zbadanie poziomu ekspresji 9 białek związanych m.in. z cytoszkieletem, cyklem komórkowym oraz lekoopornością w komórkach 15 linii lekoopornych raka pęcherza moczowego ukazało znaczne różnice w poziomie ekspresji tychże białek pomiędzy liniami opornymi na ten sam związek ale wywodzącymi się z różnych linii wyjściowych. Wyniki, które udało się uzyskać wskazują, iż poziom przeanalizowanych białek ma znaczenie dla rozwoju lekooporności w badanych liniach komórkowych, tak jak np. białko ABCB1, którego wzrost poziomu jest obserwowany w komórkach wszystkich linii opornych na winblastynę.

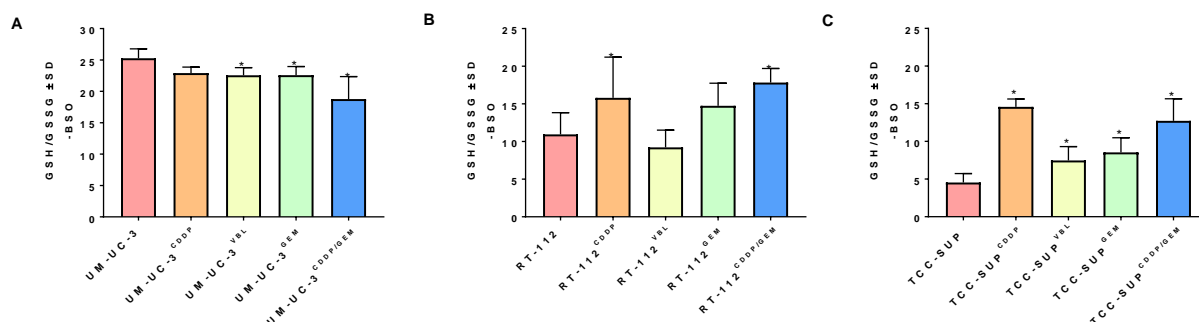
#### **4.2.4 ANALIZA STOSUNKU GLUTATIONU ZREDUKOWANEGO DO UTLENIONEGO ORAZ ILOŚCI GLUTATIONU CAŁKOWITEGO W BADANYCH KOMÓRKACH LINII WYJŚCIOWYCH ORAZ LEKOOPORNYCH**

Glutation bierze udział w rozwijaniu lekooporności komórek nowotworowych m.in. na cisplatynę czy też gemcytabinę. Podwyższony poziom GSH występuje w wielu typach nowotworów, co sprawia, że komórki te są odporne na działanie chemioterapeutyków [185, 186]. Aby ocenić wpływ glutationu na rozwinięcie lekooporności zbadano stosunek glutationu zredukowanego (GSH) do utlenionego (GSSG) oraz ilości glutationu całkowitego w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego. Przed wykonaniem eksperymentu komórki były hodowane na płycie 96-dołkowej przez 24h. W części eksperymentu wykorzystano komórki poddane działaniu 100  $\mu$ M roztworu kwasu (2*R*)-2-amino-4-(*S*-butylosulfonimidoilo)butanowego (BSO) w medium hodowlanym przez 24 godziny. Celem użycia BSO było zahamowanie aktywności syntazy  $\gamma$ -glutamylcysteiny (enzymu biorącego udział w syntezie GSH), co wiąże się z obniżeniem poziomu glutationu całkowitego w komórkach. Przedstawione wyniki znormalizowano w oparciu o ilość białka w próbce, które oznaczono metodą SRB. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresów słupkowych jako średni stosunek GSH/GSSG  $\pm$ SD (*Ryc. 19, 20*) oraz jako średnią ilość glutationu całkowitego  $\pm$ SD (*Ryc. 21, 22*).

W przypadku komórek nie traktowanych BSO wyniki dotyczące stosunku glutationu zredukowanego do utlenionego przedstawiają się następująco (*Ryc. 19*) – wśród linii opornych na cisplatynę 1,5-krotny wzrost stosunku GSH/GSSG zaobserwowano w komórkach linii RT-112<sup>CDDP</sup> (*Ryc. 19B*), a w komórkach linii TCC-SUP<sup>CDDP</sup> 3-krotny wzrost (*Ryc. 19C*) w porównaniu do komórek odpowiednich linii wyjściowych. Natomiast wśród linii opornych na winblastynę stosunek ten uległ zmniejszeniu 1,15 razy w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> (*Ryc. 19A*) oraz 2 razy w komórkach linii TCC-SUP<sup>VBL</sup> (*Ryc. 19C*) w porównaniu do komórek odpowiednich linii wyjściowych. Stosunek GSH/GSSG uległ także 2-krotnemu zmniejszeniu w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> (*Ryc. 19A*) oraz TCC-SUP<sup>GEM</sup> (*Ryc. 19C*) w porównaniu do odpowiednich linii wyjściowych. Interesujące wyniki zaobserwowano w przypadku komórek linii opornych zarówno na cisplatynę jak i gemcytabinę, ponieważ stosunek GSH/GSSG w komórkach UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> (*Ryc. 19A*) uległ zmniejszeniu 1,3 razy, natomiast w komórkach RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> (*Ryc. 19B*) oraz TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> (*Ryc. 19C*)

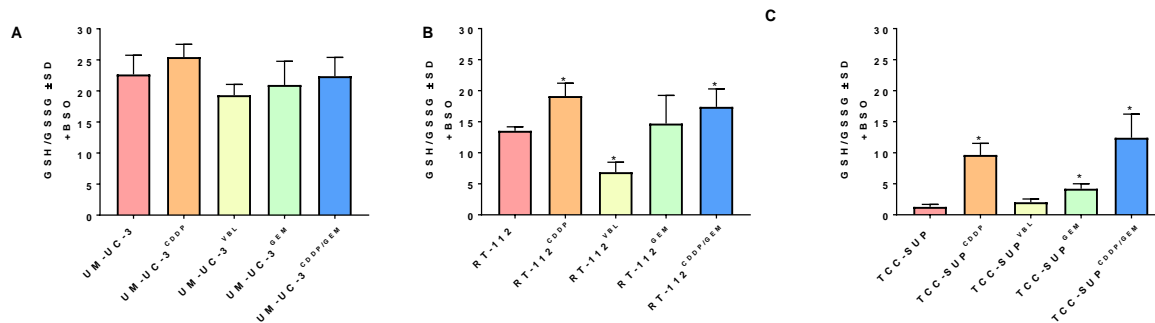
wzrósł odpowiednio 2-krotnie oraz 3-krotnie w porównaniu do komórek odpowiednich linii wyjściowych.

Wyniki dotyczące stosunku GSH/GSSG w komórkach traktowanych BSO zostały przedstawione na **rycynie 20**. Podobnie jak w przypadku wyników dla komórek nie traktowanych BSO, wśród linii opornych na cisplatynę 1,5-krotny wzrost stosunku GSH/GSSG zaobserwowano w komórkach linii RT-112<sup>CDDP</sup> (**Ryc. 20B**), a w komórkach linii TCC-SUP<sup>CDDP</sup> 10-krotny wzrost (**Ryc. 20C**) w porównaniu do komórek linii wyjściowych. Natomiast komórki linii opornych zarówno na cisplatynę jak i gemcytabinę wykazały 1,3-krotny wzrost stosunku GSH/GSSG w komórkach linii RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> (**Ryc. 20B**) oraz 10-krotny w komórkach linii TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> (**Ryc. 20C**) w porównaniu do komórek odpowiednich linii wyjściowych. Wśród komórek linii opornych na winblastynę około 2-krotny spadek stosunku GSH/GSSG zaobserwowano w komórkach linii RT-112<sup>VBL</sup> (**Ryc. 20B**), natomiast pośród komórek linii opornych na gemcytabinę jedynie w przypadku komórek TCC-SUP<sup>GEM</sup> (**Ryc. 20C**) zaobserwowano 3-krotny wzrost stosunku GSH/GSSG. Ponadto zaobserwowano różnice pomiędzy liniami komórkowymi w odpowiedzi na traktowanie BSO. W przypadku rodziny linii TCC-SUP (**Ryc. 20C**) zaobserwowano, iż stosunek GSH/GSSG spada, w przypadku rodziny linii RT-112 zaobserwowano nieznaczne przesunięcia w wartościach, natomiast w przypadku rodziny linii UM-UC-3 nie zaobserwowano różnic w komórkach nie traktowanych BSO oraz traktowanych.



**Ryc. 19.** Stosunek glutationu zredukowanego (GSH) do utlenionego (GSSG) w komórkach linii raka pęcherza moczowego wyjściowych oraz lekoopornych (A) UM-UC-3, (B) RT-112, (C) TCC-SUP nie traktowanych BSO. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD).

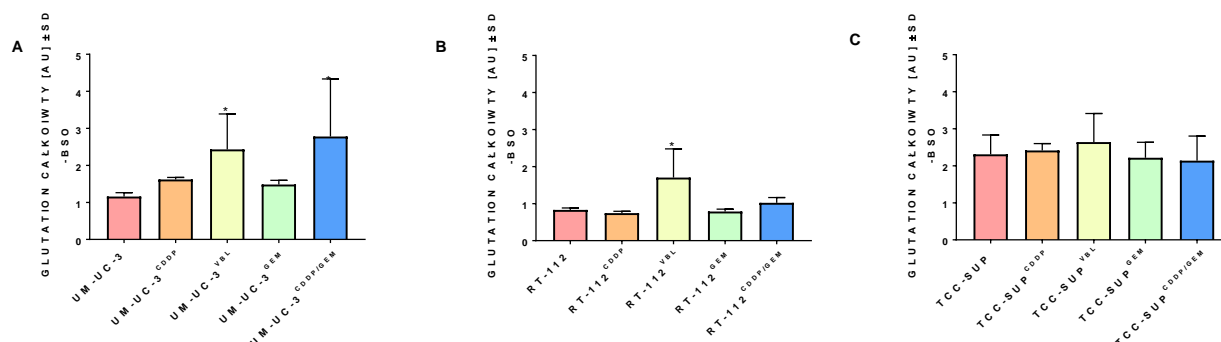
Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$



**Ryc. 20.** Stosunek glutationu zredukowanego (GSH) do utlenionego (GSSG) w komórkach linii raka pęcherza moczowego wyjściowych oraz lekoopornych (A) UM-UC-3, (B) RT-112, (C) TCC-SUP traktowanych BSO. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD).

Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$

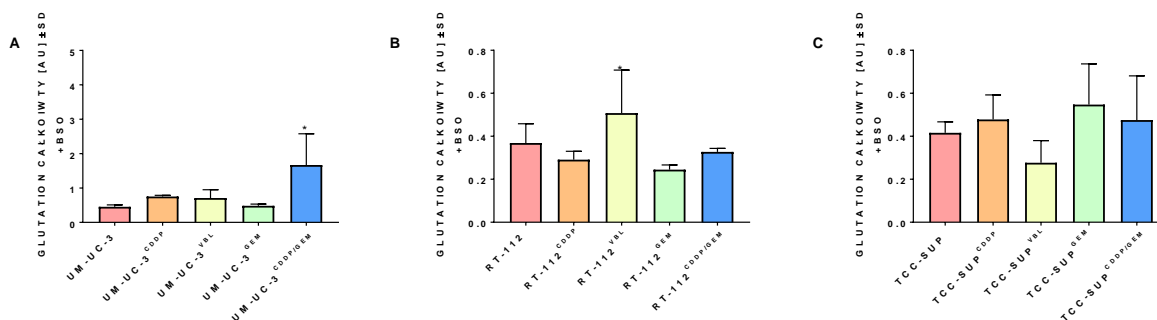
Wzrost ilości glutationu całkowitego wykazały komórki następujących linii nie traktowanych uprzednio BSO: UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, UM-UC-3<sup>VBL</sup>, UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> (**Ryc. 21A**), RT-112<sup>VBL</sup> (**Ryc. 21B**), TCC-SUP<sup>CDDP</sup> oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup> (**Ryc. 21C**). Jest to co najmniej 2-krotny wzrost ilości w porównaniu do odpowiednich linii wyjściowych.



**Ryc. 21.** Ilość glutationu całkowitego w komórkach linii raka pęcherza moczowego wyjściowych oraz lekoopornych (A) UM-UC-3, (B) RT-112, (C) TCC-SUP nie traktowanych BSO. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD).

Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$

Podobne wyniki dotyczące ilości glutationu całkowitego uzyskano w komórkach traktowanych BSO, tzn. ilość glutationu całkowitego istotnie wzrosła w komórkach linii: UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> 3-krotnie (**Ryc. 22A**) oraz RT-112<sup>VBL</sup> 1,5-krotnie (**Ryc. 22B**) w porównaniu do komórek odpowiednich linii wyjściowych. Warto zauważyć, iż ilość glutationu całkowitego po traktowaniu komórek BSO spadła 2-krotnie w przypadku rodzin linii UM-UC-3 oraz RT-112, natomiast w przypadku rodziny linii TCC-SUP spadła aż 5-krotnie (**Ryc. 22C**).



**Ryc. 22.** Ilość glutationu całkowitego w komórkach linii raka pęcherza moczowego wyjściowych oraz lekoopornych (A) UM-UC-3, (B) RT-112, (C) TCC-SUP traktowanych BSO. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe (SD).

Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$

Przeprowadzone badanie wskazuje, iż ilość glutationu jest niezwykle istotna podczas rozwoju lekooporności komórek nowotworowych. Wykazano znaczne różnice w stosunku GSH/GSSG oraz ilości glutationu całkowitego zarówno pomiędzy liniami komórkowymi w danej rodzinie linii, jak i pomiędzy komórkami linii opornych na ten sam związek ale wywodzącymi się z różnych linii wyjściowych.

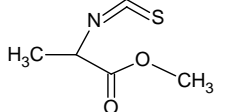
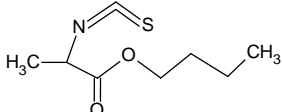
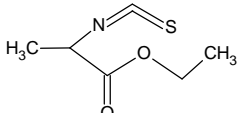
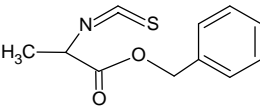
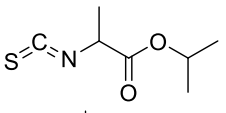
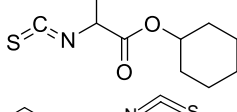
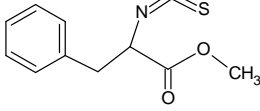


### 4.3 ZSYNTETYZOWANE ITC ORAZ ICH CHARAKTERYSTYKA

Aktywność biologiczna izotiocyjanianów jest dobrze znana od wielu lat, natomiast przez długi czas szczególnym zainteresowaniem cieszyły się badania nad ich aktywnością przeciwbakteryjną [187-189] oraz przeciwgrzybiczą [190]. Jednak w ostatnich latach powstało wiele prac, w których skupiono się na aktywności chemoprewencyjnej oraz przeciwnowotworowej ITC [191-193].

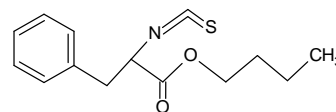
W trakcie niniejszej pracy w ramach dwóch serii badawczych zsyntezowano 29 ITC będących pochodnymi estrów aminokwasów. Związki zaprojektowano tak aby tworzyły one ciąg homologiczny, a następnie na podstawie otrzymanych wyników ich aktywności biologicznej móc przeanalizować wpływ struktury tych związków na ich aktywność. Wybór aminokwasów pozwolił na ocenę dwóch ważnych aspektów, tj. wpływu podstawnika na atomie  $\alpha$  oraz wpływu obecności grupy estrowej oraz typu tej grupy na aktywność biologiczną ITC np. czy obecność dużych grup (jak w Phe) nie generuje zawady sterycznej, która utrudnia oddziaływanie ITC z ich celami molekularnymi. Pierwsza seria badanych ITC obejmowała 18 związków: estry metylowe, butylowe, etylowe, benzylowe, izopropylowe lub cykloheksylowe: alaniny, fenyloalaniny lub fenyloglicyny. Druga seria ITC została zaprojektowana w oparciu o wyniki badań związków pochodzących z pierwszej serii i obejmowała estry metylowe: norwaliny, norleucyny, leucyny, izoleucyny, kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego,  $\beta$ -alaniny, glicyny, waliny, metioniny, kwasu aminomasłowego oraz  $\alpha$ -metyloalaniny. W *tabeli 27* przedstawiono nazwy, symbole, struktury oraz masy molowe wszystkich zsyntetyzowanych związków. Związki oznaczone \* zostały zsyntetyzowane we współpracy z dr. inż. Łuaksem Winiarskim (Katedra Chemii Organicznej i Medycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska). Pozostałe zostały zsyntezowane przez dra hab. Tomasza Goszczyńskiego (Laboratorium Chemii Biomedycznej, Zakład Onkologii Doświadczalnej, IITD PAN we Wrocławiu) oraz dra inż. Waldemara Goldemana (Katedra Chemii Organicznej i Medycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska).

Tab. 27. Zsyntezowane ITC: ich nazwy, symbole, struktury oraz masy molowe

NAZWA ZWIĄZKU	SYMBOL ZWIĄZKU	STRUKTURA ZWIĄZKU	MASA MOŁOWA [G/MOL]
<b>ZWIĄZKI ZSYNTEZYKOWANE W TRAKCIE I SERII BADAWCZEJ</b>			
Izotiocyanian estru metylowego alaniny	ITC-Ala-OMe		145,18
Izotiocyanian estru butylowego alaniny	ITC-Ala-OBu		187,26
Izotiocyanian estru etylowego alaniny	ITC-Ala-OEt		159,21
Izotiocyanian estru benzyłowego alaniny	ITC-Ala-OBzl		221,28
Izotiocyanian estru izopropylowego alaniny	ITC-Ala-OiPr*		173,23
Izotiocyanian estru cykloheksylowego alaniny	ITC-Ala-Oheks*		213,30
Izotiocyanian estru metylowego fenyloalaniny	ITC-Phe-OMe		221,28

Izotiocyjanian estru butylowego fenyloalaniny

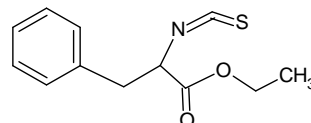
ITC-Phe-OBu



263,36

Izotiocyjanian estru etylowego fenyloalaniny

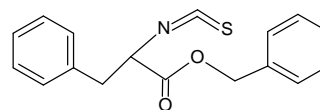
ITC-Phe-OEt



235,31

Izotiocyjanian estru benzyloвого fenyloalaniny

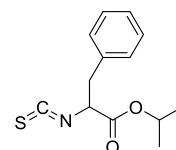
ITC-Phe-OBzl



297,38

Izotiocyjanian estru izopropylowego fenyloalaniny

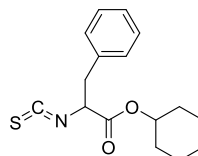
ITC-Phe-OiPr\*



249,33

Izotiocyjanian estru cykloheksylowego fenyloalaniny

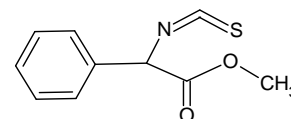
ITC-Phe-OHeks\*



289,39

Izotiocyjanian estru metylowego fenyloglicyny

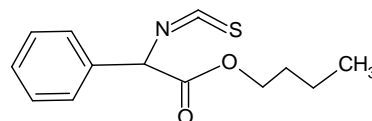
ITC-Phg-OMe



207,25

Izotiocyjanian estru butylowego fenyloglicyny

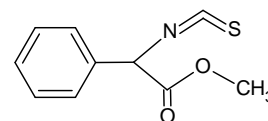
ITC-Phg-OBu



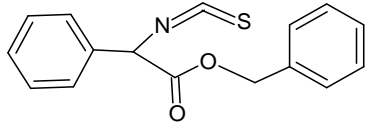
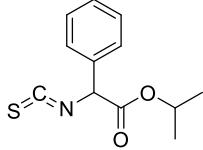
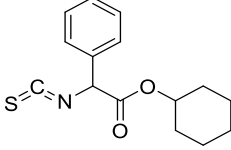
249,33

Izotiocyjanian estru etylowego fenyloglicyny

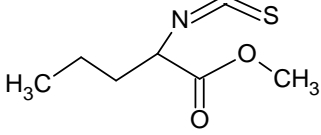
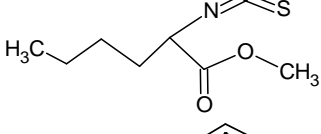
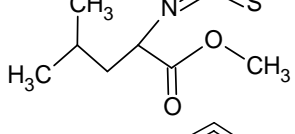
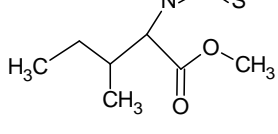
ITC-Phg-OEt

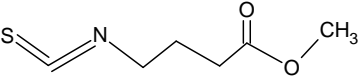
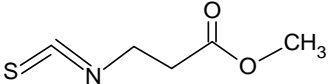
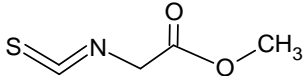
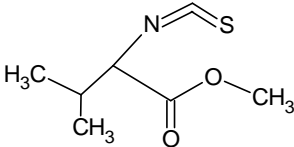
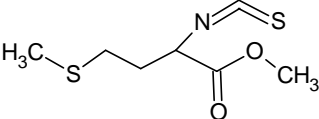
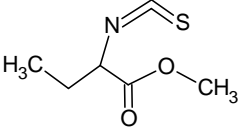
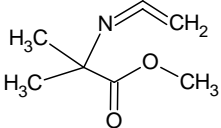


221,28

Izotiocyjanian estru benzyłowego fenyloglicyny	ITC-Phg-OBzl		283,35
Izotiocyjanian estru izopropylowego fenyloglicyny	ITC-Phg-OiPr *		235,3
Izotiocyjanian estru cykloheksylowego fenyloglicyny	ITC-Phg-OHeks *		275,37

**ZWIĄZKI ZSYNTEZOWANE W TRAKCIE II SERII BADAWCZEJ**

Izotiocyjanian estru metylowego norwaliny	ITC-Nva-OMe		173,24
Izotiocyjanian estru metylowego norleucyny	ITC-Nle-OMe		187,26
Izotiocyjanian estru metylowego leucyny	ITC-Leu-OMe		187,26
Izotiocyjanian estru metylowego izoleucyny	ITC-Ile-OMe		187,26

Izotiocyjanian estru metylowego kwasu $\gamma$ -aminomasłowego	ITC-GABA-OMe		159,21
Izotiocyjanian estru metylowego $\beta$ -alaniny	ITC- $\beta$ -Ala-OMe		145,18
Izotiocyjanian estru metylowego glicyny	ITC-Gly-OMe		131,15
Izotiocyjanian estru metylowego waliny	ITC-Val-OMe		173,24
Izotiocyjanian estru metylowego metioniny	ITC-Met-OMe		205,3
Izotiocyjanian estru metylowego kwasu aminomasłowego	ITC-Abu-OMe		159,21
Izotiocyjanian estru metylowego $\alpha$ -metyloalaniny	ITC-Aib-OMe		159,21

Wszystkie zsyntezowane związki zostały scharakteryzowane. Struktura za pomocą  $^1\text{H}$  NMR, a czystość za pomocą HPLC. Każdy związek posiadał czystość powyżej 95%. W **tabeli 28** przedstawiono wyniki  $^1\text{H}$  NMR dla sześciu ITC, w których syntezie i charakterystyce uczestniczyłam w ramach współpracy z dr inż. Łukaszem Winiarskim.

**Tab. 28.**  $^1\text{H}$  NMR sześciu zsyntezowanych izotiocyjanianów w ramach współpracy z dr inż. Łukaszem Winiarskim

NAZWA ZWIĄZKU	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
ITC-Ala-OiPr	$\delta$ 5,12 – 5,01 (m, 1H), 4,29 – 4,22 (m, 1H), 1,55 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,28 (d, $J = 2,4$ Hz, 3H), 1,27 (d, $J = 2,4$ Hz, 3H)
ITC-Ala-OHeks	$\delta$ 4,90 – 4,79 (m, 1H), 4,27 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H), 1,92 – 1,78 (m, 2H), 1,78 – 1,67 (m, 2H), 1,56 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,54 – 1,21 (m, 6H)
ITC- Phe -OiPr	$\delta$ 7,37 – 7,18 (m, 5H), 5,12 – 4,97 (m, 1H), 4,39 (dd, $J = 8,2, 5,0$ Hz, 1H), 3,25 – 3,06 (m, 2H), 1,25 (d, $J = 1,1$ Hz, 3H), 1,23 (d, $J = 1,1$ Hz, 3H)
ITC- Phe-OHeks	$\delta$ 7,38 – 7,17 (m, 5H), 4,89 – 4,78 (m, 1H), 4,41 (dd, $J = 8,1, 5,0$ Hz, 1H), 3,16 (ddd, $J = 21,9, 13,8, 6,5$ Hz, 2H), 1,89 – 1,76 (m, 2H), 1,76 – 1,61 (m, 2H), 1,61 – 1,20 (m, 6H)
ITC- Phg -OiPr	$\delta$ 7,43 – 7,33 (m, 5H), 5,20 (s, 1H), 5,09 – 4,97 (m, 1H), 1,26 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,16 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H)
ITC- Phg -OHeks	$\delta$ 7,45 – 7,33 (m, 5H), 5,22 (s, 1H), 4,88 – 4,77 (m, 1H), 1,85 – 1,75 (m, 1H), 1,74 – 1,63 (m, 2H), 1,62 – 1,19 (m, 7H)

$\delta$  – przesunięcie chemiczne [ppm];  $J$  – stała sprzężenia [Hz]

#### 4.4 WSTĘPNA OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ ZSYNTEZOWANYCH ITC WOBEC PANELU LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO – OCENA AKTYWNOŚCI ANTYPROLIFERACYJNEJ

Aktywność antyproliferacyjną 18 ITC pochodzących z pierwszej serii przebadano na komórkach 18 linii raka pęcherza moczowego, wyjściowych oraz lekoopornych, zarówno wyprowadzonych w trakcie trwania badań do niniejszej pracy jak i pozyskanych w ramach współpracy. Ponadto poza 18 zsyntezowanymi ITC przebadano również trzy naturalnie występujące ITC: BITC (ang. *benzyl isothiocyanate*; izotiocyjanian benzylu), PEITC (ang. *phenetyl isothiocyanate*; izotiocyjanian fenetylu) oraz EtITC (ang. *ethyl isothiocyanate*; izotiocyjanian etylu), które obecnie są najczęściej badanymi izotiocyjanianami. Związkiem kontrolnym była cisplatyna.

Wstępną ocenę aktywności biologicznej zsyntezowanych ITC oceniono za pomocą testu antyproliferacyjnego wykorzystującego metodę SRB (związki inkubowano z komórkami przez 72h). Wyniki przedstawiono w **tabelach 29-31** jako  $IC_{50}$  (95% CI) odpowiednio dla rodzin linii komórkowych UM-UC-3, RT-112, TCC-SUP, ostatnia **tabela – 32** przedstawia otrzymane wyniki dla komórek linii KU-19-19, HT-1376 oraz 5637.

Dla rodziny linii UM-UC-3 (**Tab. 29**) najwyższą aktywność wykazały związki ITC- Phe- OiPr wobec komórek linii UM-UC-3 ( $IC_{50} = 3,9 \mu M$ ) oraz UM-UC-3<sup>CDDP</sup> ( $IC_{50} = 4,1 \mu M$ ), ITC-Phg-OEt wobec komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> ( $IC_{50} = 3,7 \mu M$ ), a także wobec UM-UC-3<sup>GEM</sup> ( $IC_{50} = 2,7 \mu M$ ) oraz ITC-Phg-OiPr wobec komórek linii UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> ( $IC_{50} = 4,4 \mu M$ ). Najmniej aktywnymi związkami były: ITC-Ala-OBzl wobec komórek linii UM-UC-3 ( $IC_{50} = 18,0 \mu M$ ), UM-UC-3<sup>VBL</sup> ( $IC_{50} = 24,5 \mu M$ ) oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> ( $IC_{50} = 23,4 \mu M$ ). ITC-Ala-OBu był najmniej aktywnym związkiem wobec komórek linii: UM-UC-3<sup>CDDP</sup> ( $IC_{50} = 24,6 \mu M$ ) oraz UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> ( $IC_{50} = 24,0 \mu M$ ). Warto również zaznaczyć, iż najbardziej aktywny związek, tzn. ITC-Phe-OiPr wykazał większą aktywność w porównaniu do naturalnie występujących ITC wobec komórek linii: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup>.

**Tab. 29.** Ocena wstępnej aktywności biologicznej ITC wobec komórek rodziny linii raka pęcherza moczowego UM-UC-3 (linii wyjściowej oraz lekoopornych) po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach. Wyniki przedstawiono jako  $IC_{50}$  (95% CI)

$IC_{50}^{72h}$ (95% CI) [ $\mu$ M]					
Rodzina linii UM-UC-3					
Związek	UM-UC-3	UM-UC-3 <sup>CDDP</sup>	UM-UC-3 <sup>VBL</sup>	UM-UC-3 <sup>GEM</sup>	UM-UC-3 <sup>CDDP/GEM</sup>
ITC-Ala-OMe	8,8 (6,4 - 11,5)	8,7 (6,9 - 10,8)	4,4 (3,0 - 5,9)	6,5 (4,9 - 8,5)	8,1 (5,9 - 10,6)
ITC-Ala-OBu	16,6 (14,0 - 19,6)	24,6 (20,6 - 29,0)	14,0 (11,9 - 16,4)	13,1 (10,2 - 16,4)	24,0 (18,9 - 29,9)
ITC-Ala-OEt	9,0 (7,7 - 10,5)	13,5 (9,7 - 17,6)	10,4 (8,1 - 12,8)	10,9 (8,4 - 13,5)	11,5 (8,8 - 14,3)
ITC-Ala-OBzl	18,0 (16,4 - 20,7)	23,8 (19,2 - 28,8)	24,5 (19,1 - 30,5)	23,4 (18,7 - 28,6)	19,8 (16,5 - 23,6)
ITC-Ala-OiPr	11,5 (10,4 - 12,9)	13,5 (12,2 - 15,1)	11,9 (9,2 - 14,4)	14,9 (12,8 - 17,3)	11,2 (9,0 - 13,3)
ITC-Ala-OHeks	11,6 (10,6 - 13,0)	15,3 (13,5 - 17,5)	17,3 (14,5 - 21,0)	10,8 (9,4 - 12,3)	14,6 (12,3 - 17,0)
ITC-Phe-OMe	9,3 (8,6 - 10,0)	11,1 (9,8 - 12,9)	10,0 (10,0 - 11,9)	11,3 (9,7 - 13,2)	12,7 (10,7 - 15,2)
ITC-Phe-OBu	10,0 (9,6 - 10,4)	8,4 (7,2 - 9,6)	11,2 (10,5 - 12,1)	9,9 (8,9 - 10,8)	10,4 (9,1 - 11,5)
ITC-Phe-OEt	4,8 (4,3 - 5,3)	6,7 (5,4 - 8,3)	5,5 (4,7 - 6,5)	4,7 (4,1 - 5,4)	5,8 (4,9 - 6,9)
ITC-Phe-OBzl	5,0 (4,4 - 5,6)	10,1 (8,2 - 12,1)	7,2 (6,3 - 8,5)	9,2 (8,1 - 10,2)	9,7 (8,3 - 10,7)
ITC-Phe-OiPr	3,9 (3,3 - 4,4)	4,1 (3,5 - 4,9)	3,9 (3,3 - 4,6)	3,4 (2,9 - 3,9)	4,8 (3,9 - 5,9)
ITC-Phe-OHeks	4,4 (3,9 - 5,0)	4,4 (3,8 - 5,4)	3,9 (3,3 - 5,0)	3,9 (3,4 - 4,6)	5,4 (4,5 - 6,8)
ITC-Phg-OMe	4,2 (3,8 - 4,6)	5,7 (4,5 - 7,3)	3,9 (3,6 - 4,3)	3,7 (3,3 - 4,2)	5,2 (3,9 - 6,6)
ITC-Phg-OBu	5,3 (4,5 - 6,2)	9,7 (8,3 - 11)	4,4 (4,0 - 4,7)	4,8 (4,4 - 5,3)	9,1 (7,9 - 10,2)
ITC-Phg-OEt	3,5 (3,2 - 3,8)	5,0 (4,0 - 6,2)	3,7 (3,0 - 4,3)	2,7 (2,0 - 3,3)	4,6 (3,2 - 6,2)
ITC-Phg-OBzl	6,6 (5,7 - 7,8)	10,8 (8,9 - 13,0)	5,0 (4,4 - 5,5)	6,1 (5,3 - 7,7)	9,9 (8,4 - 11,0)
ITC-Phg-OiPr	4,7 (3,6 - 5,8)	4,8 (4,0 - 5,8)	5,8 (5,1 - 6,7)	4,2 (3,6 - 5,0)	4,4 (3,5 - 6,0)
ITC-Phg-OHeks	4,5 (3,9 - 5,1)	5,4 (4,4 - 6,6)	5,6 (4,9 - 6,4)	4,5 (3,9 - 5,3)	5,6 (4,5 - 7,2)
BITC	4,3 (3,4 - 5,4)	4,8 (3,6 - 6,4)	5,4 (4,5 - 6,5)	2,7 (2,4 - 3,2)	5,3 (3,5 - 7,6)
PEITC	8,0 (6,5 - 9,6)	7,9 (6,0 - 10,2)	7,8 (6,3 - 9,4)	4,4 (3,7 - 5,2)	8,2 (6,1 - 10,6)
EtITC	[25,9]* (24,3 - 37,3)	[41,4]* (36,6 - 43,8)	31,6 (6,0 - 85,6)	24,5 (19,9 - 31,2)	[39,9]* (36,8 - 46,0)
CDDP	2,4 (2,0 - 2,8)	17,1 (14,0 - 21,0)	2,5 (1,4 - 3,9)	2,7 (2,3 - 3,2)	17,8 (15,5 - 20,3)

[ ]\* - zahamowanie proliferacji poniżej 50% w najwyższym stężeniu badanego związku; przedstawione wartości to procent zahamowania proliferacji w najwyższym zastosowanym stężeniu: 100 $\mu$ M

Wobec komórek rodziny linii RT-112 (**Tab. 30**) najbardziej aktywnymi związkami były: ITC-Phe-OiPr wobec komórek linii RT-112 ( $IC_{50} = 4,5 \mu$ M) oraz RT-112<sup>CDDP</sup> ( $IC_{50} = 4,9 \mu$ M), ITC-Phg-OEt wobec komórek linii RT-112<sup>VBL</sup> ( $IC_{50} = 4,2 \mu$ M), jak również wobec komórek linii RT-112<sup>GEM</sup> ( $IC_{50} = 4,9 \mu$ M). Związkiem najbardziej aktywnym wobec komórek linii RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> był ITC-Phe-OHeks ( $IC_{50} = 5,0 \mu$ M). Najmniej aktywnym związkiem wobec komórek linii RT-112 był ITC-Ala-OBu ( $IC_{50} = 23,9 \mu$ M). ITC-Ala-OBzl był natomiast najmniej aktywnym związkiem wobec komórek RT-112<sup>CDDP</sup> ( $IC_{50} = 42,8 \mu$ M), RT-112<sup>GEM</sup> ( $IC_{50} = 27,3 \mu$ M) oraz RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> ( $IC_{50} = 28,6 \mu$ M). Wobec linii komórkowej RT-112<sup>VBL</sup> najmniej aktywnym związkiem był ITC-Ala-OHeks ( $IC_{50} = 20,1 \mu$ M). Warto również zaznaczyć, iż najbardziej aktywny związek, tzn. ITC-Phe-OiPr wykazał większą aktywność antyproliferacyjną w porównaniu do naturalnie występujących ITC wobec komórek linii RT-112.



**Tab. 30.** Ocena wstępnej aktywności biologicznej ITC wobec komórek rodziny linii raka pęcherza moczowego RT-112 (linii wyjściowej oraz lekoopornych) po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach. Wyniki przedstawiono jako IC<sub>50</sub> (95% CI)

Związek	IC <sub>50</sub> <sup>72h</sup> (95% CI) [μM]				
	Rodzina linii RT-112				
	RT-112	RT-112 <sup>CDDP</sup>	RT-112 <sup>VBL</sup>	RT-112 <sup>GEM</sup>	RT-112 <sup>CDDP/GEM</sup>
ITC-Ala-OMe	10,0 (8,8 - 11,4)	8,2 (7,3 - 9,2)	7,2 (6,2 - 8,4)	5,8 (5,2 - 6,5)	6,6 (5,2 - 8,3)
ITC-Ala-OBu	23,9 (21,2 - 26,9)	17,8 (15,3 - 20,6)	15,4 (12,2 - 19,0)	21,8 (18,7 - 25,3)	25,7 (22,7 - 28,8)
ITC-Ala-OEt	8,7 (7,8 - 9,7)	10,8 (10,0 - 11,8)	7,0 (4,6 - 9,7)	9,8 (8,9 - 10,8)	8,4 (7,2 - 9,8)
ITC-Ala-OBzl	19,8 (17,0 - 22,4)	42,8 (38,4 - 47,4)	18,0 (15,5 - 20,9)	27,3 (25,0 - 29,5)	28,6 (23,9 - 33,7)
ITC-Ala-OiPr	8,6 (6,9 - 10,2)	13,6 (11,7 - 16,0)	9,5 (8,2 - 10,7)	9,8 (9,0 - 10,5)	13,8 (11,9 - 16,4)
ITC-Ala-OHeks	20,0 (16 - 25,2)	21,4 (18,3 - 24,8)	20,1 (16,8 - 25,0)	14,1 (12,6 - 15,6)	17,5 (14,3 - 21,7)
ITC-Phe-OMe	11,0 (10,3 - 11,9)	13,4 (12,4 - 14,4)	9,2 (8,25 - 10,0)	10,7 (10,1 - 11,4)	12,7 (12,0 - 13,6)
ITC-Phe-OBu	12,9 (10 - 14,9)	17,3 (15,2 - 20,0)	11,7 (10,8 - 12,8)	13,1 (12,1 - 14,1)	12,4 (11,4 - 13,6)
ITC-Phe-OEt	5,8 (5,0 - 6,7)	5,3 (4,7 - 5,9)	5,6 (4,9 - 6,5)	5,6 (5 - 6,2)	5,1 (4,6 - 5,7)
ITC-Phe-OBzl	6,2 (5,6 - 6,7)	10,5 (9,6 - 11,4)	6,4 (5,4 - 7,6)	6,4 (5,8 - 7,2)	9,5 (8,8 - 10,1)
ITC-Phe-OiPr	4,5 (3,7 - 5,5)	4,9 (4,4 - 5,5)	5,5 (4,9 - 6,3)	5,2 (4,7 - 5,8)	6,0 (4,7 - 8,3)
ITC-Phe-OHeks	5,2 (4,4 - 6,2)	5,8 (5,1 - 6,7)	5,3 (4,8 - 5,8)	5,5 (4,7 - 6,6)	5,0 (4,1 - 6,2)
ITC-Phg-OMe	5,4 (5,0 - 5,9)	5,5 (5,1 - 6,0)	4,6 (4 - 5,2)	5,0 (4,6 - 5,4)	5,6 (5 - 6,4)
ITC-Phg-OBu	5,8 (5,0 - 6,8)	8,3 (7,8 - 8,8)	5,7 (4,9 - 6,7)	5,6 (5,2 - 5,9)	7,1 (6,4 - 8,1)
ITC-Phg-OEt	5,6 (5,0 - 6,3)	5,4 (4,8 - 6,1)	4,2 (3,7 - 4,6)	4,9 (4,5 - 5,3)	5,3 (4,7 - 5,9)
ITC-Phg-OBzl	7,4 (6,7 - 8,2)	9,6 (8,6 - 10,5)	8,5 (7,2 - 9,7)	11,5 (10,4 - 12,7)	12,1 (10,6 - 13,7)
ITC-Phg-OiPr	8,7 (6,0 - 10,6)	8,0 (7,3 - 8,7)	8,0 (6,1 - 9,8)	4,9 (4,3 - 5,6)	6,6 (5,1 - 8,6)
ITC-Phg-OHeks	10,3 (8,9 - 11,4)	9,0 (7,7 - 10,3)	10,4 (8,4 - 11,6)	10,1 (9,2 - 11,0)	7,4 (5,4 - 9,8)
BITC	6,9 (6,1 - 8,2)	4,0 (3,3 - 4,8)	6,2 (5,2 - 7,4)	4,7 (4,3 - 5,2)	2,9 (1,9 - 4,3)
PEITC	7,0 (6,2 - 8)	7,0 (6,0 - 8,2)	8,7 (7,4 - 9,8)	6,7 (5,8 - 7,7)	5,7 (4,3 - 7,5)
EtITC	[23,4]* (13,8 - 29,7)	[35,4]* (6,7 - 80,9)	[19,3]* (12,9 - 23)	[26,9]* (23,6 - 48,3)	[39,0]* (32,0 - 50,4)
CDDP	11,1 (8,6 - 14,1)	27,8 (22,0 - 34,8)	5,8 (4,3 - 7,5)	8,2 (5,7 - 11,4)	10,0 (7,3 - 13,3)

[\*]- zahamowanie proliferacji poniżej 50% w najwyższym stężeniu badanego związku; przedstawione wartości to procent zahamowania proliferacji w najwyższym zastosowanym stężeniu: 100μM

W przypadku linii należących do rodziny linii TCC-SUP (**Tab. 31**) najbardziej aktywnym związkiem był ITC-Phe-OHeks. Otrzymano następujące wartości IC<sub>50</sub> dla komórek linii TCC-SUP (IC<sub>50</sub> = 7,4 μM), TCC-SUP<sup>CDDP</sup> (IC<sub>50</sub> = 5,3 μM), TCC-SUP<sup>VBL</sup> (IC<sub>50</sub> = 6,8 μM) oraz TCC-SUP<sup>GEM</sup> (IC<sub>50</sub> = 11,0 μM). Natomiast ITC-Phe-OiPr był najbardziej aktywnym związkiem wobec komórek linii TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> (IC<sub>50</sub> = 9,6 μM). Najmniej aktywnymi związkami były: ITC-Ala-OBu (IC<sub>50</sub> = 37,0 μM oraz 35,0 μM), ITC-Ala-OBzl (IC<sub>50</sub> = 37,0 μM oraz 39,0 μM) oraz ITC-Ala-OMe (IC<sub>50</sub> = 46,0 μM) odpowiednio wobec komórek linii: TCC-SUP, TCC-SUP<sup>CDDP</sup>, TCC-SUP<sup>VBL</sup>, TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> oraz TCC-SUP<sup>GEM</sup>.

**Tab. 31.** Ocena wstępnej aktywności biologicznej ITC wobec komórek rodziny linii raka pęcherza moczowego TCC-SUP (linii wyjściowej oraz lekoopornych) po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach. Wyniki przedstawiono jako IC<sub>50</sub> (95% CI)

<b>IC<sub>50</sub><sup>72h</sup> (95% CI) [μM]</b>					
<b>Rodzina linii TCC-SUP</b>					
<b>Związek</b>	<b>TCC-SUP</b>	<b>TCC-SUP<sup>CDDP</sup></b>	<b>TCC-SUP<sup>VBL</sup></b>	<b>TCC-SUP<sup>GEM</sup></b>	<b>TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup></b>
ITC-Ala-OMe	12,8 (11,4 - 14,4)	28,6 (23,1 - 34,5)	15,1 (13,6 - 16,7)	46,5 (40,9 - 52,7)	18,6 (14,7 - 23,4)
ITC-Ala-OBu	37,3 (34,4 - 40,6)	35,1 (22,4 - 45,4)	35,3 (33,3 - 37,5)	72,4 (64,4 - 80,8)	35,2 (27,8 - 44,0)
ITC-Ala-OEt	11,8 (8,5 - 16)	25,2 (20,1 - 30,8)	29,1 (21,0 - 38,3)	82,8 (51,0 - 208,0)	17,6 (15,0 - 20,7)
ITC-Ala-OBzl	27,0 (21,6 - 33,3)	30,4 (23,7 - 38,1)	46,9 (36,9 - 58,4)	80,2 (61,2 - 99,1)	39,2 (33,7 - 47,3)
ITC-Ala-OiPr	23,5 (21,2 - 26,1)	20,0 (17,5 - 23)	18,0 (14,3 - 22,3)	32,0 (26,2 - 37,8)	17,3 (15,2 - 19,9)
ITC-Ala-OHeks	31,5 (28,8 - 34,2)	24,2 (20,7 - 27,9)	32,3 (24,7 - 39,2)	35,3 (26,4 - 42,9)	30,4 (26,7 - 33,6)
ITC-Phe-OMe	16,3 (13,7 - 19,3)	20,1 (16,8 - 24,3)	20,3 (16,2 - 25,0)	27,9 (13,0 - 48,7)	11,5 (10,3 - 12,8)
ITC-Phe-OBu	14,8 (13,1 - 17,0)	18,0 (14,4 - 23,4)	19,2 (15,9 - 23,3)	45,4 (36,5 - 55,6)	20,9 (17,7 - 24,7)
ITC-Phe-OEt	10,9 (9,0 - 13,1)	12,3 (11,0 - 13,8)	13,3 (11,7 - 15,2)	36,6 (16,5 - 60,8)	12,9 (11,2 - 15,1)
ITC-Phe-OBzl	9,4 (7,6 - 11,1)	9,5 (7,7 - 11,7)	16,8 (13,8 - 20,7)	32,9 (17,2 - 55,5)	15,4 (13,8 - 17,0)
ITC-Phe-OiPr	8,5 (7,9 - 9,1)	6,2 (5,2 - 7,5)	11,5 (10,4 - 13,2)	12,8 (11,1 - 15,0)	9,6 (8,5 - 10,9)
ITC-Phe-OHeks	7,4 (6,7 - 8,2)	5,3 (4,3 - 6,5)	6,8 (5,1 - 9,0)	10,9 (9,4 - 12,3)	9,7 (8 - 11,7)
ITC-Phg-OMe	10,4 (9,1 - 11,8)	10,9 (7,5 - 14,7)	10,7 (10,1 - 11,3)	19,9 (17,6 - 22,8)	15,0 (13,1 - 17,2)
ITC-Phg-OBu	10,0 (8,6 - 11,2)	17,5 (13,5 - 22,7)	13,0 (11,7 - 14,5)	19,1 (16,9 - 22,0)	17,5 (14,3 - 21,2)
ITC-Phg-OEt	12,1 (10,7 - 13,6)	12,3 (9,9 - 14,9)	9,7 (8,9 - 10,5)	20,7 (18,7 - 23,3)	12,6 (11,1 - 13,8)
ITC-Phg-OBzl	10,6 (9,7 - 11,7)	14,9 (11,9 - 19,1)	15,4 (13,6 - 17,20)	18,7 (16,7 - 22)	19,2 (16,7 - 22,4)
ITC-Phg-OiPr	13,2 (10,3 - 16,6)	11,5 (10,2 - 13,1)	11,2 (9,4 - 13,7)	15,0 (13,2 - 17,2)	13,6 (11,9 - 15,6)
ITC-Phg-OHeks	11,5 (10,7 - 12,4)	8,0 (6,4 - 9,5)	7,4 (5,7 - 9,6)	11,3 (9,9 - 12,7)	13,5 (12,1 - 15,2)
BITC	5,9 (4,7 - 7,3)	11,9 (10,6 - 13,3)	15,3 (12,8 - 18,4)	11,3 (10,0 - 12,9)	7,7 (7,1 - 8,3)
PEITC	8,7 (7,5 - 10,0)	12,3 (11,1 - 13,7)	16,5 (13,8 - 19,8)	13,1 (11,8 - 14,7)	10,5 (10,0 - 11,2)
EtITC	[31,7]* (18,5 - 53,7)	[36,7]* (24,2 - 44,7)	[24,3]* (20,5 - 82,3)	[27,2]* (15,8 - 39,7)	[45,9]* (38,5 - 61,9)
CDDP	1,5 (1,2 - 1,8)	16,2 (9,5 - 25,2)	1,2 (1,1 - 1,4)	10,8 (9,1 - 12,6)	12,3 (8,8 - 16,7)

[\*]- zahamowanie proliferacji poniżej 50% w najwyższym stężeniu badanego związku; przedstawione wartości to procent zahamowania proliferacji w najwyższym zastosowanym stężeniu: 100μM

Ostatni zestaw linii komórkowych na jakim została wykonana wstępna ocena aktywności biologicznej ITC to linie raka pęcherza moczowego: KU-19-19, HT-1376 oraz 5637 (**Tab. 32**). Najbardziej aktywnym związkiem był ITC-Phg-OEt wobec komórek KU-19-19 oraz 5637 (odpowiednio IC<sub>50</sub> = 4,6 μM oraz IC<sub>50</sub> = 4,9 μM). Wobec komórek linii HT-1376 najbardziej aktywnym związkiem był ITC-Phe-OHeks (IC<sub>50</sub> = 5,8 μM). ITC-Ala-OHeks był najmniej aktywnym związkiem wobec komórek linii: KU-19-19 (IC<sub>50</sub> = 16,9 μM) oraz 5637 (IC<sub>50</sub> = 17,9 μM). Natomiast wobec komórek linii HT-1376 najmniej aktywnym związkiem był ITC-Ala-OBu (IC<sub>50</sub> = 45,3 μM). Większość związków wykazała wyższą aktywność antyproliferacyjną w komórkach badanych linii w porównaniu do: BITC, PEITC oraz EtITC.

**Tab. 32** Ocena wstępnej aktywności biologicznej ITC wobec komórek raka pęcherza moczowego linii KU-19-19, HT-1376 oraz 5637 po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach. Wyniki przedstawiono jako IC<sub>50</sub> (95% CI)

Związek	IC <sub>50</sub> <sup>72h</sup> (95% CI) [μM]		
	Pozostałe linie komórkowe		
	KU-19-19	HT-1376	5637
ITC-Ala-OMe	6,8 (5,8 - 7,9)	28,3 (24,6 - 32,3)	7,7 (6,3 - 9,4)
ITC-Ala-OBu	9,5 (8,4 - 10,8)	45,3 (41, - 48,7)	17,6 (15,5 - 20,1)
ITC-Ala-OEt	7,0 (5,1 - 9,3)	21,1 (16,6 - 26,5)	10,4 (8,7 - 12,3)
ITC-Ala-OBzl	9,6 (8 - 11,4)	35,3 (28,6 - 42,5)	18,1 (15,8 - 20,7)
ITC-Ala-OiPr	10,7 (14,6 - 19,6)	27,5 (23,5 - 32)	14,9 (13,5 - 16,5)
ITC-Ala-OHeks	16,9 (14,6 - 19,6)	36,4 (20,2 - 42,3)	17,9 (14,9 - 21,6)
ITC-Phe-OMe	6,9 (6,2 - 7,5)	12,7 (11,4 - 14,3)	9,1 (8,4 - 9,8)
ITC-Phe-OBu	8,3 (7,7 - 9)	16,3 (14,2 - 18,4)	14,0 (12,3 - 15,1)
ITC-Phe-OEt	4,7 (4,1 - 5,1)	9,5 (8,3 - 10,5)	5,1 (4,4 - 5,8)
ITC-Phe-OBzl	5,3 (4,8 - 5,9)	12,3 (11,2 - 13,3)	6,3 (5,6 - 7,2)
ITC-Phe-OiPr	5,5 (4,7 - 6,7)	5,9 (4,8 - 7,2)	7,4 (6,5 - 8,4)
ITC-Phe-OHeks	3,4 (3,2 - 3,8)	5,8 (5,0 - 6,7)	6,7 (5,7 - 7,9)
ITC-Phg-OMe	4,9 (4,3 - 5,7)	8,5 (7,5 - 9,6)	4,1 (3,7 - 4,6)
ITC-Phg-OBu	6,0 (5,4 - 6,9)	11,7 (10,6 - 13,1)	5,7 (5 - 6,5)
ITC-Phg-OEt	4,6 (4 - 5,1)	7,3 (6,3 - 8,4)	4,9 (4,1 - 5,8)
ITC-Phg-OBzl	6,3 (5,5 - 7,3)	12,6 (11,0 - 14,0)	7,9 (7,0 - 8,9)
ITC-Phg-OiPr	6,0 (5,6 - 6,9)	6,9 (5,4 - 8,7)	11,8 (10,6 - 13,3)
ITC-Phg-OHeks	5,8 (5,1 - 7,7)	8,4 (6,9 - 10,0)	11,6 (9,7 - 13,2)
BITC	5,0 (4 - 6,2)	9,6 (7,6 - 11,9)	9,3 (8,0 - 10,7)
PEITC	7,2 (6,2 - 8,7)	11,8 (10,0 - 14,0)	11,3 (10,7 - 12,0)
EtITC	[48,7]* (22,5 - 59,9)	[30,6]* (25,1 - 32,0)	[25,8]* (14,4 - 40,0)
CDDP	4,5 (3,7 - 5,3)	6,3 (5,2 - 7,5)	3,9 (2,9 - 4,9)

[ ]\*- zahamowanie proliferacji poniżej 50% w najwyższym stężeniu badanego związku; przedstawione wartości to procent zahamowania proliferacji w najwyższym zastosowanym stężeniu: 100μM

Po przetestowaniu wszystkich ITC, wartości IC<sub>50</sub> dla ITC zawierających w swojej strukturze estry tego samego typu uśredniono, co dało możliwość spojrzenia na wyniki z szerszej perspektywy. Celem takiej analizy było wybranie tych estrów, które miały najniższe średnie IC<sub>50</sub> oraz SD, co wiązało się z najwyższą aktywnością związków. Wyniki, tzn. uśrednione wartości IC<sub>50</sub> dla estrów tego samego typu przedstawiono w **tabelach 33-36**, odpowiednio dla rodzin linii UM-UC-3, RT-112, TCC-SUP oraz KU-19-19, HT-1376 i 5637.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż najniższe średnie IC<sub>50</sub> oraz SD wykazują estry metylowe, etylowe oraz izo-propylowe izotiocyanianów, a najbardziej wrażliwe linie na te właśnie ITC to rodzina linii UM-UC-3 (**Tab. 33**). Ze względu na nieduże różnice w aktywności antyproliferacyjnej wymienionych powyżej estrów oraz względnie najszybszą i najbardziej wydajną syntezę estrów metylowych zdecydowano, iż w trakcie drugiej syntezy powstaną związki zawierające wyłącznie estry metylowe izotiocyanianów oparte o 11 różnych aminokwasów. W tym miejscu warto zaznaczyć, iż uśrednione wartości

IC<sub>50</sub> dla związków zawierających ten sam aminokwas (wyniki nie są prezentowane w niniejszej pracy), były większe od średnich wartości IC<sub>50</sub> dla związków zawierających te same estry alkoholi.

**Tab. 33.** Uśrednione IC<sub>50</sub> związków zawierających w swojej strukturze ten sam ester wobec komórek rodziny linii UM-UC-3. Wyniki przedstawiono jako średnie IC<sub>50</sub> [±SD]

Linia komórkowa	Związki					
	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OMe	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OBu	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OEt	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OBzl	ITC- Ala/ Phe/ Phg-OiPr	ITC- Ala/ Phe/ Phg-OHeks
UM-UC-3	7,4 [±2,8]	10,6 [±5,7]	5,8 [±2,9]	9,9 [±7,1]	6,7 [±4,2]	6,8 [±4,1]
UM-UC-3 <sup>CDDP</sup>	8,5 [±2,7]	14,2 [±9,0]	8,4 [±4,5]	14,9 [±7,7]	7,5 [±5,2]	8,4 [±6,0]
UM-UC-3 <sup>VBL</sup>	6,1 [±3,4]	9,9 [±4,9]	6,5 [±3,5]	12,2 [±10,7]	7,2 [±4,2]	8,9 [±7,3]
UM-UC-3 <sup>GEM</sup>	7,2 [±3,8]	9,3 [±4,2]	6,1 [±4,3]	12,9 [±9,2]	7,5 [±6,4]	6,4 [±3,8]
UM-UC-3 <sup>CDDP/GEM</sup>	8,7 [±3,8]	14,5 [±8,3]	7,3 [±3,7]	13,1 [±5,8]	6,8 [±3,8]	8,5 [±5,3]

**Tab. 34.** Uśrednione IC<sub>50</sub> związków zawierających w swojej strukturze ten sam ester wobec komórek rodziny linii RT-112. Wyniki przedstawiono jako średnie IC<sub>50</sub> [±SD]

Linia komórkowa	Związki					
	ITC- Ala/ Phe/ Phg-OMe	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OBu	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OEt	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OBzl	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OiPr	ITC- Ala/ Phe/ Phg-OHeks
RT-112	8,8 [±3,0]	14,2 [±9,1]	6,7 [±1,7]	11,1 [±7,5]	7,6 [±2,4]	11,8 [±7,5]
RT-112 <sup>CDDP</sup>	9,0 [±4,0]	14,5 [±5,3]	7,2 [±3,1]	21,0 [±18,9]	8,8 [±4,4]	12,1 [±8,2]
RT-112 <sup>VBL</sup>	7,0 [±2,3]	10,9 [±4,9]	5,6 [±1,4]	11,0 [±6,2]	7,7 [±2,0]	11,9 [±7,5]
RT-112 <sup>GEM</sup>	7,2 [±3,1]	13,5 [±8,1]	6,8 [±2,7]	15,1 [±10,9]	6,6 [±2,7]	9,9 [±4,3]
RT-112 <sup>CDDP/GEM</sup>	8,3 [±3,8]	15,1 [±9,6]	6,3 [±1,9]	16,7 [±10,4]	8,8 [±4,3]	10,0 [±6,6]

**Tab. 35.** Uśrednione  $IC_{50}$  związków zawierających w swojej strukturze ten sam ester wobec komórek rodziny linii TCC-SUP. Wyniki przedstawiono jako średnie  $IC_{50}$  [ $\pm SD$ ]

Linia komórkowa	Związki					
	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OMe	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OBu	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OEt	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OBzl	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OiPr	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OHeks
TCC-SUP	13,2 [ $\pm 3,0$ ]	20,7 [ $\pm 4,6$ ]	11,6 [ $\pm 0,6$ ]	15,7 [ $\pm 9,8$ ]	15,1 [ $\pm 7,7$ ]	16,8 [ $\pm 12,9$ ]
TCC-SUP <sup>CDDP</sup>	19,9 [ $\pm 8,9$ ]	23,5 [ $\pm 10,0$ ]	16,6 [ $\pm 7,4$ ]	18,3 [ $\pm 10,8$ ]	12,6 [ $\pm 7,0$ ]	12,5 [ $\pm 10,2$ ]
TCC-SUP <sup>VBL</sup>	15,4 [ $\pm 4,8$ ]	22,5 [ $\pm 11,5$ ]	17,4 [ $\pm 10,3$ ]	26,4 [ $\pm 17,8$ ]	13,6 [ $\pm 3,8$ ]	15,5 [ $\pm 14,6$ ]
TCC-SUP <sup>GEM</sup>	31,4 [ $\pm 13,6$ ]	45,6 [ $\pm 26,7$ ]	46,7 [ $\pm 32,3$ ]	43,9 [ $\pm 32,3$ ]	19,9 [ $\pm 10,5$ ]	19,2 [ $\pm 14,0$ ]
TCC-SUP <sup>CDDP/GEM</sup>	15,0 [ $\pm 3,6$ ]	24,5 [ $\pm 9,4$ ]	14,4 [ $\pm 2,8$ ]	24,6 [ $\pm 12,8$ ]	13,5 [ $\pm 3,9$ ]	17,9 [ $\pm 11,0$ ]

**Tab. 36.** Uśrednione  $IC_{50}$  związków zawierających w swojej strukturze ten sam ester wobec komórek linii: KU-19-19, HT-1376, 5637. Wyniki przedstawiono jako średnie  $IC_{50}$  [ $\pm SD$ ]

Linia komórkowa	Związki					
	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OMe	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OBu	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OEt	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OBzl	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OiPr	ITC- Ala/ Phe/ Phg- OHeks
KU-19-19	6,2 [ $\pm 1,1$ ]	7,9 [ $\pm 1,8$ ]	5,4 [ $\pm 1,4$ ]	7,1 [ $\pm 2,3$ ]	7,4 [ $\pm 2,9$ ]	8,7 [ $\pm 7,2$ ]
HT-1376	16,5 [ $\pm 10,4$ ]	24,4 [ $\pm 8,2$ ]	12,6 [ $\pm 7,4$ ]	20,1 [ $\pm 13,2$ ]	13,4 [ $\pm 12,2$ ]	16,9 [ $\pm 7$ ]
5637	7,0 [ $\pm 2,6$ ]	12,4 [ $\pm 6,1$ ]	6,8 [ $\pm 3,1$ ]	10,8 [ $\pm 6,4$ ]	11,4 [ $\pm 3,8$ ]	12,4 [ $\pm 5,6$ ]

W związku z tym, iż komórki linii należących do rodziny linii UM-UC-3 okazały się być najbardziej wrażliwymi na działanie ITC zawierających w swojej strukturze estry metylowe zdecydowano, iż 11 związków powstałych w trakcie drugiej syntezy zostało zbadanych wyłącznie na liniach komórkowych należących do rodziny linii UM-UC-3. W **tabeli 37** przedstawiono wyniki wstępnej oceny aktywności biologicznej estrów metylowych ITC pochodzących zarówno z pierwszej jak i z drugiej serii badawczej wobec komórek linii należących do rodziny linii UM-UC-3. Związki, dla których uzyskano najniższe  $IC_{50}$  to: ITC-Ala-OMe ( $IC_{50} = 4,4 \mu M$  wobec komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>), ITC-GABA-OMe ( $IC_{50} = 2 \mu M$  wobec komórek linii UM-UC-3), ITC- $\beta$ -Ala-OMe

( $IC_{50} = 3,2 \mu M$  wobec komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>) oraz ITC-Gly-OMe ( $IC_{50} = 2,4 \mu M$  wobec komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>). Najbardziej wrażliwymi na działanie tych związków okazały się komórki linii: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (**Tab. 37**). Dlatego też wymienione powyżej związki oraz linie komórkowe zostały wybrane do dalszych badań mających na celu zbadanie mechanizmów działania zsyntetyzowanych ITC. Ponadto do dalszych badań wybrano również związek ITC-Aib-OMe. Jego  $IC_{50}$  nie wskazuje aby był on wyraźnie aktywnym związkiem, natomiast zawiera on w swojej strukturze  $\alpha$ -metyloalaninę, aminokwas który posiada IV rzędowy atom węgla, a ponieważ cztery wybrane najbardziej aktywne związki posiadają wyłącznie III rzędowe atomy węgla, ITC-Aib-OMe stanowi uzupełnienie zestawu wybranych ITC do badań nad mechanizmami działania.

**Tab. 37.** Ocena aktywności antyproliferacyjnej ITC zawierających estry metylowe wobec komórek rodziny linii UM-UC-3 po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach. Wyniki przedstawiono jako  $IC_{50}$  (95% CI)

Związek	$IC_{50}^{72h}$ (95% CI) [ $\mu M$ ]				
	Rodzina linii UM-UC-3				
	UM-UC-3	UM-UC-3 <sup>CDDP</sup>	UM-UC-3 <sup>VBL</sup>	UM-UC-3 <sup>GEM</sup>	UM-UC-3 <sup>CDDP/GEM</sup>
ITC-Ala-OMe	8,8 (6,4 – 11,5)	8,7 (6,9 – 10,8)	4,4 (3,0 – 5,9)	6,5 (4,9 – 8,5)	8,1 (5,9 – 10,6)
ITC-Phe-OMe	9,3 (8,6 – 10)	11,1 (9,8 – 12,9)	10,0 (10,0 – 11,9)	11,3 (9,7 – 13,2)	12,7 (10,7 – 15,2)
ITC-Phg-OMe	4,2 (3,8 – 4,6)	5,7 (4,5 – 7,3)	3,9 (3,6 – 4,3)	3,7 (3,3 – 4,2)	5,2 (3,9 – 6,6)
ITC-Nva-OMe	5,8 (5,1 – 6,5)	6,4 (5,3 – 7,6)	5,1 (4,2 – 6,2)	5,0 (4,1 – 6,1)	6,8 (5,1 – 8,9)
ITC-Nle-OMe	6,0 (5,3 – 6,8)	8,6 (7,2 – 9,9)	6,0 (5,0 – 7,2)	5,7 (4,8 – 6,8)	8,3 (6,9 – 10)
ITC-Leu-OMe	4,4 (4 – 4,8)	6,1 (5,2 – 7)	4,8 (4,0 – 5,7)	4,8 (4,0 – 5,7)	6,1 (4,5 – 8,1)
ITC-Ile-OMe	5,8 (5,4 – 6,3)	5,2 (4,4 – 6,1)	4,1 (3,6 – 4,8)	4,6 (3,7 – 5,7)	6,4 (4,6 – 8,5)
ITC-GABA-OMe	2,0 (2,1 – 2,9)	2,8 (2,1 – 3,6)	2,5 (2,2 – 2,8)	3,3 (2,6 – 4,2)	4,1 (2,8 – 5,9)
ITC- $\beta$ -Ala-OMe	3,9 (3,6 – 4,2)	4,1 (3,6 – 4,7)	3,2 (2,8 – 3,8)	3,7 (2,9 – 4,7)	5,1 (3,9 – 6,7)
ITC-Gly-OMe	2,5 (2,3 – 2,8)	3,4 (2,9 – 3,9)	2,4 (2,0 – 2,9)	2,9 (2,4 – 3,6)	4,4 (3,4 – 5,7)
ITC-Val-OMe	7,7 (7,0 – 8,4)	6,6 (5,3 – 8,2)	5,5 (4,3 – 6,8)	5,8 (4,3 – 7,7)	11,8 (10,2 – 13,7)
ITC-Met-OMe	4,1 (3,7 – 4,6)	5,8 (5,0 – 6,8)	3,2 (2,7 – 3,7)	4,0 (3,4 – 4,8)	6,5 (5,2 – 8)
ITC-Abu-OMe	7,1 (6,5 – 7,8)	6,6 (5,4 – 8)	4,7 (3,6 – 6,1)	6,0 (4,6 – 7,7)	8,5 (6,2 – 11,4)
ITC-Aib-OMe	21,7 (19,1 – 24,7)	29,5 (24,2 – 35,3)	25,0 (20,3 – 30,5)	25,6 (20,5 – 31,8)	24,7 (16,9 – 35,1)

## 4.5 OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ WYSELEKCJONOWANYCH ITC WOBEC WYBRANYCH LINII KOMÓRKOWYCH RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO

### 4.5.1 AKTYWNOŚĆ KASPAZY 3 W KOMÓRKACH PO TRAKTOWANIU ITC

Apoptoza inaczej określana kontrolowaną śmiercią komórki, to proces w który zaangażowanych jest wiele enzymów oraz innych białek. Główną rolę wśród nich pełnią proteazy cysteinowe, czyli tzw. kaspazy. Apoptoza może być zapoczątkowana na skutek działania czynników zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowych. Proces kontrolowanej śmierci komórki może zostać zainicjowany w trakcie trwania każdego etapu cyklu komórkowego. Bardzo często jest wynikiem nagromadzenia uszkodzonego materiału genetycznego. Końcowym etapem apoptozy jest uporządkowana dezintegracja komórek. Kaspazy biorące udział w apoptozie są specyficzne dla tego procesu, co sprawia że są one indentyfikatorami zachodzącej w komórce kontrolowanej śmierci [194].

Aby móc określić wpływ wyselekcjonowanych izotiocyjanianów na poziom kaspazy 3, a co za tym idzie na indukcję apoptozy w komórkach linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> przeprowadzono test z udziałem specyficznego, fluorogenicznego substratu dla kaspazy 3 Ac-DEVD-ACC (zasada działania testu została opisana w rozdziale 3.7.1). Stężenia ITC, które zostały użyte w teście zostały wybrane na podstawie uzyskanych wyników testów antyproliferacyjnych. Uzyskane wyniki przedstawiono na *rycinie 23* jako wykresy słupkowe przedstawiające średnią aktywność kaspazy 3  $\pm$ SD dla danej linii komórkowej po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC.

Wzrost aktywności kaspazy 3 zaobserwowano zarówno w komórkach linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> jak i UM-UC-3<sup>GEM</sup> po ich 24h inkubacji z badanymi ITC w porównaniu do nietraktowanych odpowiednich komórek kontrolnych. Statystycznie istotny wzrost aktywności kaspazy 3 odnotowano dla następujących związków: ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe w najwyższym zastosowanym stężeniu czyli 15  $\mu$ M w komórkach każdej z trzech linii wymienionych powyżej (*Ryc. 23A, B, C*). Statystycznie istotny wzrost aktywności kaspazy 3 zaobserwowano również dla ITC- GABA-OMe, a także ITC-Gly-OMe w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> w stężeniu 5  $\mu$ M (*Ryc. 23C*).

Zaobserwowano jednak, iż aktywność kaspazy 3 w komórkach linii opornych, tzn. UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> była niższa aniżeli w przypadku komórek linii wyjściowej UM-UC-3. ITC-GABA-OMe spowodował w komórkach linii UM-UC-3 18-krotny wzrost aktywności kaspazy 3 w porównaniu do kontroli (*Ryc. 23A*), podczas gdy w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> (*Ryc. 23B*) oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (*Ryc. 23C*) aktywność kaspazy 3 była wyższa

odpowiednio: 4-krotnie oraz 11-krotnie po zastosowaniu tego związku w porównaniu do komórek kontrolnych.

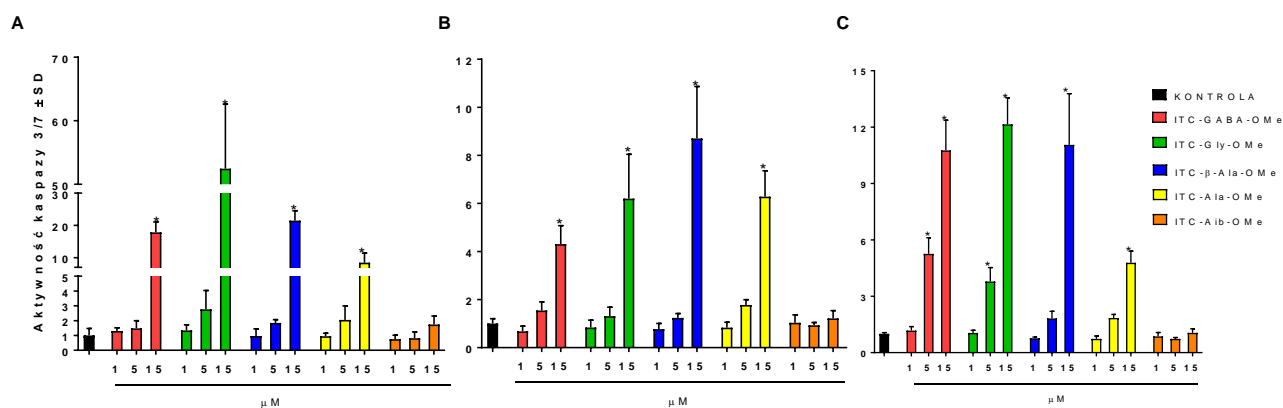
ITC-Gly-OMe spowodował 52-krotny wzrost aktywności kaspazy 3 w komórkach linii UM-UC-3 (**Ryc. 23A**), natomiast 6-krotny w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> (**Ryc. 23B**), a w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> 12-krotny, w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych (**Ryc. 23C**).

ITC-β-Ala-OMe zwiększył aktywność kaspazy 3 w komórkach linii UM-UC-3 21 razy (**ryc. 23A**), a w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> (**Ryc. 23B**) oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (**Ryc. 23C**) odpowiednio 8 razy oraz 11 razy.

Najmniejsze zaobserwowane we wzroście aktywności kaspazy 3 różnice pomiędzy liniami komórkowymi powodował ITC-Ala-OMe, gdyż w komórkach linii UM-UC-3 aktywność kaspazy 3 wzrosła 8-krotnie (**Ryc. 23A**), w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> 6-krotnie (**Ryc. 23B**), natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> 4-krotnie.

ITC-Aib-OMe nie powodował wzrostu aktywności kaspazy 3 w komórkach żadnej linii.

Cztery spośród pięciu badanych związków spowodowały wzrost aktywności kaspazy 3 zarówno w linii komórkowej UM-UC-3, jak i w liniach lekoopornych UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Jednakże w komórkach linii lekoopornych wzrost aktywności kaspazy 3 był mniejszy aniżeli w komórkach linii UM-UC-3. Związkami powodującymi największy wzrost aktywności kaspazy 3 okazały się być: ITC-Gly-OMe w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> oraz ITC-β-Ala-OMe w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>.



**Ryc. 23.** Aktywność kaspazy 3 w komórkach linii raka pęcherza moczowego (A) UM-UC-3, (B) UM-UC-3<sup>VBL</sup>, (C) UM-UC-3<sup>GEM</sup> po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$



#### **4.5.2 PORÓWNANIE LICZBY KOMÓREK APOPTOTYCZNYCH, NEKROTYCZNYCH ORAZ ŻYWYCH PO TRAKTOWANIU ITC**

W celu uzupełnienia wyników dotyczących wpływu zsyntetyzowanych ITC na indukcję apoptozy przeprowadzono test z użyciem aneksyny V mający na celu zbadanie wpływu izotiocyjanianów na liczbę komórek żywych, wczesno-, późno apoptotycznych oraz nekrotycznych. Zasada działania tego testu została opisana w rozdziale 3.7.2. Uzyskane wyniki zaprezentowano na **rycynie 24A, B, oraz C** odpowiednio dla linii komórkowych UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Wykresy przedstawiają odsetek komórek żywych, wczesno-, późno-apoptotycznych oraz nekrotycznych  $\pm$ SD dla danej linii komórkowej po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC. Wyniki uzupełniono o reprezentatywne dot-ploty dla każdego badanego związku w najwyższym zastosowanym stężeniu (**Ryc. 25**).

Zaobserwowano, iż ITC spowodowały spadek odsetka komórek żywych oraz wzrost odsetka komórek wczesno-, późno apoptotycznych, a także nekrotycznych w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych, jednakże nie we wszystkich badanych liniach komórkowych oraz nie w takim samym stopniu. Widoczne są różnice w działaniu ITC pomiędzy liniami komórkowymi, które przedstawiono poniżej.

ITC-GABA-OMe jedynie w linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> spowodował wzrost odsetka komórek nekrotycznych oraz spadek odsetka komórek żywych. W stężeniu 5  $\mu$ M spowodował on istotny wzrost odsetka komórek nekrotycznych oraz spadek odsetka komórek żywych. Odsetek tych komórek wyniósł odpowiednio 18,1% oraz 67,6% podczas gdy w komórkach kontrolnych odsetek komórek nekrotycznych wyniósł 3,9%, a odsetek komórek żywych 85,7%. Zastosowanie tego samego związku w wyższym stężeniu tzn. 15  $\mu$ M spowodowało wzrost odsetka komórek wczesno i późno apoptotycznych, tzn. odsetek tych komórek wyniósł odpowiednio 13% oraz 9,5%, a dla kontroli 5,4% oraz 5,0%. Ponadto zaobserwowano spadek odsetka komórek żywych. W tym przypadku odsetek ten wyniósł 65,3% (**Ryc. 24C**).

ITC-Gly-OMe zastosowany w stężeniu 15  $\mu$ M spowodował wzrost odsetka komórek nekrotycznych w linii UM-UC-3. Odsetek tych komórek po traktowaniu ITC wyniósł 17%, a w kontroli 3,7% (**Ryc. 24A**). W komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> zaobserwowano, iż związek ten, w najwyższym zastosowanym stężeniu, spowodował wzrost odsetka komórek późno apoptotycznych oraz spadek odsetka komórek żywych. Odsetek komórek późno apoptotycznych, które były traktowane ITC-Gly-OMe wyniósł 44,0%, a żywych 41,5%, podczas gdy w próbce kontrolnej odsetek komórek późno apoptotycznych wyniósł 10,3%, a żywych 79,1%. (**Ryc. 24B**). W linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> ITC-Gly-OMe w stężeniu 5 oraz

15  $\mu\text{M}$  spowodował wzrost odsetka komórek późno apoptotycznych oraz spadek odsetka komórek żywych, tj. odsetek komórek późno apoptotycznych wyniósł odpowiednio 14,5% oraz 28%, natomiast odsetek komórek żywych wyniósł 68,6% po zastosowaniu 5  $\mu\text{M}$  ITC-Gly-OMe oraz 52,9% po jego zastosowaniu w stężeniu 15  $\mu\text{M}$  w porównaniu do komórek kontrolnych, gdzie odsetek komórek późno apoptotycznych wyniósł 5,0%, a odsetek komórek żywych 85,7%. Ponadto związek ten w stężeniu 15  $\mu\text{M}$  spowodował wzrost odsetka komórek nekrotycznych. Odsetek ten wyniósł 10,8%, natomiast dla kontroli wyniósł 3,9% (**Ryc. 24C**).

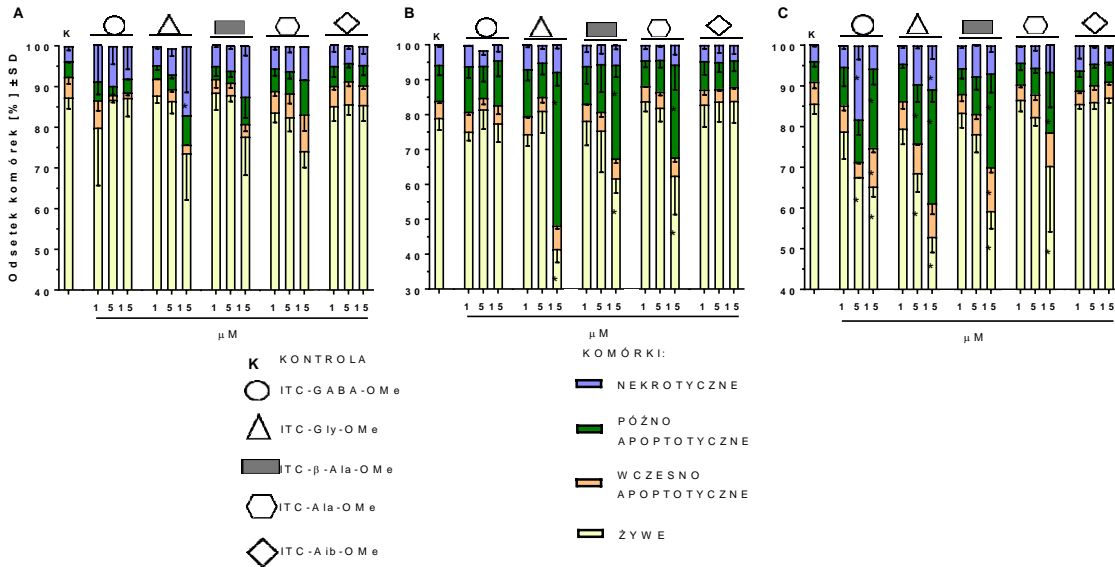
ITC- $\beta$ -Ala-OMe zarówno w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> jak i UM-UC-3<sup>GEM</sup> w stężeniu 15  $\mu\text{M}$  spowodował wzrost odsetka komórek późno apoptotycznych oraz spadek odsetka komórek żywych. Odsetek komórek żywych w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> wyniósł 61,8%, a późno-apoptotycznych 26,9%, podczas gdy w próbce kontrolnej odsetek komórek żywych wyniósł 79,1%, a późno-apoptotycznych 10,3% (**Ryc. 24B**). Natomiast w linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> odsetek komórek żywych wyniósł 59,3%, a późno-apoptotycznych 46,1% w porównaniu do komórek kontrolnych gdzie odsetek komórek żywych wyniósł 85,7%, a późno-apoptotycznych 5,0% (**Ryc. 24C**).

ITC-Ala-OMe w stężeniu 15  $\mu\text{M}$  spowodował wzrost odsetka komórek późno apoptotycznych oraz spadek odsetka komórek żywych w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> w porównaniu do komórek kontrolnych. W linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> odsetek komórek żywych wyniósł 62,5%, a odsetek komórek późno-apoptotycznych 26,6%, podczas gdy w kontroli odsetek komórek żywych wyniósł 79,1%, a późno-apoptotycznych 10,3% (**Ryc. 24B**). W linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> odsetek komórek żywych wyniósł 70,4%, a odsetek komórek późno-apoptotycznych wyniósł 14,9%, natomiast w kontroli odsetek komórek żywych wyniósł 85,7%, a późno-apoptotycznych 5,0% (**Ryc. 24C**).

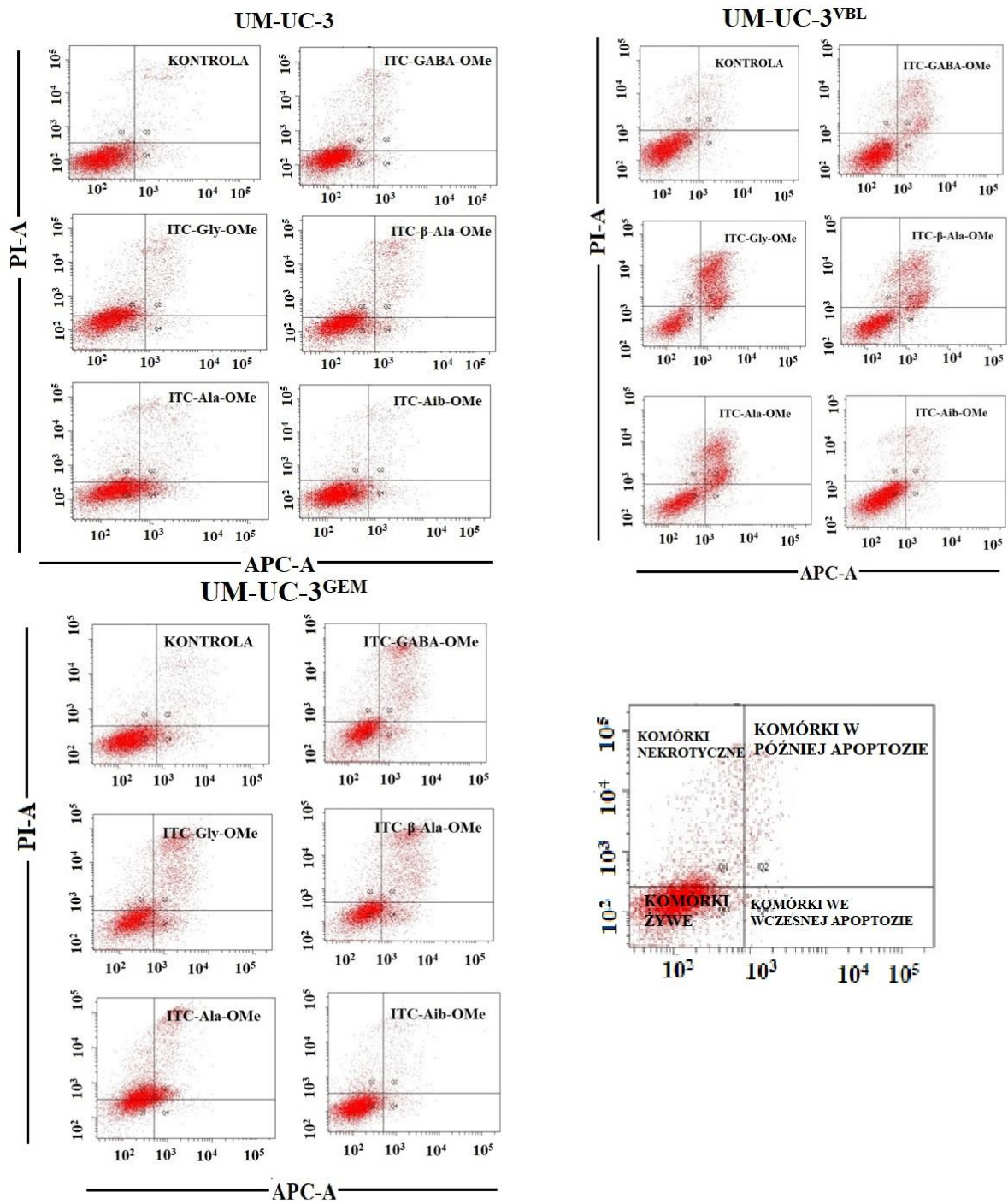
ITC-Aib-OMe w żadnej z linii komórkowych nie spowodował zmian w odsetkach komórek żywych, wczesno-, późno-apoptotycznych czy też nekrotycznych (**Ryc. 24A, B, C**).

Podsumowując, cztery spośród pięciu badanych związków spowodowały zmiany w liczbie komórek żywych, wczesno-, późno-apoptotycznych oraz nekrotycznych w liniach komórkowych: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych. Ponadto zauważano, iż zmiany w odsetkach komórek żywych, wczesno-, późno-apoptotycznych oraz nekrotycznych nastąpiły w mniejszym bądź większym stopniu w zależności od zastosowanego izotiocyanianu oraz linii komórkowej. ITC-GABA-OMe spowodował wzrost liczby komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych, a także spadek liczby komórek żywych jedynie w linii UM-UC-3<sup>GEM</sup>. ITC-Gly-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe zastosowane w stężeniu 15  $\mu\text{M}$  spowodowały wzrost

odsetka komórek późno-apoptotycznych oraz spadek odsetka komórek żywych w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. ITC-Gly-OMe oraz ITC-β-Ala-OMe większy wzrost odsetka komórek późno-apoptotycznych oraz spadek odsetka komórek żywych spowodowały w linii UM-UC-3<sup>GEM</sup>, natomiast ITC-Ala-OMe większy wzrost odsetka komórek późno-apoptotycznych oraz spadek odsetka komórek żywych spowodował w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>.



**Ryc. 24.** Porównanie odsetka komórek żywych, apoptotycznych oraz nekrotycznych za pomocą testu wykorzystującego barwienie aneksyną V w komórkach linii raka pęcherza moczowego (A) UM-UC-3, (B) UM-UC-3<sup>VBL</sup>, (C) UM-UC-3<sup>GEM</sup> po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC. Wyniki przedstawiono jako średni odsetek komórek ± SD. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$



Ryc. 25. Reprezentatywne dot-ploty przedstawiające wyniki testu z wykorzystaniem aneksyny V dla każdego badanego związku w 15  $\mu\text{M}$  stężeniu w komórkach linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Ponadto przedstawiono schematyczny dot-plot obrazujący rozkład komórek żywych, wczesno- i późno apoptotycznych oraz nekrotycznych w poszczególnych kwadrantach

### **4.5.3 ANALIZA WPŁYWU DZIAŁANIA ITC NA CYKL KOMÓRKOWY**

W kolejnym etapie badań nad mechanizmami działania wyselekcjonowanych ITC oceniono wpływ ich działania na cykl komórkowy za pomocą testu wykorzystującego BrdU oraz PI (ang. *propidium iodide*; jodek propidyny); zasada testu została opisana w rozdziale 3.7.3.

Bardzo szybkie przejścia komórek nowotworowych przez kolejne fazy cyklu komórkowego są zjawiskiem niezwykle istotnym dla wszystkich nowotworów. W trakcie podziału komórki dochodzi do podwojenia ilości jej materiału genetycznego, a następnie podziału wskutek mitozy. Próby hamowania cyklu komórkowego bardzo często są wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej [195]. Wiele badań wskazuje, iż ITC mogą hamować cykl komórkowy w fazie G2/M, dlatego też zdecydowano się sprawdzić czy zsyntetyzowane, a następnie wyselekcjonowane ITC również mają wpływ na hamowanie cyklu komórkowego. Uzyskane wyniki zaprezentowano w formie wykresów słupkowych przedstawiających odsetek komórek  $\pm$ SD (**Ryc. 26A, B** oraz **C**), odpowiednio dla linii komórkowych UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>, w każdej fazie cyklu komórkowego po działaniu na nie wyselekcjonowanymi izotiocyanianami. Ponadto przedstawiono również reprezentatywne dot-ploty dla każdego badanego związku w najwyższym zastosowanym stężeniu dla każdej linii komórkowej oraz wzorcowy dot-plot obrazujący rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (**Ryc. 27**).

ITC spowodowały zmiany w liczbie komórek będących w fazie G0/G1, S oraz G2/M w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych. Jednak zmiany w odsetkach komórek będących w danej fazie cyklu komórkowego nie we wszystkich badanych liniach komórkowych wyglądały tak samo. Widoczne są różnice w działaniu ITC na cykl komórkowy pomiędzy liniami wyjściowymi, a lekoopornymi, które przedstawiono poniżej.

ITC-GABA-OMe w linii UM-UC-3 w stężeniu 5 oraz 15  $\mu$ M spowodował istotny spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 oraz wzrost odsetka komórek w fazie G2/M. Odsetek komórek w fazie G0/G1 po zastosowaniu 5  $\mu$ M ITC-GABA-OMe wyniósł 38,6% oraz 29,4% po zastosowaniu go w stężeniu 15  $\mu$ M. Natomiast odsetek komórek w fazie G2/M po zastosowaniu 5  $\mu$ M stężenia ITC-GABA-OMe wyniósł 41,7% oraz po zastosowaniu stężenia 15  $\mu$ M 29,0%. W komórkach kontrolnych, tzn. nie traktowanych, odsetek komórek w fazie G0/G1 wyniósł 48,4%, a w fazie G2/M 18,8%. Ponadto ITC-GABA-OMe w stężeniu 5  $\mu$ M spowodował obniżenie odsetka komórek we wczesnej fazie S. Odsetek ten wynosił 6,6%, podczas gdy w kontroli 18,7% (**Ryc. 26A**). Zastosowanie tego samego związku w tych samych

stężeniach w linii komórkowej UM-UC-3<sup>VBL</sup> również spowodowało istotny spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 oraz wzrost odsetka komórek w fazie G2/M w porównaniu do komórek kontrolnych. Odsetek komórek w fazie G0/G1 po zastosowaniu 5  $\mu$ M stężenia ITC-GABA-OMe wyniósł 28,4% oraz po zastosowaniu 15  $\mu$ M stężenia 25,9%. Natomiast odsetek komórek w fazie G2/M po zastosowaniu 5  $\mu$ M stężenia ITC-GABA-OMe wyniósł 56,3% oraz po zastosowaniu stężenia 15  $\mu$ M 38,9%. Ponadto ITC-GABA-OMe w stężeniu 5  $\mu$ M w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> spowodował obniżenie odsetka komórek we wczesnej oraz późnej fazie S. Odsetek ten wynosił odpowiednio 6,9% oraz 7,7%, podczas gdy w kontroli 18,0% oraz 13,7% (**Ryc. 26B**). Zaobserwowano także, iż ITC-GABA-OMe w linii komórkowej UM-UC-3<sup>GEM</sup> zastosowany w stężeniu 5 oraz 15  $\mu$ M spowodował spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 oraz wzrost odsetka komórek w fazie G2/M. Odsetek komórek w fazie G0/G1 wyniósł 32,2% po zastosowaniu 5  $\mu$ M stężenia związku oraz 32,8% po zastosowaniu 15  $\mu$ M stężenia związku. Odsetek komórek w fazie G2/M wyniósł 49,3% po zastosowaniu 5  $\mu$ M stężenia związku oraz 43,7% po zastosowaniu 15  $\mu$ M stężenia związku. W kontroli odsetek komórek w fazie G0/G1 wyniósł 48,4%, a w fazie G2/M 22,9% (**ryc. 26C**).

ITC-Gly-OMe zastosowany w stężeniu 5 oraz 15  $\mu$ M spowodował spadek odsetka komórek we wczesnej fazie S oraz wzrost odsetka komórek w fazie G2/M w linii komórkowej UM-UC-3. Odsetek komórek we wczesnej fazie S wyniósł 7,7% po zastosowaniu 5  $\mu$ M stężenia związku oraz 12,0% po zastosowaniu 15  $\mu$ M stężenia związku. Odsetek komórek w fazie G2/M wyniósł 37,9% po zastosowaniu 5  $\mu$ M stężenia związku oraz 34,0% po zastosowaniu 15  $\mu$ M stężenia związku. W kontroli odsetek komórek we wczesnej fazie S wyniósł 18,7%, a w fazie G2/M 18,8% (**Ryc. 26A**). Natomiast w linii komórkowej UM-UC-3<sup>VBL</sup> zaobserwowano, iż ITC-Gly-OMe w stężeniu 5  $\mu$ M, spowodował spadek odsetka komórek we wczesnej oraz późnej fazie S oraz wzrost odsetka komórek w fazie G2/M. Odsetek komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> we wczesnej oraz późnej fazie S, które były traktowane ITC-Gly-OMe wyniósł odpowiednio 7,7% oraz 6,6%, podczas gdy w próbie kontrolnej odsetek komórek we wczesnej fazie S wyniósł 18,0%, a w późnej fazie S 13,7%. Odsetek komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> w fazie G2/M po traktowaniu 5  $\mu$ M ITC-Gly-OMe wyniósł 44,2%, a w komórkach kontrolnych 26,3% (**Ryc. 26B**). W linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> ITC-Gly-OMe w stężeniu 5 oraz 15  $\mu$ M spowodował jedynie wzrost odsetka komórek w fazie G2/M, tj. odsetek tych komórek wyniósł 36,3% oraz 39,9%, a w kontroli 22,9% (**Ryc. 26C**).

ITC- $\beta$ -Ala-OMe w linii komórkowej UM-UC-3 w stężeniu 5  $\mu$ M spowodował wzrost odsetka komórek w fazie G2/M, odsetek ten wyniósł 28,4%, podczas gdy w kontroli 18,8%. Ponadto związek ten w linii UM-UC-3 w stężeniu 15  $\mu$ M spowodował wzrost odsetka komórek

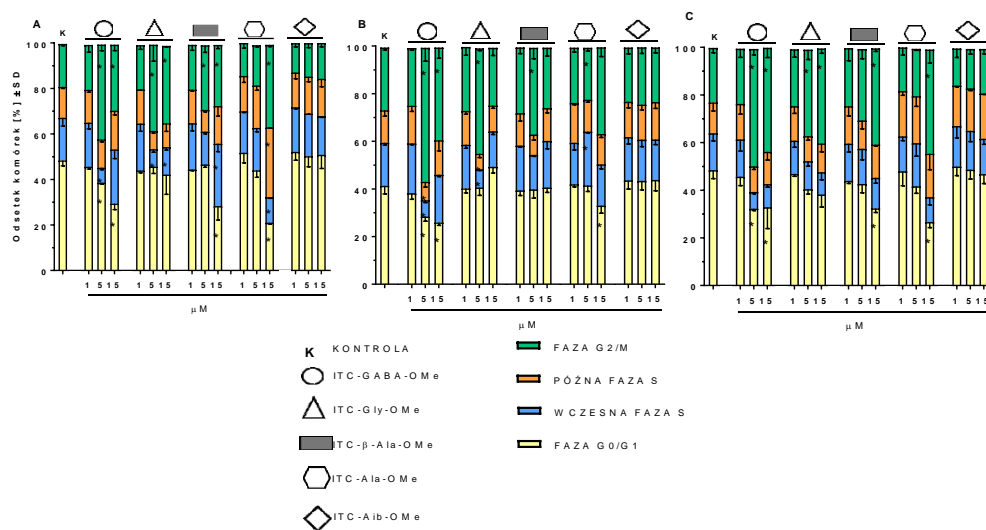
w późnej fazie S oraz w fazie G2/M. Odsetki komórek w tych fazach wyniosły odpowiednio 16,5% oraz 26,9%. W kontroli odsetek komórek w późnej fazie S wyniósł 13,6%, a w fazie G2/M 18,8% (**Ryc. 26A**). W linii komórkowej UM-UC-3<sup>VBL</sup> ITC-β-Ala-OMe jedynie w stężeniu 5 μM spowodował wzrost odsetka komórek w fazie G2/M, odsetek komórek w tej fazie wyniósł 36,5%, w porównaniu do kontroli gdzie odsetek komórek w fazie G2/M wyniósł 26,3% (**Ryc. 26B**). W linii komórkowej UM-UC-3<sup>GEM</sup> ITC-β-Ala-OMe w stężeniu 15 μM spowodował spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 oraz wzrost odsetka komórek w fazie G2/M. Odsetki te wynosiły odpowiednio 32,4% oraz 40,4%. Natomiast w kontroli odsetek komórek w fazie G0/G1 wyniósł 48,4%, a w fazie G2/M 22,9% (**Ryc. 26C**).

ITC-Ala-OMe w stężeniu 15 μM spowodował spadek odsetka komórek w fazie G0/G1, odsetek komórek w tej fazie cyklu komórkowego wyniósł 21% oraz spadek odsetka komórek we wczesnej fazie S, gdzie odsetek ten wyniósł 11,2% w linii komórkowej UM-UC-3. Ponadto zaobserwowano, iż związek ten powoduje wzrost odsetka komórek w późnej fazie S oraz w fazie G2/M w linii UM-UC-3. Odsetki te wynosiły odpowiednio 30,6% oraz 35,3%. Natomiast w kontroli odsetek komórek w fazie G0/G1 wyniósł 48,4%, we wczesnej fazie S 18,7%, w późnej fazie S 13,6%, a w fazie G2/M 18,8% (**Ryc. 26A**). W linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> 5 μM ITC-Ala-OMe spowodował wzrost odsetka komórek we wczesnej fazie S oraz w fazie G2/M. Odsetki komórek w tych fazach cyklu wynosiły odpowiednio 22,6% oraz 23,8%. W kontroli odsetek komórek we wczesnej fazie S wyniósł 18,0%, a w fazie G2/M 26,3%. Ponadto 15 μM ITC-Ala-OMe w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> spowodował spadek odsetka komórek w fazie G0/G1. Odsetek komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> w tej fazie cyklu po traktowaniu 15 μM ITC-Ala-OMe wyniósł 31,9%, a w kontroli 41,3% (**Ryc. 26B**). W linii komórkowej UM-UC-3<sup>GEM</sup> ITC-Ala-OMe w stężeniu 15 μM spowodował spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 oraz wzrost odsetka komórek w fazie G2/M. Odsetki te wynosiły odpowiednio 26,6% oraz 43,7%. Natomiast w kontroli odsetek komórek w fazie G0/G1 wyniósł 48,4%, a w fazie G2/M 22,9% (**Ryc. 26C**).

ITC-Aib-OMe w żadnej z linii komórkowych nie spowodował zmian w odsetkach komórek w żadnej z faz cyklu komórkowego.

Cztery spośród pięciu badanych związków spowodowały zmiany w liczbie komórek w fazie G0/G1, S oraz G2/M w liniach komórkowych: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych. Zaobserwowano także, iż zmiany w odsetkach komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego nastąpiły w mniejszym bądź większym stopniu w zależności od zastosowanego izotiocyanianu oraz linii komórkowej. ITC-GABA-OMe spowodował spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 oraz

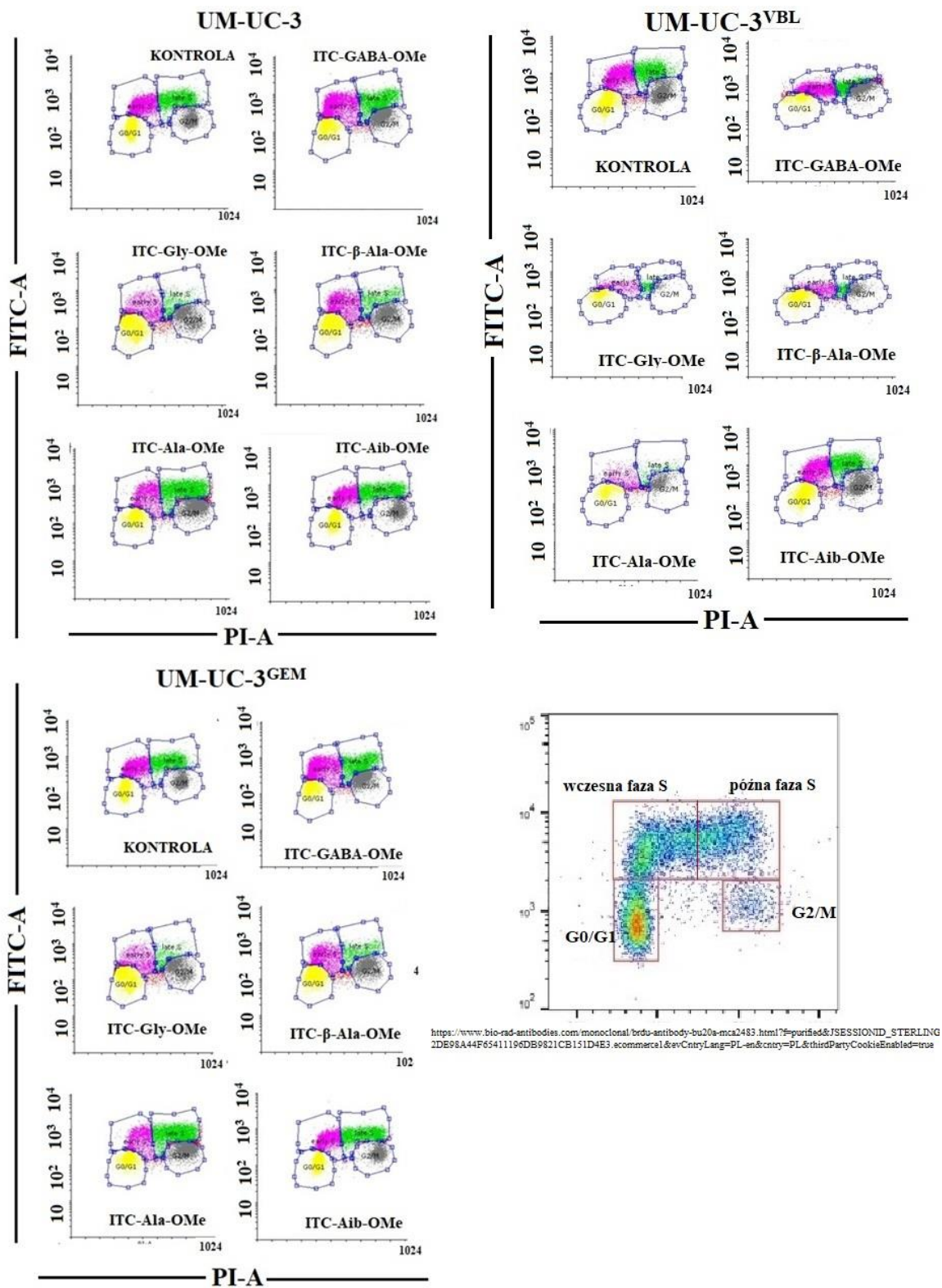
wzrost odsetka komórek w fazie G2/M we wszystkich trzech liniach komórkowych. Największy spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 zaobserwowano w linii UM-UC-3, natomiast największy wzrost odsetka komórek w fazie G2/M zaobserwowano w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>. ITC-Gly-OMe w każdej z trzech linii komórkowych spowodował wzrost odsetka komórek w fazie G2/M, jednak największy odsetek komórek w tej fazie cyklu zaobserwowano w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> po zastosowaniu 5  $\mu$ M stężenia tego związku. Ponadto ITC-Gly-OMe w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>VBL</sup> spowodował spadek odsetka komórek we wczesnej fazie S – odsetek komórek w tej fazie cyklu wynosił tyle samo w przypadku tych dwóch linii komórkowych. ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe zarówno w linii wyjściowej UM-UC-3 jak i w liniach lekoopornych UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> spowodował wzrost odsetka komórek w fazie G2/M. Największy odsetek komórek w tej fazie cyklu zaobserwowano w linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> po zastosowaniu 15  $\mu$ M stężenia tych związków. Ponadto ITC- $\beta$ -Ala-OMe w linii UM-UC-3 spowodował wzrost odsetka komórek w fazie S, a w linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> spadek odsetka komórek w fazie G0/G1.



**Ryc. 26.** Analiza cyklu komórkowego w komórkach linii (A) UM-UC-3, (B) UM-UC-3<sup>VBL</sup>, (C) UM-UC-3<sup>GEM</sup> po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC z wykorzystaniem BrdU. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  SD.

Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$





**Ryc. 27.** Reprezentatywne dot-ploty przedstawiające rozkład komórek w poszczególnych w fazach cyklu komórkowego w 15  $\mu$ M stężeniu każdego badanego związku w komórkach linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Ponadto przedstawiono wzorcowy dot-plot obrazujący rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

#### **4.5.4 WPLYW DZIAŁANIA ITC NA WŁAŚCIWOŚCI KLONOGENNE KOMÓREK RAKA PECHERZA MOCZOWEGO**

Zdolność komórek nowotworowych do tworzenia kolonii z pojedynczej komórki (klonów) jest kluczowa, szczególnie w przypadku progresji nowotworów oraz procesu przerzutowania. Związki o charakterze przeciwnowotworowym mogą modulować potencjał komórek do tworzenia kolonii. Dlatego ważnym jest, aby ocenić czy komórki jeżeli nie giną po pierwszym kontakcie ze związkami zachowują zdolność do podziałów komórkowych czy też nie [202]. W związku z tym ocenie poddano potencjał klonogeny komórek raka pęcherza po traktowaniu badanymi ITC. Wpływ działania ITC na właściwości klonogenne komórek linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> zaprezentowano na *rycinie 28A, B* oraz *C* w postaci wykresów słupkowych przedstawiających średnią liczbę kolonii wyhodowanych po 7 dniach hodowli w standardowych warunkach hodowlanych z komórek traktowanych uprzednio ITC przez 72h.

Znacznie mniejszą liczbę wyhodowanych kolonii w porównaniu do komórek nie traktowanych ITC, zaobserwowano po działaniu ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe oraz ITC-β-Ala-OMe na komórki linii: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Ponadto ITC-Ala-OMe spowodował obniżenie liczby kolonii wyhodowanych z komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (*Ryc. 28A, B, C*). Zaobserwowano jednak, iż liczba kolonii powstałych z komórek linii opornych, tzn. UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> po traktowaniu powyższymi związkami była niższa aniżeli w przypadku komórek linii wyjściowej UM-UC-3.

ITC-GABA-OMe zastosowany w stężeniu 15 μM spowodował znaczny spadek liczby kolonii komórek linii UM-UC-3, w porównaniu do komórek kontrolnych. Średnia liczba kolonii po działaniu związkiem wyniosła 37, podczas gdy liczba kolonii wyhodowanych z komórek kontrolnych wyniosła 58 (*Ryc. 28A*). ITC-GABA-OMe zarówno w stężeniu 5 jak i 15 μM zastosowany wobec komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> spowodował zmniejszenie liczby kolonii. Odpowiednio liczby kolonii wynosiły 22 oraz 4, podczas gdy średnia liczba kolonii wyhodowanych z komórek kontrolnych wyniosła 55 (*Ryc. 28B*). ITC-GABA-OMe w stężeniu 15 μM także spowodował spadek liczby kolonii wyhodowanych z komórek linii UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Liczba kolonii wyniosła 7, a liczba kolonii wyhodowanych z komórek kontrolnych wynosiła 54 (*Ryc. 28C*).

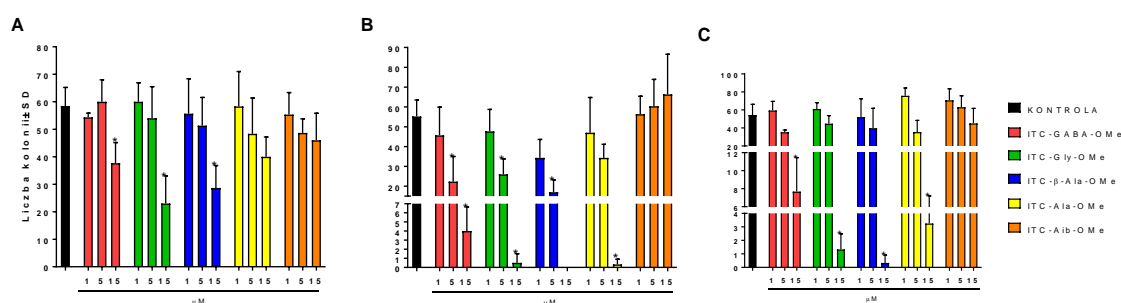
ITC-Gly-OMe w stężeniu 15 μM spowodował spadek liczby kolonii wyhodowanych z komórek linii UM-UC-3. Średnia liczba kolonii po traktowaniu tym związkiem wyniosła 23, natomiast liczba kolonii wyhodowanych z komórek kontrolnych wyniosła 58 (*Ryc. 28A*). 5 oraz 15 μM ITC-Gly-OMe spowodował zmniejszenie liczby kolonii wyhodowanych z

komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>. Odpowiednio liczby kolonii wynosiły 26 oraz 1, podczas gdy średnia liczba kolonii wyhodowanych z komórek kontrolnych wyniosła 55 (**Ryc. 28B**). Średnia liczba kolonii wyhodowana z komórek linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> potraktowanych omawianym związkiem w stężeniu 15  $\mu$ M wyniosła 1. Natomiast liczba kolonii pochodzących z komórek kontrolnych wyniosła 54 (**Ryc. 28C**).

ITC- $\beta$ -Ala-OMe zastosowany w stężeniu 15  $\mu$ M spowodował znaczny spadek liczby kolonii komórek linii UM-UC-3. Liczba wyhodowanych kolonii z komórek traktowanych ITC- $\beta$ -Ala-OMe wyniosła 28, a z komórek kontrolnych 58 (**Ryc. 28A**). ITC- $\beta$ -Ala-OMe w stężeniu 5  $\mu$ M spowodował spadek ilości kolonii do 17 wyhodowanych z komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>, natomiast z komórek traktowanych 15  $\mu$ M ITC- $\beta$ -Ala-OMe nie udało się wyhodować kolonii. Liczba kolonii wychodowanych z komórek kontrolnych wyniosła 55 (**Ryc. 28B**). Ponadto 15  $\mu$ M ITC- $\beta$ -Ala-OMe wywołuje również spadek liczby kolonii powstałych z komórek linii UM-UC-3<sup>GEM</sup>. W tym przypadku średnia liczba kolonii wyniosła 0,3, podczas gdy liczba kolonii wyhodowanych z komórek kontrolnych wyniosła 54 (**Ryc. 28C**).

ITC-Ala-OMe zastosowany w stężeniu 15  $\mu$ M zmniejszył liczbę kolonii wyhodowanych jedynie z komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Liczby kolonii wynosiły średnio odpowiednio 0,3 oraz 3, a liczba kolonii komórek kontrolnych wyniosła 55 oraz 54. ITC-Aib-OMe w żadnej z linii komórkowych nie spowodował zmniejszenia liczby kolonii.

Cztery spośród pięciu badanych związków spowodowały obniżenie potencjału klonogenego w liniach komórkowych: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych. Zaobserwowano także, iż ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe największy spadek potencjału klonogenego wywołały w linii komórkowej UM-UC-3<sup>VBL</sup>.



**Ryc. 28.** Zdolność do tworzenia kolonii przez komórki linii (A) UM-UC-3, (B) UM-UC-3<sup>VBL</sup>, (C) UM-UC-3<sup>GEM</sup> po 72h traktowania ITC. Wyniki przedstawiono jako średnią liczbę uzyskanych kolonii  $\pm$ SD. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$ .

#### **4.5.5 PORÓWNANIE STOSUNKU GLUTATIONU ZREDUKOWANEGO I UTLENIONEGO W KOMÓRKACH RAKA PEČHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU ITC**

Metabolizm wewnątrzkomórkowy wielu ksenobiotyków rozpoczyna się od ich połączenia z glutationem. ITC akumulują się w komórce poprzez łączenie się z glutationem. Usuwanie ich metabolitów nie prowadzi do ich ostatecznej dezaktywacji, lecz mogą one zostać uwolnione z połączenia z glutationem, powrócić do komórki i „wypompowywać” glutation w dalszym ciągu co powoduje „odslonięcie” tioli w białkach i działanie ITC na nie. W związku z czym zdolność izotiocyjanianów do oddziaływania z glutationem jest prawdopodobnie kluczowym mechanizmem, który decyduje o ich aktywności biologicznej [179, 180]. Dlatego też niezbędnym było zbadanie stosunku GSH/GSSG w komórkach wybranych linii po ich 24h inkubacji z wyselekcjonowanymi ITC. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie wykresów (**Ryc. 29A, B, C**) słupkowych prezentujących średni stosunek GSH/GSSG  $\pm$ SD dla danej linii komórkowej.

Spadek stosunku GSH/GSSG zaobserwowano zarówno w komórkach linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> jak i UM-UC-3<sup>GEM</sup> po ich inkubacji z badanymi ITC w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych tzn. nie traktowanych. Zaobserwowano również różnice w stosunku GSH/GSSG pomiędzy liniami komórkowymi po ich traktowaniu poszczególnymi związkami.

ITC-GABA-OMe w stężeniu 1, 5 oraz 15  $\mu$ M w komórkach wszystkich trzech linii, tzn. UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> spowodował istotny spadek stosunku GSH/GSSG w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych. Jednakże w komórkach linii UM-UC-3 średni stosunek GSH/GSSG po traktowaniu 1  $\mu$ M ITC-GABA-OMe był 2-krotnie niższy, po traktowaniu 5  $\mu$ M 3-krotnie niższy, a po traktowaniu 15  $\mu$ M 6-krotnie niższy w porównaniu do komórek kontrolnych. (**Ryc. 29A**). Natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> średni stosunek GSH/GSSG po traktowaniu 1  $\mu$ M ITC-GABA-OMe był 1,3-krotnie niższy, po traktowaniu 5  $\mu$ M 3-krotnie niższy, a po traktowaniu 15  $\mu$ M 5-krotnie niższy w porównaniu do komórek kontrolnych (**Ryc. 29B**). ITC-GABA-OMe w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> w stężeniach 1, 5 oraz 15  $\mu$ M spowodował spadek stosunku GSH/GSSG odpowiednio 1,4-krotnie, 2-krotnie oraz 5-krotnie w porównaniu do komórek kontrolnych (**Ryc. 29C**).

ITC-Gly-OMe w stężeniu 1, 5 oraz 15  $\mu$ M w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> spowodował istotny spadek stosunku GSH/GSSG w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych. W komórkach linii UM-UC-3 stosunek GSH/GSSG po traktowaniu 1  $\mu$ M ITC-Gly-OMe był 2-krotnie niższy, po traktowaniu 5  $\mu$ M ITC-Gly-OMe

2,5-krotnie, a po zastosowaniu 15  $\mu\text{M}$  stężenia był 8-krotnie niższy w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych (**Ryc. 29A**). Natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> zaobserwowano 1,2-krotny, 2-krotny oraz 3-krotny spadek stosunku GSH/GSSG po zastosowaniu ITC-Gly-OMe odpowiednio w stężeniach 1, 5 oraz 15  $\mu\text{M}$  w porównaniu do komórek kontrolnych (**Ryc. 29C**). W komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> ITC-Gly-OMe w stężeniu 5 oraz 15  $\mu\text{M}$  spowodował 2-krotny oraz 6-krotny spadek stosunku GSH/GSSG w porównaniu do komórek kontrolnych (**Ryc. 29B**).

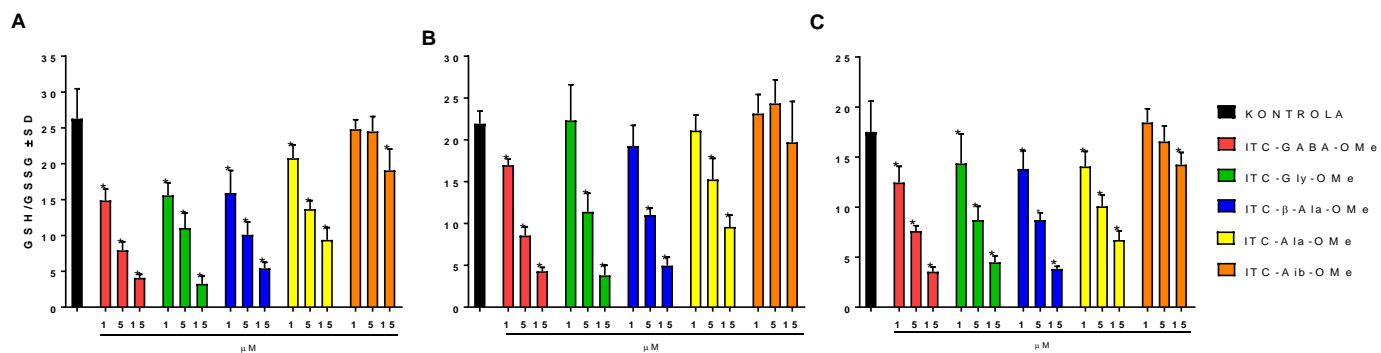
ITC- $\beta$ -Ala-OMe w stężeniu 1, 5 oraz 15  $\mu\text{M}$  w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> spowodował istotny spadek stosunku GSH/GSSG w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych. W komórkach linii UM-UC-3 stosunek GSH/GSSG po traktowaniu 1  $\mu\text{M}$  ITC- $\beta$ -Ala-OMe był 2-krotnie niższy, po traktowaniu 5  $\mu\text{M}$  ITC- $\beta$ -Ala-OMe 3-krotnie, a po zastosowaniu 15  $\mu\text{M}$  stężenia był 5-krotnie niższy w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych (**ryc. 29A**). Natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> zaobserwowano 1,3-krotny, 2-krotny oraz 5-krotny spadek stosunku GSH/GSSG po zastosowaniu ITC- $\beta$ -Ala-OMe odpowiednio w stężeniach 1, 5 oraz 15  $\mu\text{M}$  w porównaniu do komórek kontrolnych (**ryc. 29C**). W komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> ITC- $\beta$ -Ala-OMe w stężeniu 5 oraz 15  $\mu\text{M}$  spowodował 2-krotny oraz 4-krotny spadek stosunku GSH/GSSG w porównaniu do komórek kontrolnych (**Ryc. 29B**).

ITC-Ala-OMe w stężeniu 1, 5 oraz 15  $\mu\text{M}$  w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> spowodował istotny spadek stosunku GSH/GSSG w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych. W komórkach linii UM-UC-3 stosunek GSH/GSSG po traktowaniu 1  $\mu\text{M}$  ITC-Ala-OMe był 1,3-krotnie niższy, po traktowaniu 5  $\mu\text{M}$  ITC-Ala-OMe 2-krotnie, a po zastosowaniu 15  $\mu\text{M}$  stężenia był 3-krotnie niższy w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych (**Ryc. 29A**). Natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> zaobserwowano 1,2-, 1,7- oraz 2,6-krotny spadek stosunku GSH/GSSG po zastosowaniu ITC-Ala-OMe odpowiednio w stężeniach 1, 5 oraz 15  $\mu\text{M}$  w porównaniu do komórek kontrolnych (**Ryc. 29C**). W komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> ITC-Ala-OMe w stężeniu 5 oraz 15  $\mu\text{M}$  spowodował odpowiednio 1,4-krotny oraz 2,3-krotny spadek stosunku GSH/GSSG w porównaniu do komórek kontrolnych (**Ryc. 29B**).

ITC-Aib-OMe jedynie zastosowany w stężeniu 15  $\mu\text{M}$  spowodował spadek stosunku GSH/GSSH w komórkach linii UM-UC-3 1,4-krotnie (**Ryc. 29A**) oraz w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> 1,2-krotnie (**Ryc. 29C**) w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych.

ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe spowodowały zmniejszenie stosunku GSH/GSSG w komórkach linii: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz

UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Natomiast ITC-Aib-OMe zmniejszył stosunek GSH/GSSG jedynie w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Zaobserwowano również, iż wszystkie związki spowodowały największy spadek stosunku GSH/GSSG w komórkach linii UM-UC-3. A największy spadek tego stosunku spowodował ITC-Gly-OMe.



**Ryc. 29.** Stosunek glutationu zredukowanego do utlenionego w komórkach linii raka pęcherza moczowego (A) UM-UC-3, (B) UM-UC-3<sup>VBL</sup>, (C) UM-UC-3<sup>GEM</sup> po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD.

Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$

#### **4.5.6 OCENA POLIMERYZACJI TUBULINY W OBECNOŚCI WYSELEKCJONOWANYCH ITC**

Mikrotubule, składające się z tubuliny, są jedną z głównych składowych cytoszkieletu, w związku z tym odgrywają istotne role w procesach komórkowych, do których zaliczyć można podziały komórek czy też migrację. Tubulina to polimer dynamiczny, a wpływ na tą dynamikę mają związki o charakterze antymitotycznym - antymitotyki. Związki o charakterze antymitotycznym mogą tą dynamikę zmniejszać, co sprawia, że tubulina staje się coraz bardziej sztywna i nie jest zdolna do wykonywania swojej funkcji. Jednakże związki takie mogą również zwiększać dynamikę polimeryzacji tubuliny, tzn., iż okresy „rozpadu” tubuliny są zbyt długie, co prowadzi do stopniowego rozpadu tubuliny, która nie może wykonywać swojej funkcji. Modelowy wykres prezentujący kinetykę polimeryzacji tubuliny przedstawiono na **rycinie 31F**. Na wykresie widoczne są trzy charakterystyczne fazy polimeryzacji tubuliny: I – faza nukleacji, II – faza polimeryzacji oraz III – faza równowagi. W ostatnim czasie wiele miejsca poświęca się związkom wpływającym na polimeryzację tubuliny, a w szczególności jej hamowanie, które prowadzi do zaburzenia podziałów komórkowych. Izotiocyaniany są jednymi ze związków, które istotnie wpływają na proces polimeryzacji tubuliny [197]. W związku z powyższym zdecydowano o przeprowadzeniu testu sprawdzającego wpływ wyselekcjonowanych w poprzednim etapie badań ITC na szybkość polimeryzacji tubuliny. Wyniki przedstawiono na wykresach prezentujących kinetykę polimeryzacji tubuliny w obecności badanych ITC w stężeniach 5, 10 oraz 25  $\mu\text{M}$  (**Ryc. 30A – F** oraz **Ryc. 32A - E**) oraz w **tabeli 38** przedstawiającej wartości określające szybkość polimeryzacji tubuliny [RFU/min] oraz procent jej zahamowania. Stężenia związków do badań zostały wybrane na podstawie uprzednio przeprowadzonych badań w naszym zespole.

W pierwszym eksperymencie zbadano wpływ ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe, ITC-Ala-OMe, ITC-Aib-OMe oraz BITC (będący naturalnie występującym ITC o udowodnionym działaniu przeciwnowotworowym) na szybkość polimeryzacji tubuliny (**Ryc. 30A - F**). Szybkość polimeryzacji tubuliny jest tym mniejsza im mniejsza jest wyznaczona wartość RFU/min, co jest równoznaczne z hamowaniem polimeryzacji tubuliny. ITC-GABA-OMe (**Ryc. 30A**), ITC-Gly-OMe (**Ryc. 30B**) oraz ITC-Ala-OMe (**Ryc. 30D**) były najbardziej aktywne w stężeniu 25  $\mu\text{M}$ , tzn. że tubulina pod wpływem działania wyżej wymienionych ITC w stężeniu 25  $\mu\text{M}$  polimeryzowała najwolniej. Natomiast ITC- $\beta$ -Ala-OMe (**Ryc. 30C**) oraz ITC-Aib-OMe (**Ryc. 30E**) najbardziej aktywne były w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ . Szybkość polimeryzacji tubuliny pod wpływem badanych związków odniesiono również do szybkości polimeryzacji tubuliny pod wpływem działania BITC. Z pięciu testowanych związków jedynie ITC-Gly-OMe – 117,2 RFU/min (**Ryc. 30B**) oraz ITC-Ala-OMe –

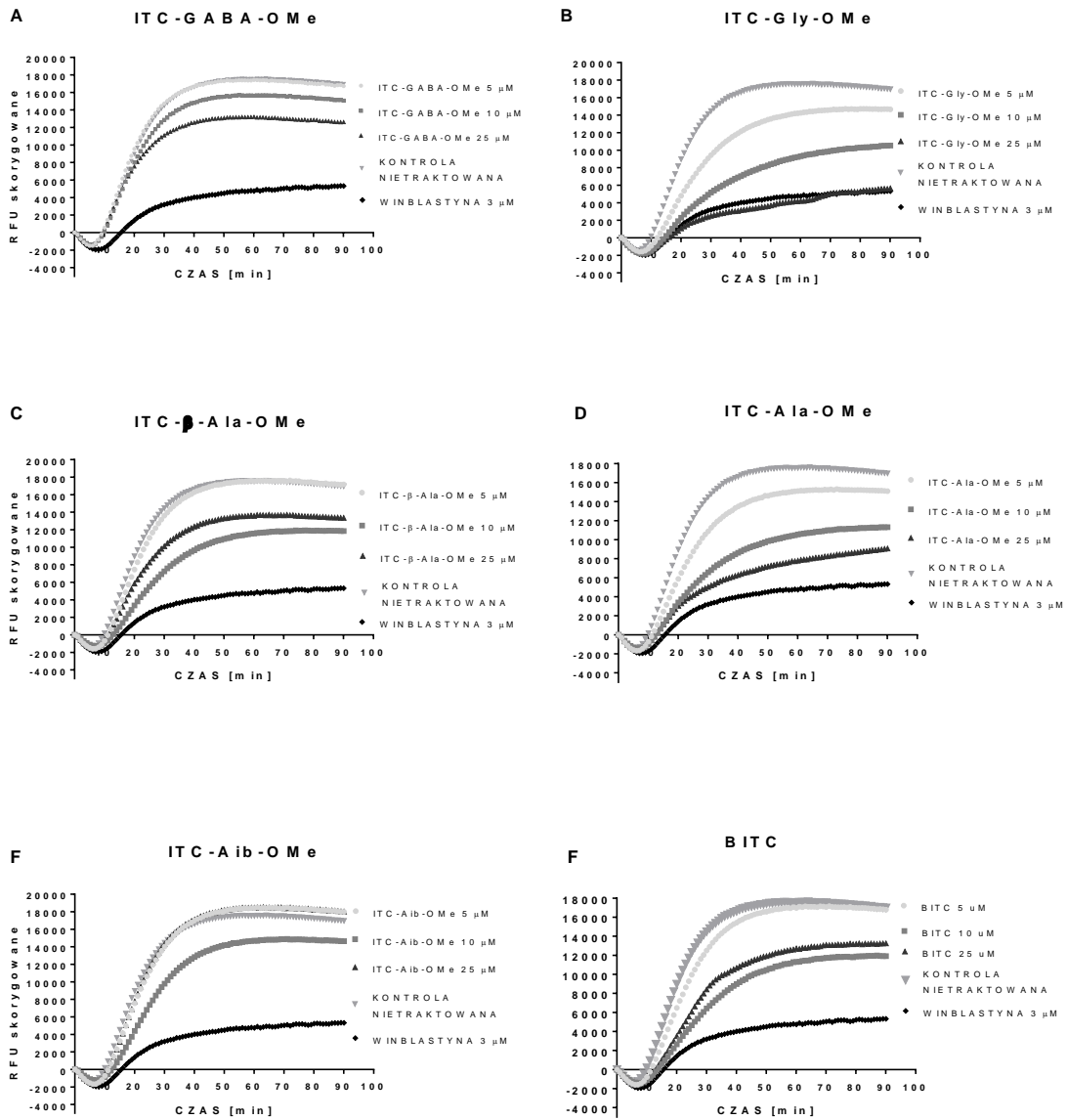
221,8 RFU/min (**Ryc. 30D**) spowodowały silniejsze hamowanie polimeryzacji tubuliny aniżeli BITC – 373,3 RFU/min (**Ryc. 30F**).

W drugim eksperymencie, którego celem była ocena wpływu grupy estrowej na aktywność badanych izotiocyanianów jako inhibitorów polimeryzacji tubuliny przebadano wszystkie dostępne pochodne alaniny, tj. estry butylowy, etylowy, benzyłowy, *iso*-propylowy oraz heksylowy (**Ryc. 31A - E**).<sup>1</sup> Spośród pochodnych alaniny najbardziej aktywnym okazał się być ITC-Ala-OMe – 221,8 RFU/min, zastosowany w stężeniu 25  $\mu$ M (**Ryc. 30D**) związek ten został przebadany w pierwszym eksperymencie). Drugim związkiem o największej aktywności okazał się być ITC-Ala-OEt – 234,7 RFU/min zastosowany w stężeniu 25  $\mu$ M (**Ryc. 31D**). Natomiast ITC-Ala-OBu znalazł się na trzecim miejscu pod względem aktywności – 247 RFU/min (**Ryc. 31A**). ITC-Ala-*i*Pr (**Ryc. 31D**), ITC-Ala-oHeks (**Ryc. 31E**) oraz ITC-Ala-oBzl (**Ryc. 32C**) osiągnęły następujące wartości szybkości polimeryzacji tubuliny: 269,9 RFU/min, 289,8 RFU/min oraz 338,2 RFU/min.

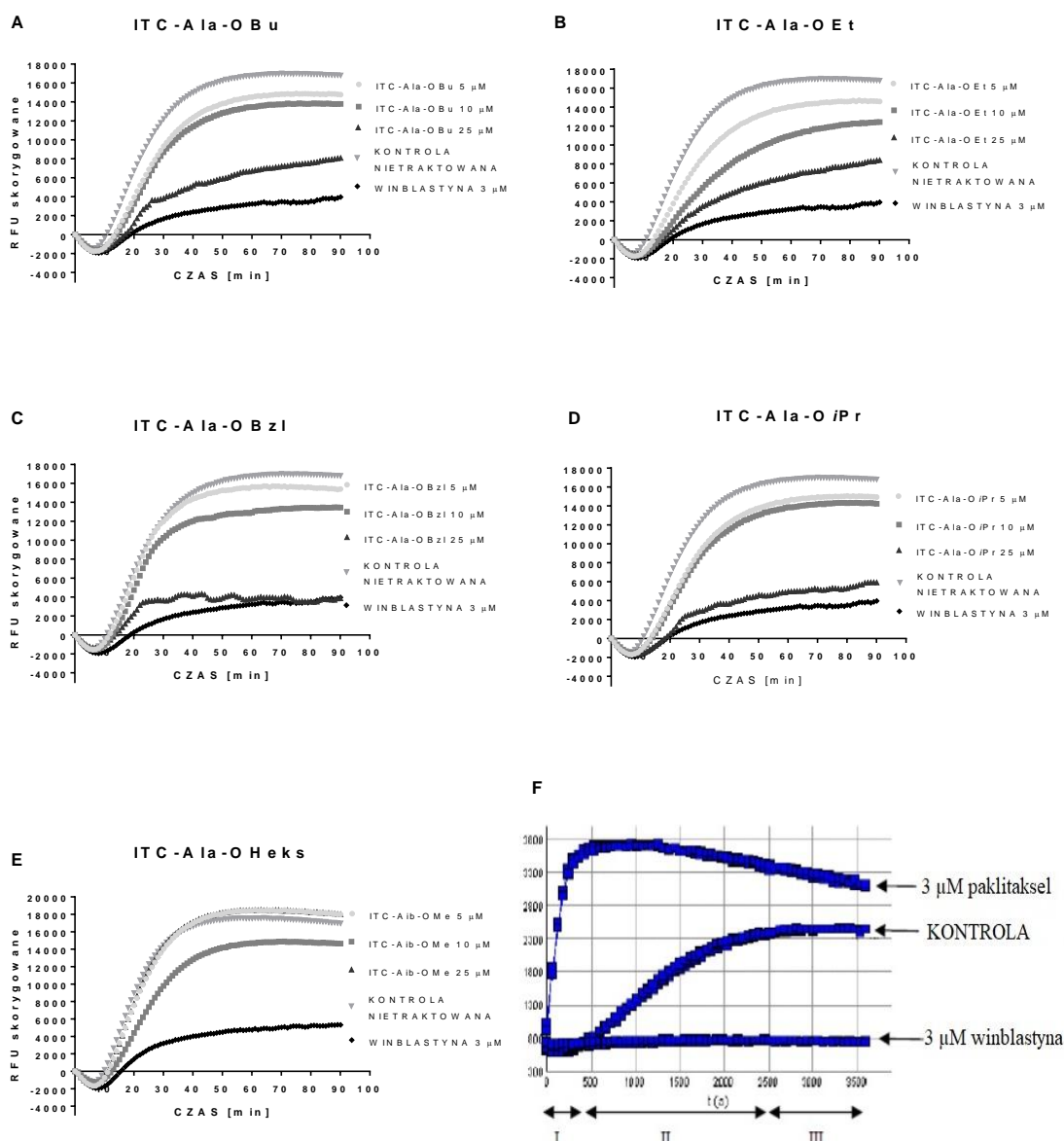
---

<sup>1</sup> Ze względu na mniejszą liczbę dostępnych estrów nie wykorzystano do tego celu pochodnych glicyny, pomimo jej nieznacznie wyższej aktywności w pierwszym eksperymencie.





Ryc. 30. Kinetyka polimeryzacji tubuliny w obecności badanych ITC (pierwszy eksperyment).



**Ryc. 31.** Kinetyka polimeryzacji tubuliny w obecności ITC będących pochodnymi alaniny, tj. ester butylowy, etylowy, benzylowy, iso-propylowy oraz heksylowy (drugi eksperyment). Ponadto zaprezentowano wzorcowy wykres przedstawiający trzy fazy polimeryzacji tubuliny (F).

Ponadto, poza szybkością polimeryzacji tubuliny, został obliczony również procent jej zahamowania pod wpływem badanych związków względem kontroli nietraktowanej (**Tab. 38**). Siedem z dwunastu związków w 25 μM stężeniu spowodowało zahamowanie polimeryzacji tubuliny powyżej 50%. Są to następujące związki: ITC-Gly-OMe (75,4%), ITC-Ala-OMe (52,6%), ITC-Ala-OBu (54,8%), ITC-Ala-OEt (52,8%), ITC-Ala-OBzl (78,4%), ITC-Ala-OiPr (67,4%) oraz ITC-Ala-OHeks (66,6%).

*Tab. 38. Szybkość polimeryzacji tubuliny oraz procent jej zahamowania względem kontroli nietraktowanej pod wpływem działania badanych ITC*

<b>Szybkość polimeryzacji tubuliny [RFU/min]</b>			
<b>Związek</b>	<b>Stężenie [<math>\mu\text{M}</math>]</b>		
	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>25 <math>\mu\text{M}</math></b>
ITC- GABA-OMe	827,8	738,5	627,3
ITC- Gly-OMe	545,9	350,3	117,2
ITC- $\beta$ -Ala-OMe	743,7	433,9	544,6
ITC-Ala- OMe	500,9	327,5	221,8
ITC-Aib-OMe	637,6	526,8	650,4
ITC-Ala-OBu	507,5	495,5	247,0
ITC-Ala-OEt	476,1	352,2	234,7
ITC-Ala-OBzl	638,6	585,7	338,2
ITC-Ala-OiPr	548,7	535,2	269,9
ITC-Ala-OHeks	457,1	412,7	289,8
BITC	615,3	373,3	468,4
Kontrola nietraktowana [woda]	736,8	————	————

<b>% zahamowania polimeryzacji tubuliny</b>			
<b>Związek</b>	<b>Stężenie [<math>\mu\text{M}</math>]</b>		
	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>25 <math>\mu\text{M}</math></b>
ITC-GABA-OMe	1,0	10,8	25,2
ITC-Gly-OMe	16,7	44,0	75,4
ITC- $\beta$ -Ala-OMe	0,1	32,1	22,3
ITC-Ala- OMe	11,8	35,8	52,6
ITC-Aib-OMe	5,0	16,0	5,2
ITC-Ala-OBu	12,3	18,3	54,8
ITC-Ala-OEt	13,5	27,5	52,9
ITC-Ala-OBzl	8,3	20,6	78,4
ITC-Ala-OiPr	11,3	15,5	67,4
ITC-Ala-OHeks	10,0	18,5	42,9
BITC	2,6	32,2	26,1

W sumie przebadano 11 związków pod względem możliwości hamowania polimeryzacji tubuliny pod wpływem ich działania. W pierwszym eksperymencie przeanalizowano wpływ 6 związków na hamowanie polimeryzacji tubuliny. ITC-Gly-OMe oraz ITC-Ala-OMe okazały się być najbardziej aktywnymi związkami. Ponadto wykazały one wyższą aktywność aniżeli BITC. W drugim eksperymencie przeanalizowano wpływ grupy estrowej na aktywność badanych izotiocyanianów jako inhibitorów polimeryzacji tubuliny. ITC-Ala-OMe również w tym przypadku okazał się najbardziej aktywnym związkiem.

#### **4.5.7 ANALIZA EKSPRESJI $\alpha$ - ORAZ $\beta$ -TUBULINY W LIZATACH KOMÓRKOWYCH PO TRAKTOWANIU ITC**

$\alpha$ -tubulina oraz  $\beta$ -tubulina, których strukturalne zmiany wynikają z kowalencyjnego oddziaływania ITC z grupami –SH zmieniają dynamikę procesu polimeryzacji tubuliny (podobnie jak czynią to „klasyczne” antymitotyki), ale powodują również ich ubikwitynację i kierowanie zmodyfikowanych tubulin do degradacji w proteasomie skutkując obniżeniem poziomu tych białek w cytozolu. Jest to właściwość, która nigdy nie została zaobserwowana w przypadku działania „standardowych” modulatorów polimeryzacji tubuliny, takich jak *vinca* alkaloidy czy też taksany [198-201]. Dlatego też w następnym etapie badań przeanalizowano poziom genów kodujących  $\alpha$ -tubulinę (*TUBA8*) oraz  $\beta$ -tubulinę (*TUBB6*) w komórkach linii: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> po ich 24h traktowaniu ITC za pomocą techniki Real Time PCR. Otrzymane wyniki przedstawiono na **rycinie 32A - F** w formie wykresów słupkowych prezentujących średnią krotność ekspresji genów  $\pm$ SD dla danej linii komórkowej w porównaniu do komórek kontrolnych. Ze względu na to, iż ITC-Aib-OMe w porównaniu do pozostałych czterech związków nie wykazał we wcześniej przeprowadzonych testach żadnej aktywności, m.in.: nie zwiększał aktywności kaspazy 3, nie powodował wzrostu liczby komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych, nie wpłynął znacząco na cykl komórkowy komórek linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>, jak również nie spowodował on spadku stosunku GSH/GSSG, nie został ujęty w analizach real time PCR, a także w następnym badaniu dotyczącym przeanalizowania poziomu białek:  $\alpha$ -tubuliny oraz  $\beta$ -tubuliny.

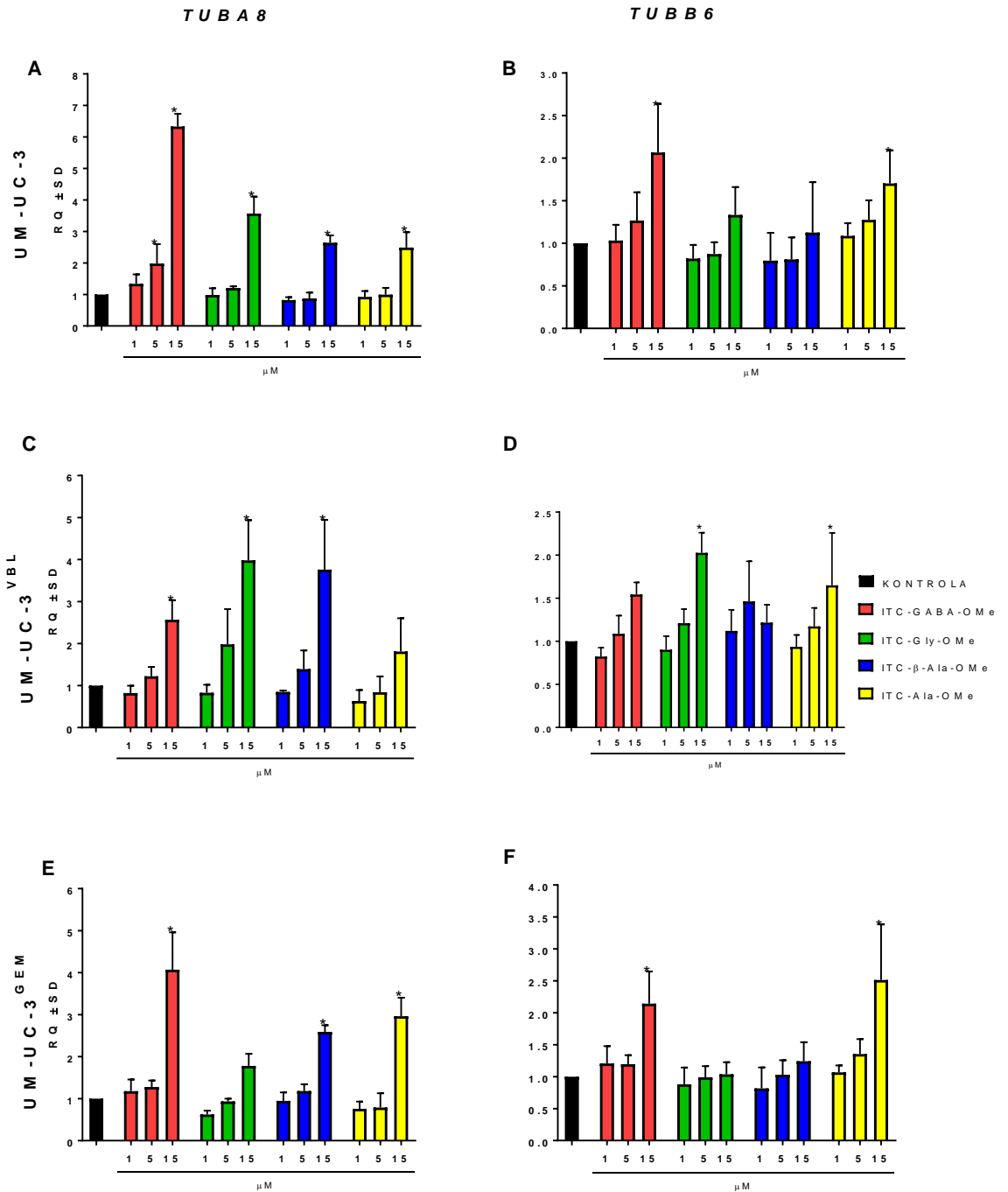
ITC-GABA-OMe w stężeniu 5  $\mu$ M w komórkach linii UM-UC-3 spowodował 2-krotny wzrost ekspresji *TUBA8*, a w stężeniu 15  $\mu$ M 6,3-krotny (**Ryc. 32A**). Ponadto związek ten w stężeniu 15  $\mu$ M spowodował także 2-krotny wzrost ekspresji *TUBB6* w porównaniu do komórek kontrolnych (**Ryc. 32B**). W komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> 15  $\mu$ M ITC-GABA-OMe spowodował natomiast 2,5-krotny wzrost ekspresji *TUBA8* w porównaniu do komórek kontrolnych (**Ryc. 32C**). Ponadto zaobserwowano, iż ITC-GABA-OMe w stężeniu 15  $\mu$ M spowodował wzrost ekspresji zarówno *TUBA8* jak i *TUBB6* w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> odpowiednio 4-krotnie oraz 2,1-krotnie (**Ryc. 32E** oraz **F**).

ITC-Gly-OMe zastosowany w stężeniu 15  $\mu$ M spowodował 3,5-krotny wzrost ekspresji *TUBA8* w komórkach linii UM-UC-3 (**Ryc. 32A**), natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> po zastosowaniu tego związku zaobserwowano 3,9-krotny oraz 2-krotny wzrost ekspresji odpowiednio *TUBA8* oraz *TUBB6* (**Ryc. 32C** oraz **D**).

ITC- $\beta$ -Ala-OMe w stężeniu 15  $\mu$ M w komórkach wszystkich trzech linii: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> spowodował wzrost ekspresji *TUBA8* odpowiednio 2,6-krotnie (**Ryc. 32A**), 3,7-krotnie (**Ryc. 32C**) oraz 2,6-krotnie (**Ryc. 32E**).

Ostatni badany związek ITC-Ala-OMe w stężeniu 15  $\mu$ M w komórkach linii UM-UC-3 wywołał 2,5-krotny wzrost ekspresji *TUBA8* (**Ryc. 32A**) oraz 1,7-krotny *TUBB6* (**Ryc. 32B**), w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> 1,6-krotny (**Ryc. 32D**), natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> ITC-Ala-OMe spowodował 3-krotny wzrost ekspresji *TUBA8* (**Ryc. 32E**) oraz 2,5-krotny *TUBB6* (**Ryc. 32F**).

Podsumowując, ITC-GABA-OMe spowodował wzrost ekspresji *TUBA8* oraz *TUBB6* w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>, a w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> zaobserwowano jedynie wzrost ekspresji genu *TUBA8*. ITC-Gly-OMe spowodował wzrost ekspresji *TUBA8* w komórkach linii UM-UC-3, natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> związek ten spowodował wzrost ekspresji zarówno genu *TUBA8* jak i *TUBB6*. W komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> nie zaobserwowano wzrostu ekspresji żadnego z dwóch badanych genów pod wpływem działania ITC-Gly-OMe. ITC- $\beta$ -Ala-OMe w komórkach wszystkich trzech linii spowodował wzrost ekspresji jedynie genu *TUBA8*. Ostatni z badanych związków, ITC-Ala-OMe spowodował wzrost ekspresji *TUBA8* oraz *TUBB6* w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>, a w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> zaobserwowano jedynie wzrost ekspresji genu *TUBB6*. Ponadto zauważano, iż wzrost ekspresji badanych genów nastąpił w mniejszym bądź większym stopniu w zależności od zastosowanego izotiocyanianu oraz linii komórkowej. Jeżeli chodzi o wzrost ekspresji genu *TUBA8* pod wpływem działania ITC-GABA-OMe największy jego wzrost zaobserwowano w komórkach linii UM-UC-3. ITC-Gly-OMe oraz ITC- $\beta$ -Ala-OMe wywołały największy wzrost *TUBA8* w komórkach linii lekoopornych UM-UC-3<sup>VBL</sup>. Natomiast ITC-Ala-OMe największy wzrost ekspresji *TUBA8* wywołał w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Jeżeli chodzi o wzrost ekspresji genu *TUBB6* zaobserwowano, iż ITC-GABA-OMe wywołał wzrost ekspresji tego genu w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>VBL</sup> na podobnym poziomie. ITC-Gly-OMe spowodował wzrost ekspresji *TUBB6* jedynie w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>, a ITC- $\beta$ -Ala-OMe w komórkach żadnej linii nie wywołał wzrostu ekspresji tego genu. ITC-Ala-OMe spowodował większy wzrost ekspresji *TUBB6* w komórkach linii lekoopornej UM-UC-3<sup>GEM</sup>, aniżeli w komórkach linii UM-UC-3.



**Ryc. 32.** Porównanie ekspresji *TUBA8* oraz *TUBB6* w komórkach linii *UM-UC-3*, *UM-UC-3<sup>VBL</sup>* oraz *UM-UC-3<sup>GEM</sup>* po 24h traktowania ITC. Wyniki normalizowano do ilości mRNA *GAPDH* i odniesiono je do komórek nietraktowanych, tzn. KONTROLI. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  SD. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$

#### **4.5.8 ANALIZA POZIOMU WYBRANYCH BIAŁEK W LIZATACH KOMÓRKOWYCH PO TRAKTOWANIU ITC**

W celu uzupełnienia wyników dotyczących zmian w ekspresji  $\alpha$ -tubuliny oraz  $\beta$ -tubuliny w komórkach linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> po ich 24h traktowaniu badanymi ITC, zdecydowano o przeprowadzeniu analizy poziomu  $\alpha$ -tubuliny oraz  $\beta$ -tubuliny za pomocą techniki western blot. Ze względu na zaobserwowane hamowanie cyklu komórkowego przez ITC w fazie G2/M przeanalizowano również poziom białka p21, które jest regulatorem cyklu komórkowego oraz prowadzi do jego hamowania w fazie G2/M [202]. Otrzymane wyniki przedstawiono na *rycynie 33A - I* w formie wykresów słupkowych przedstawiających średni poziom badanych białek w komórkach po traktowaniu ITC  $\pm$ SD oraz reprezentatywne obrazy western blot (*Ryc. 34A - C*).

ITC-GABA-OMe w stężeniu 15  $\mu$ M spowodował około 2-krotny spadek poziomu  $\alpha$ -tubuliny w komórkach linii UM-UC-3 (*Ryc. 33A*), UM-UC-3<sup>VBL</sup> (*Ryc. 33D*) oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (*Ryc. 33G*) w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych – nie traktowanych. ITC-Gly-OMe nie spowodował istotnych zmian w poziomie  $\alpha$ -tubuliny w komórkach żadnej z trzech linii (*Ryc. 33A, D, G*). ITC- $\beta$ -Ala-OMe zastosowany w stężeniu 15  $\mu$ M spowodował odpowiednio 1,4-krotny (*ryc. 33A*) oraz 1,7-krotny (*Ryc. 33D*) spadek poziomu  $\alpha$ -tubuliny w komórkach linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>VBL</sup>. Natomiast ITC-Ala-OMe w stężeniu 15  $\mu$ M wywołał 1,6-krotny spadek poziomu  $\alpha$ -tubuliny w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> (*Ryc. 33D*) oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (*Ryc. 33G*).

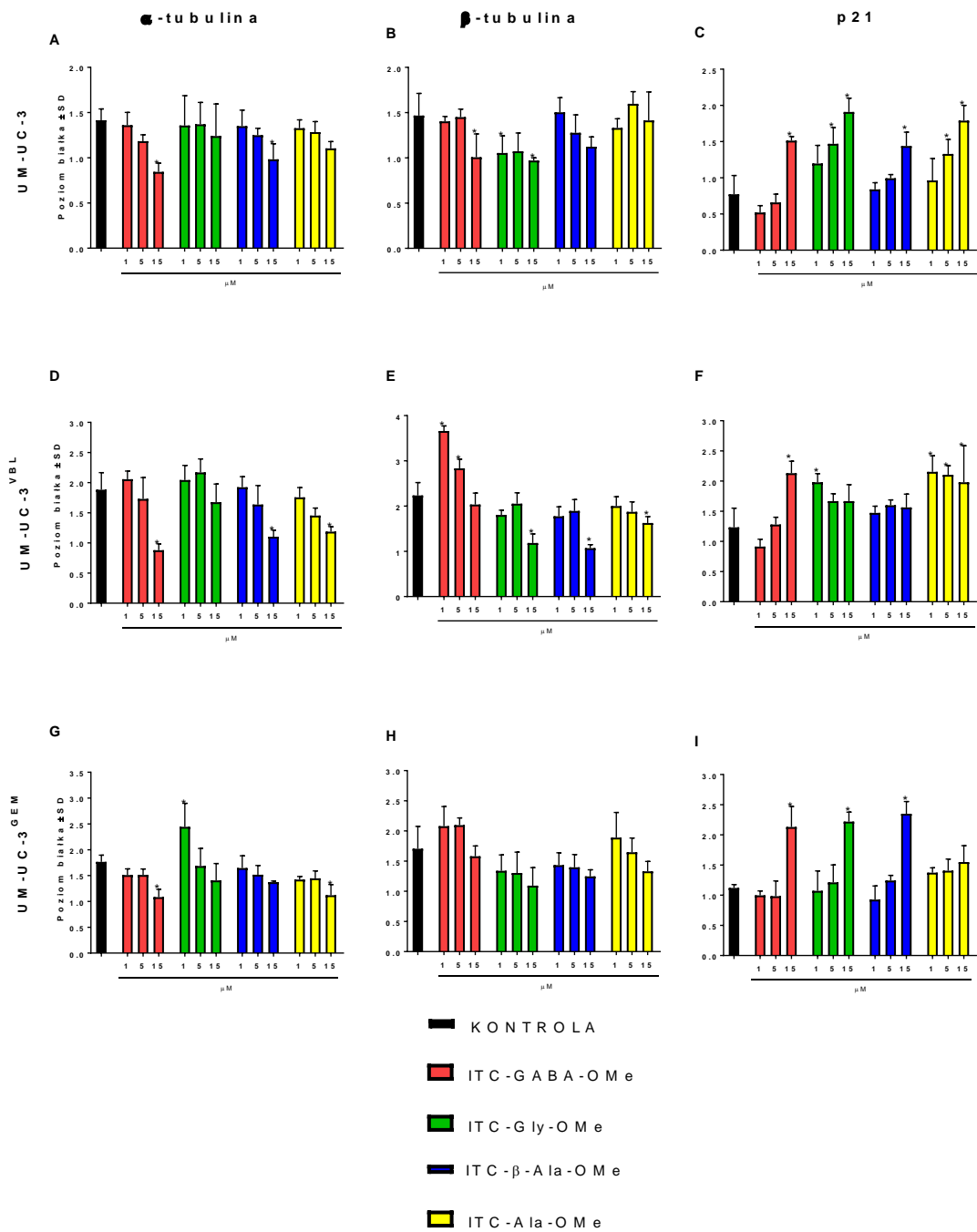
ITC-GABA-OMe w stężeniu 15 $\mu$ M spowodował 1,5-krotny spadek poziomu  $\beta$ -tubuliny w komórkach linii UM-UC-3 (*Ryc. 33B*), natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> w stężeniu 1 oraz 5  $\mu$ M spowodował odpowiednio 1,7-krotny oraz 1,3-krotny wzrost ekspresji  $\beta$ -tubuliny (*Ryc. 33E*). ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe jedynie w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> w stężeniu 15  $\mu$ M spowodowały odpowiednio 2-krotny oraz 1,3-krotny spadek poziomu  $\beta$ -tubuliny odpowiednio (*Ryc. 33E*).

Wszystkie badane ITC spowodowały wzrost poziomu białka p21. 15  $\mu$ M ITC-GABA-OMe zarówno w komórkach linii UM-UC-3 (*Ryc. 33C*) jak i w komórkach lekoopornych linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> (*Ryc. 33F*) oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (*Ryc. 33I*) spowodował prawie 2-krotny wzrost poziomu p21. ITC-Gly-OMe w komórkach linii UM-UC-3 również spowodował około 2-krotny wzrost poziomu p21 po zastosowaniu tego związku w stężeniu 5  $\mu$ M oraz w stężeniu 15  $\mu$ M (*Ryc. 33C*). 1  $\mu$ M ITC-Gly-OMe w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> wywołał 1,6-krotny wzrost poziomu p21 (*Ryc. 33F*), a 15  $\mu$ M spowodował 2-krotny wzrost poziomu p21 w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> (*Ryc. 33I*). ITC- $\beta$ -Ala-OMe

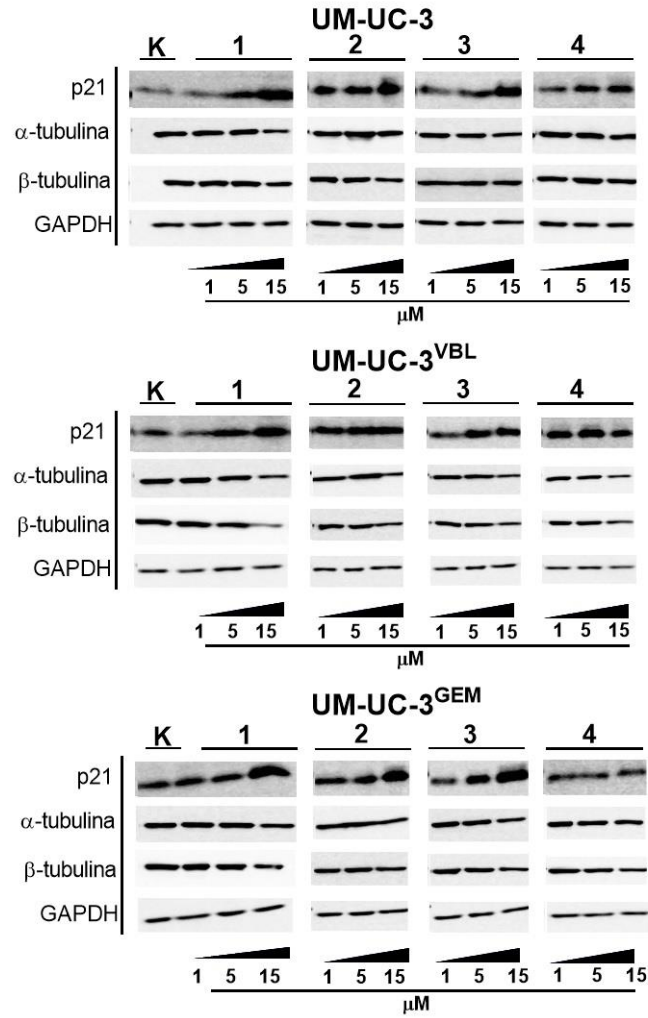
w stężeniu 15  $\mu\text{M}$  spowodował 1,8-krotny wzrost poziomu omawianego białka w komórkach linii UM-UC-3 (*Ryc. 33C*) oraz 2-krotny w komórkach linii UM-UC3<sup>GEM</sup> (*Ryc. 33I*). Ostatni z badanych związków, tzn. ITC-Ala-OMe spowodował 1,7-krotny oraz 2,3-krotny wzrost poziomu p21 w komórkach linii UM-UC-3 po zastosowaniu odpowiednio stężenia 5 oraz 15  $\mu\text{M}$ . Natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> zarówno stężenie 1, 5 jak i 15  $\mu\text{M}$  spowodowało odpowiednio 1,8-krotny, 1,7-krotny oraz 1,6-krotny wzrost poziomu p21 (*Ryc. 33F*).

Podsumowując, ITC-GABA-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe spowodowały spadek poziomy  $\alpha$ -tubuliny, lecz nie w komórkach wszystkich linii w jednakowym stopniu. ITC-GABA-OMe oraz ITC- $\beta$ -Ala-OMe największy spadek poziomu  $\alpha$ -tubuliny spowodował w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>, natomiast ITC-Ala-OMe w komórkach linii UM-UC3<sup>GEM</sup>. Warto zaznaczyć, iż ITC-Gly-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe w najwyższym zastosowanym stężeniu spowodowały spadek poziomu  $\beta$ -tubuliny wyłącznie w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>, z czego największy spadek poziomu tego białka spowodował ITC- $\beta$ -Ala-OMe. Natomiast ITC-Gly-OMe, lecz w stężeniach 1 oraz 5  $\mu\text{M}$ , również w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> spowodował wzrost poziomu  $\beta$ -tubuliny. Ponadto 15  $\mu\text{M}$  ITC-GABA-OMe spowodował spadek poziomu  $\beta$ -tubuliny w komórkach linii UM-UC-3. Wszystkie cztery badane ITC spowodowały wzrost poziomu białka p21. ITC-GABA-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe największy wzrost poziomu białka p21 spowodowały w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup>, natomiast ITC-Gly-OMe w komórkach linii UM-UC-3.





**Ryc. 33.** Porównanie poziomu wybranych białek:  $\alpha$ -tubuliny,  $\beta$ -tubuliny oraz p21 w komórkach linii *UM-UC-3*, *UM-UC-3<sup>VBL</sup>* oraz *UM-UC-3<sup>GEM</sup>* po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC. Wyniki (densytometrię) normalizowano do poziomu GAPDH i przedstawiono jako średnią  $\pm$  SD. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc Dunnetta. \*  $p < 0,05$



**Ryc. 34.** Reprezentatywne zdjęcia western blot – analiza poziomu  $\alpha$ -tubuliny,  $\beta$ -tubuliny oraz p21 w lizatach linii komórkowych UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC.

#### **4.5.9 OBRAZY MIKROSKOPOWE KOMÓREK LINII RAKA PECHERZA MOCZOWEGO PO TRAKTOWANIU ITC**

Ostatnim etapem badań mającym na celu uzupełnienie całego cyklu doświadczeń oraz zobrazowanie, iż ITC wpływają na strukturę tubuliny, było wykonanie zdjęć komórek linii: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Ponieważ w analizie western blot zaobserwowano, iż ITC-Gly-OMe nie wpływa istotnie na poziom  $\alpha$ -tubuliny komórek żadnej z trzech linii komórkowych, a każdy z czterech badanych ITC istotnie wpłynął na zmiany w poziomie  $\beta$ -tubuliny w komórkach co najmniej jednej z trzech linii komórkowych zdecydowano o zobrazowaniu tego białka za pomocą specyficznego przeciwciała. Jądra komórkowe zobrazowano za pomocą DAPI. Zdjęcia wykonane po 24h inkubacji komórek z ITC przedstawiono na *rycinach 35 – 38*.

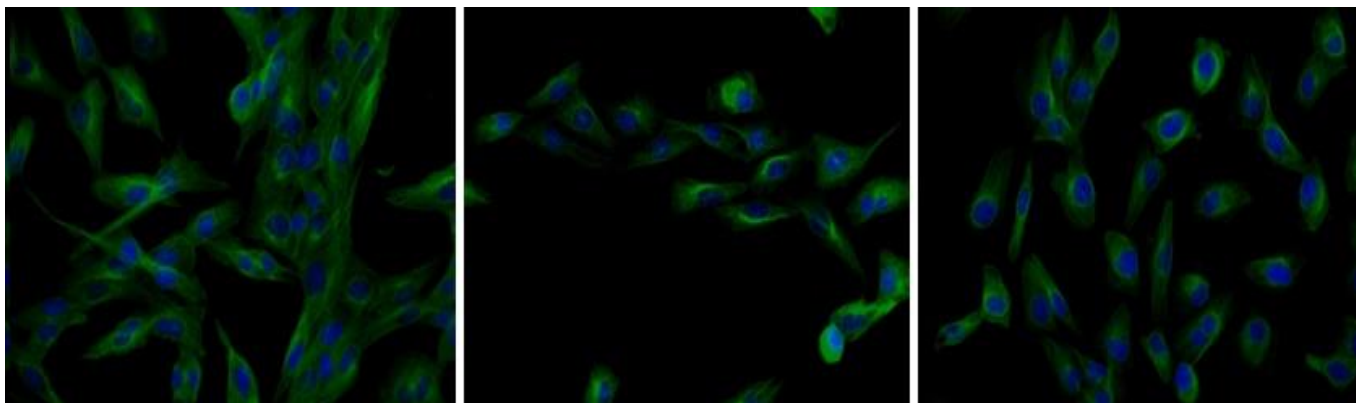
Uzyskane zdjęcia jednoznacznie wskazują, iż ITC w stężeniu 1  $\mu$ M nie powodują znacznych zmian w strukturze  $\beta$ -tubuliny, natomiast stężenia 5 oraz 15  $\mu$ M znacząco wpływają zarówno na strukturę  $\beta$ -tubuliny jak i na jądra komórkowe. ITC spowodowały zarówno zaniki jąder komórkowych jak i powstanie komórek wielojądrzastych. Ponadto widoczny jest nieprawidłowy rozkład tubuliny w komórkach oraz jej znaczna degradacja w przypadku każdej linii komórkowej.

Zaobserwowano, iż ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe w komórkach linii UM-UC-3 powodują nieprawidłowy rozkład tubuliny oraz jej degradację. Ponadto ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe oraz ITC-Ala-OMe spowodowały utworzenie komórek wielojądrzastych, a ITC- $\beta$ -Ala-OMe spowodował zanik jąder w komórkach. W komórkach linii lekoopornych UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> badane izotiocyjaniiny również spowodowały nieprawidłowy rozkład tubuliny, powstanie komórek wielojądrzastych oraz zaniki jąder w komórkach.

U M - U C - 3

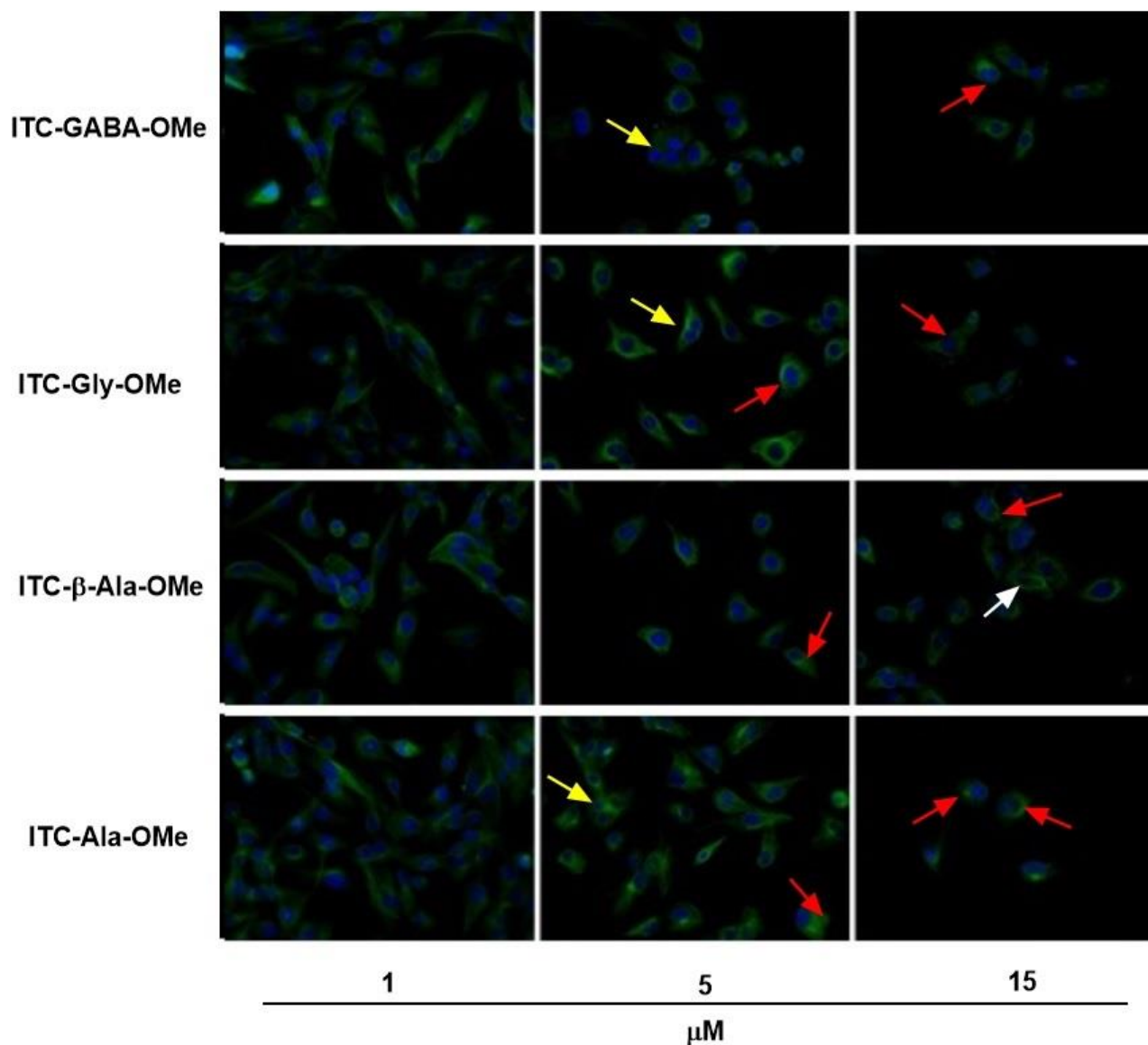
U M - U C - 3<sup>VBL</sup>

U M - U C - 3<sup>GEM</sup>

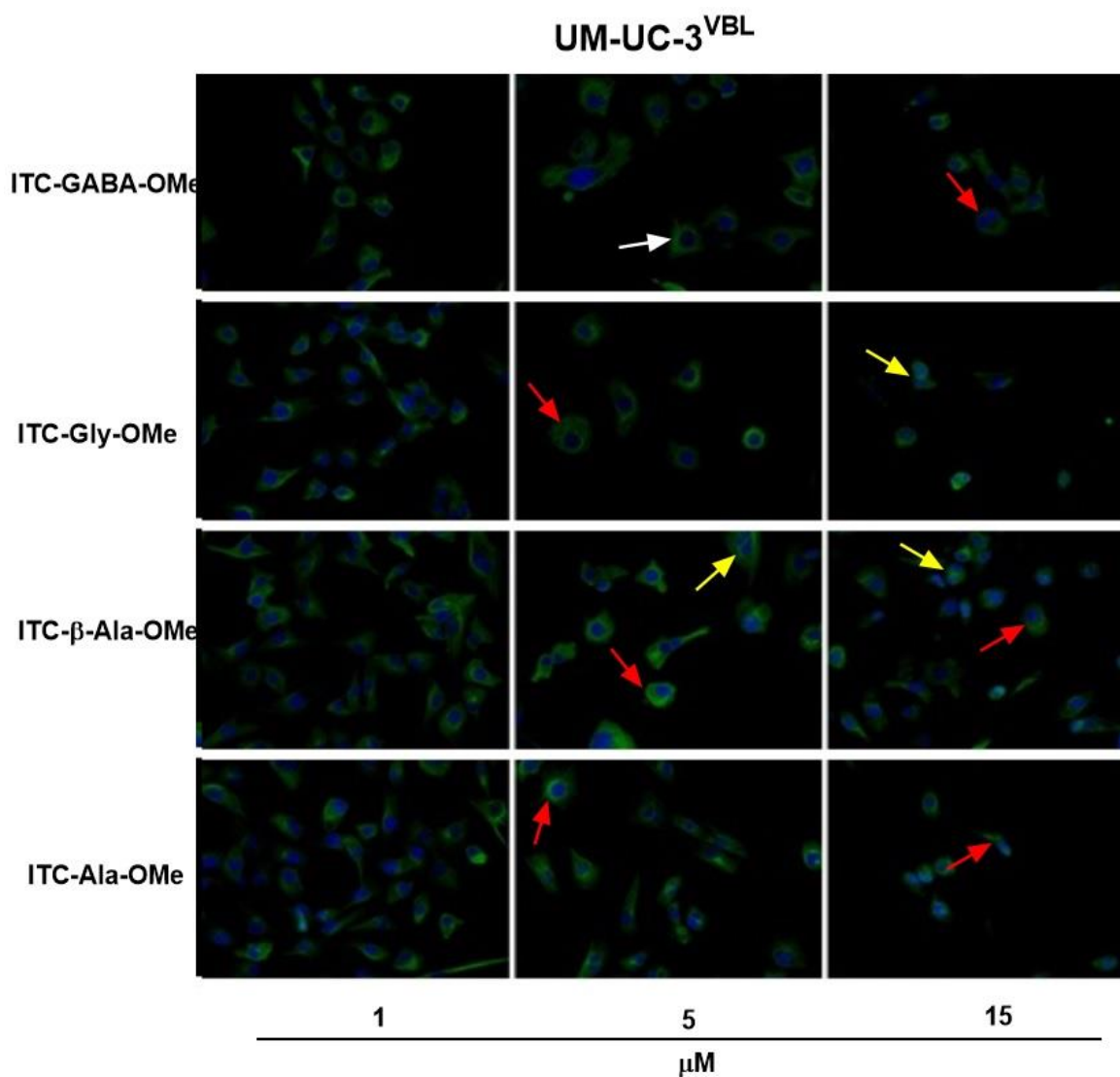


**Ryc. 35.** Reprezentatywne obrazy komórek raka pęcherza moczowego linii komórkowych: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Obrazy uzyskano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.  $\beta$ -tubulinę wybarwiono przy użyciu króliczego monoklonalnego przeciwciała IgG anti- $\beta$ -tubulina (kolor zielony). DAPI zastosowano do barwienia jądra komórkowego – DNA (kolor niebieski). Powiększenie 40x.

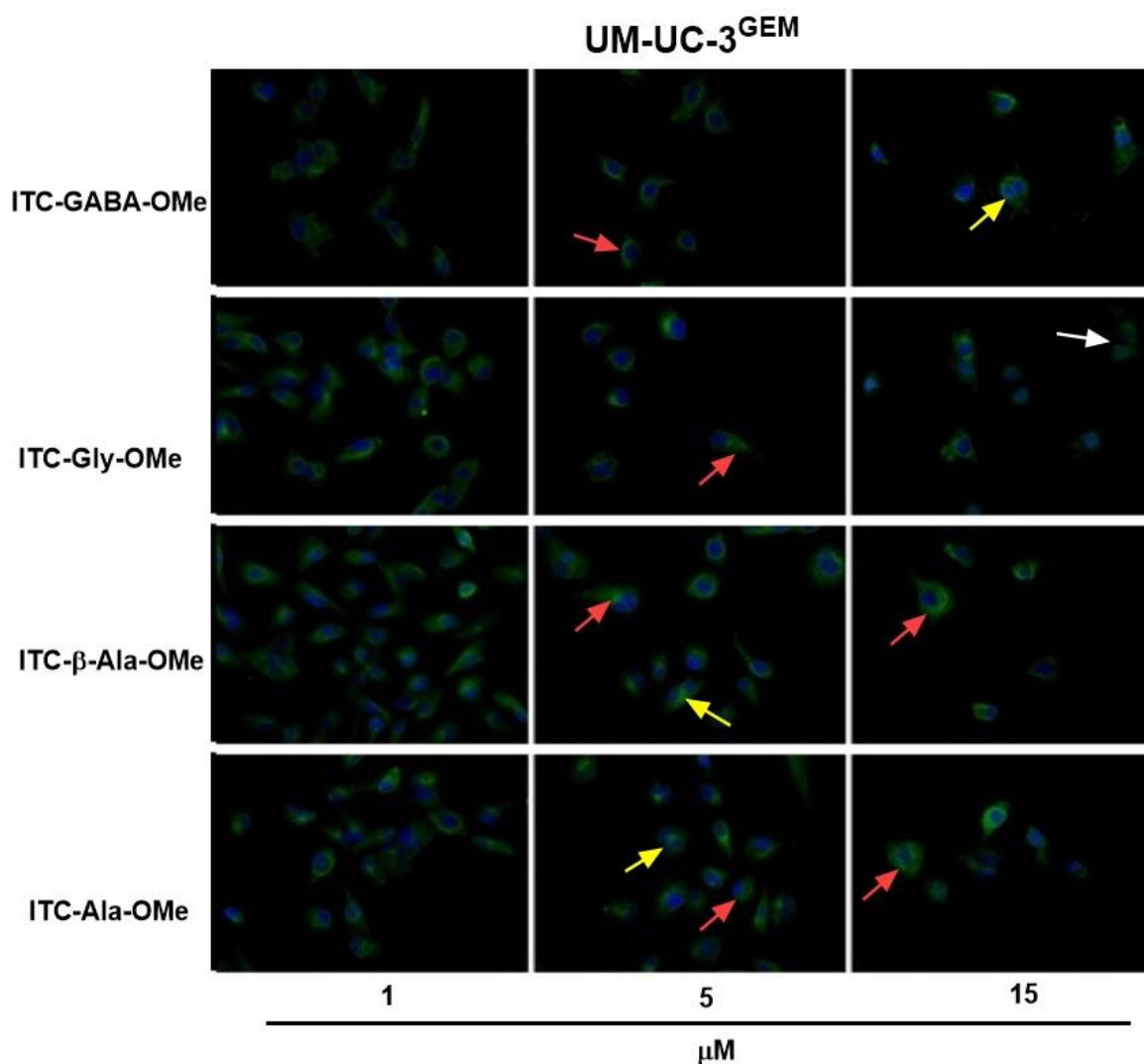
### UM-UC-3



**Ryc. 36.** Reprezentatywne obrazy komórek raka pęcherza moczowego linii komórkowej *UM-UC-3* traktowanej badanymi ITC w trzech stężeniach. Obrazy uzyskano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.  $\beta$ -tubulinę wybarwiono przy użyciu króliczego monoklonalnego IgG anti- $\beta$ -tubulina (kolor zielony). DAPI zastosowano do barwienia jądra komórkowego – DNA (kolor niebieski). Powiększenie 40x. Czerwone strzałki wskazują na komórki z nieprawidłowym rozkładem tubuliny lub jej degradacją; żółte strzałki wskazują na komórki wielojądrowe, a białe na komórki w których doszło do zaniku jądra komórkowego.



**Ryc. 37.** Reprezentatywne obrazy komórek raka pęcherza moczowego linii komórkowej **UM-UC-3<sup>VBL</sup>** traktowanej badanymi **ITC** w trzech stężeniach. Obrazy uzyskano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. **β-tubulinę** wybarwiono przy użyciu króliczego monoklonalnego przeciwciała IgG anty-β-tubulina (kolor zielony). **DAPI** zastosowano do barwienia **jądra komórkowego** – DNA (kolor niebieski). Powiększenie 40x. Czerwone strzałki wskazują na komórki z nieprawidłowym rozkładem tubuliny lub jej degradacją; żółte strzałki wskazują na komórki wielojądrzaste, a białe na komórki w których doszło do zaniku jądra komórkowego.



**Ryc. 38.** Reprezentatywne obrazy komórek raka pęcherza moczowego linii komórkowej **UM-UC-3<sup>GEM</sup>** traktowanej badanymi ITC w trzech stężeniach. Obrazy uzyskano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. **β-tubulinę** wybarwiono przy użyciu króliczego monoklonalnego przeciwciała IgG anti-β-tubulina (kolor zielony). DAPI zastosowano do barwienia **jądra komórkowego** – DNA (kolor niebieski). Powiększenie 40x. Czerwone strzałki wskazują na komórki z nieprawidłowym rozkładem tubuliny lub jej degradacją; żółte strzałki wskazują na komórki wielojądrzaste, a białe na komórki w których doszło do zaniku jądra komórkowego.





---

## 5. Dyskusja Wyników

---

Lekooporność jest dość częstą cechą nowotworów pęcherza moczowego, szczególnie po tym jak terapia pierwszego rzutu oparta głównie na cisplatynie zawodzi. Dlatego też warto poszukiwać nowych związków, które mogłyby się przyczynić do zwalczania lekoopornych nowotworów pęcherza moczowego. Na podstawie przeprowadzonych badań można twierdzić, iż izotiocyjaniiny wydają się być obiecującymi związkami do zastosowania w leczeniu lekoopornych nowotworów pęcherza moczowego. Dysponowanie szerokim panelem dobrze scharakteryzowanych molekularnie komórek lekoopornych linii nowotworowych jest szczególnie ważne w przypadku prac nad nowymi związkami, które mogłyby być potencjalnymi terapeutykami. W związku z tym zdecydowano się na wyprowadzanie czterech nowych linii komórkowych raka pęcherza moczowego opornych na najczęściej stosowane chemioterapeutyki w terapii I rzutu, tj. cisplatynę, gemcytabinę, winblastynę oraz linię oporną łącznie na cisplatynę i gemcytabinę. Następnie przeprowadzono ich charakterystykę molekularną. Ponadto poza komórkami czterech linii wyprowadzonych w ramach niniejszej pracy oraz komórkami ich linii wyjściowej, scharakteryzowano również komórki ośmiu linii lekoopornych oraz dwóch wyjściowych linii komórkowych raka pęcherza moczowego pozyskanych w ramach współpracy z RCCL.

Za lekooporność komórek nowotworowych odpowiedzialnych jest wiele mechanizmów, np. oporność komórek nowotworowych na cisplatynę jest zazwyczaj związana ze wzrostem poziomu metalotionein, cykliny B oraz białka MCL1, ale również ze zwiększonym poziomem glutationu. Nadekspresja genu *ABCBI* oraz białka ABCB1 to cechy charakterystyczne dla komórek opornych na związki wpływające na mikrotubule, np. winblastynę [203, 204]. Natomiast komórki nowotworowe odporne na gemcytabinę zazwyczaj posiadają obniżoną ekspresję genu *hENTI* oraz *dCK* [205]. W związku z powyższym lekooporne linie komórkowe charakteryzowane w ramach niniejszej pracy poddano testom sprawdzającym:

- profil oporności krzyżowej na związki o zróżnicowanym mechanizmie działania
- zmiany w ekspresji genów związanych z fenotypem lekooporności
- poziom białek związanych z lekoopornością
- zmiany w stosunku GSH/GSSG oraz zmiany w ilości glutationu całkowitego.

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono kompleksową charakterystykę molekularną komórek 12 linii lekoopornych raka pęcherza moczowego oraz 3 linii wyjściowych. Według

naszej najlepszej wiedzy jak dotąd powstała tylko jedna praca charakteryzująca komórki lekoopornych linii raka pęcherza moczowego na podobną skalę [206].

Charakterystykę zestawu 3 linii wrażliwych raka pęcherza moczowego: UM-UC-3, RT-112, TCC-SUP oraz 12 linii lekoopornych: UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, UM-UC-3<sup>VBL</sup>, UM-UC-3<sup>GEM</sup>, UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup>, RT-112<sup>CDDP</sup>, RT-112<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>GEM</sup>, RT-112<sup>CDDP/GEM</sup>, TCC-SUP<sup>CDDP</sup>, TCC-SUP<sup>VBL</sup>, TCC-SUP<sup>GEM</sup> oraz TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> rozpoczęto od określenia profilu lekooporności wymienionych powyżej komórek linii nowotworowych za pomocą testów antyproliferacyjnych. W tym celu wykorzystano zestaw 13 związków o charakterze przeciwnowotworowym, o zróżnicowanym mechanizmie działania oraz celach molekularnych (związki oraz ich mechanizm działania zostały opisane w *tabeli 15*).

Dla komórek wyjściowych linii raka pęcherza moczowego nie zaobserwowano istotnych różnic w otrzymanych wartościach IC<sub>50</sub> dla badanych związków, co wskazuje, że profile oporności krzyżowej linii komórkowych są do siebie zbliżone. Natomiast wyniki uzyskane dla komórek linii opornych wskazują, iż profile oporności krzyżowej komórek linii opornych na ten sam cytostatyk, ale wywodzących się z komórek innych linii wyjściowych znacznie się od siebie różnią. Za fakt ten są odpowiedzialne różnice w poziomie ekspresji genów oraz białek odpowiedzialnych za rozwój lekooporności komórek nowotworowych, a także różnice w stężeniu glutationu w komórkach, które zaobserwowano w trakcie badań własnych.

Wśród zestawu 10 genów, których ekspresję analizowano w komórkach linii lekoopornych oraz wyjściowych raka pęcherza moczowego genami związanymi z opornością na cisplatynę były: (1) *ASS1*, którego obniżona ekspresja jest charakterystyczna dla komórek opornych na cisplatynę, (2) *ATP7A*, (3) *MT2A* i (4) *SLC3A1*, których podwyższona ekspresja jest odpowiedzialna za rozwój oporności komórek na cisplatynę oraz obniżona ekspresja (5) *SAT1* [172-176]. Funkcje tych genów przedstawiono szerzej w *tabeli 25* (rozdział 4.2.2). Natomiast wśród 9 białek, których poziom analizowano w komórkach linii opornych oraz wyjściowych charakteryzowanych w trakcie niniejszej pracy odpowiedzialnymi za rozwój oporności na cisplatynę były: MCL1 oraz cyklina B. Dokładne funkcje tych białek przedstawiono w *tabeli 26* (rozdział 4.2.3).

W badaniach własnych zaobserwowano, iż komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup> wykazały podwyższony poziom ekspresji następujących genów: *ATP7A* (**Ryc. 12G**), *MT2A* oraz *SLC3A1* (**Ryc. 13A i G**) w porównaniu do komórek linii wyjściowej UM-UC-3. Komórki linii RT-112<sup>CDDP</sup> posiadały podwyższoną ekspresję *ATP7A*, obniżoną *ASS1* (**Ryc. 12H i D**) oraz podwyższony poziom białka MCL1 (**Ryc. 17B**). Natomiast komórki linii TCC-SUP<sup>CDDP</sup> cechowały się obniżoną ekspresją *SAT1* (**Ryc. 13F**) oraz podwyższonym poziomem cykliny B

(**Ryc. 15I**) w porównaniu do komórek linii TCC-SUP. Wszystkie powyższe otrzymane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, tzn. wzrost lub spadek ekspresji wyżej wymienionych genów oraz wzrost lub spadek poziomu wyżej wymienionych białek są odpowiedzialne za rozwój oporności komórek na cisplatynę. Nadekspresja *ATP7A*, *MT2A* oraz *SLC3A1* obserwowana jest w wielu typach nowotworów i jest związana ze słabą odpowiedzią na chemioterapię opartą na cisplatynie [207]. W komórkach linii, m.in. raka jajnika oraz raka płaskonabłonkowego płuc opornych na cisplatynę zaobserwowano podwyższoną ekspresję *ATP7A* [208, 209]. Natomiast zespół *Schoch i wsp.* wykazał, iż w komórkach linii raka nerki A498 – nastąpił wzrost ekspresji *MT2A* po traktowaniu cisplatyną [210]. W innym badaniu udowodniono, iż komórki linii raka pęcherza moczowego odporne na cisplatynę – T24R, wykazały obniżoną ekspresję *SATI* [176]. Nadekspresja *MCL1* jest odpowiedzialna za rozwój oporności na cisplatynę w wielu typach nowotworów, m.in.: w niedrobnokomórkowym raku płuc [211] oraz w raku pęcherzyka żółciowego [212]. Dane literaturowe potwierdzają, iż wzrost ekspresji cykliny B prowadzi do oporności na cisplatynę komórek linii A549 - niedrobnokomórkowego raka płuc [213].

Komórki linii RT-112<sup>CDDP</sup> poza nadekspresją *MCL1*, wykazały również nadekspresję białka p27 (**Ryc. 17G**). Białko to należy do inhibitorów kinaz cyklozależnych hamujących progresję cyklu komórkowego. p27 oddziałując z Cdk2 oraz cykliną E uniemożliwia wejście komórki w fazę S. Sugeruje się również, iż podwyższony poziom p27 może zapobiegać apoptozie, która jest wywoływana związkami takimi jak np. cisplatyna, co prowadzi do oporności komórek nowotworowych. Wykazano, iż w komórkach linii raka żołądka YCC-3 opornych na cisplatynę występuje wzrost ekspresji białka p27 [214].

Ponadto komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup> wykazały wzrost ilości glutationu całkowitego (**Ryc. 21A i B**). Glutation poprzez koniugację z wieloma chemioterapeutykami chroni białka oraz DNA komórek przed uszkodzeniami wywołanymi działaniem tychże związków [215]. Zmiany w poziomie glutationu w komórkach nowotworowych mają zasadnicze znaczenie dla ich lekooporności. Dane literaturowe wskazują, iż podwyższony poziom glutationu występuje w komórkach wielu linii opornych na działanie związków alkilujących, w tym również w komórkach opornych na cisplatynę, m.in. w komórkach linii drobnokomórkowego raka płuca opornych na cisplatynę - GLC4-CDDP i jest odpowiedzialny za rozwój oporności komórek na cisplatynę [216].

Na podstawie wyników testów antyproliferacyjnych stwierdzono również, iż komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup> są w niewielkim stopniu krzyżowo odporne na gemcytabinę (**Tab. 22 i 24**), co jest związane z podwyższoną ekspresją *ECHDC1* (**Ryc. 12M**). Komórki odporne na

gemcytabinę posiadają podwyższoną ekspresją *ECHDC1*, genu kodującego dekarboksylazę etylomalonylo-CoA 1 - enzymu biorącego udział w biosyntezie kwasów tłuszczowych [174]. Udowodniono, iż w komórkach linii UM-UC-3 oraz HT-1376 opornych na gemcytabinę występuje wzrost ekspresji *ECHDC1*, co jest bezpośrednio związane z rozwinięciem oporności na gemcytabinę [229]. Nie znaleziono jednak potwierdzenia takiej oporności krzyżowej w literaturze. Komórki linii raka pęcherza moczowego odporne na cisplatynę: RT4<sup>r</sup> CDDP<sup>1000</sup> oraz 5637<sup>r</sup> CDDP<sup>1000</sup> testowane przez zespół *Vallo i wsp.* okazały się być odporne na: karboplatynę oraz 5-fluorouracyl – linia RT4<sup>r</sup> CDDP<sup>1000</sup>, a linia 5637<sup>r</sup> CDDP<sup>1000</sup> wykazała oporność na karboplatynę, metotreksat oraz topotekan. Komórki tych linii natomiast nie wykazały oporności na gemcytabinę [206].

Podsumowując uzyskane wyniki badań własnych oraz dane literaturowe, można stwierdzić, iż komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP</sup> rozwinęły oporność na cisplatynę poprzez wzrost ekspresji genów: *ATP7A*, *MT2A* oraz *SLC3A1*, ale także podwyższony poziom glutationu. Dodatkowo komórki tej linii na skutek podwyższonej ekspresji *ECHDC1* wykształciły oporność na gemcytabinę. Podwyższona ekspresja *ATP7A* oraz podwyższony poziom MCL1 są odpowiedzialne za oporność na cisplatynę komórek linii RT-112<sup>CDDP</sup>. Natomiast obniżona ekspresja *SATI* oraz wzrost poziomu cykliny B1 odpowiadają za rozwój oporności na cisplatynę w komórkach TCC-SUP<sup>CDDP</sup>. Na podstawie wyników badań własnych oraz danych literaturowych można stwierdzić, iż komórki każdej z trzech linii opornych na cisplatynę, ale wywodzących się z komórek innych linii wyjściowych rozwinęły lekooporność na drodze innych mechanizmów związanych ze wzrostem lub spadkiem ekspresji genów oraz poziomu białek związanych z opornością na cisplatynę.

*ABCB1* to gen, kodujący białko o tej samej nazwie, o masie 170 kDa. Białko to ma charakter pompy błonowej o wysokiej specyficzności substratowej. ABCB1 jest odpowiedzialne za wypompowywanie różnych związków z komórek, m.in.: taksanów, antracyklin oraz alkaloidów *vinca*, których przedstawicielem jest winblastyna [217, 171]. Linie komórkowe odporne na winblastynę charakteryzowane w trakcie niniejszej pracy tj.: UM-UC-3<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>VBL</sup> oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup> wykazały RI<sup>VBL</sup> odpowiednio na poziomie 6,3; 15,6 oraz 104,8 (**Tab. 22**), co oznacza, iż komórki linii TCC-SUP<sup>VBL</sup> są najbardziej odporne na winblastynę, następnie komórki linii RT-112<sup>VBL</sup>, a najmniejszą oporność wykazały komórki linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>. Jest to niewątpliwie związane ze wzrostem ekspresji *ABCB1* (**Ryc. 12A, B, C**) w tych komórkach oraz wzrostem poziomu białka ABCB1 (**Ryc. 15A, B, C**). Komórki linii TCC-SUP<sup>VBL</sup> wykazały największy wzrost poziomu białka ABCB1, następnie komórki linii RT-112<sup>VBL</sup>. Najmniejszy wzrost poziomu ABCB1 zaobserwowano w komórkach linii

UM-UC-3<sup>VBL</sup>, czego konsekwencją była najniższa oporność na winblastynę spośród trzech badanych linii komórkowych. Zwiększony poziom ABCB1 powoduje obniżenie stężenia leków w komórkach ograniczając w ten sposób ich cytotoksyczność. Wzrost poziomu ABCB1 może również powstawać na skutek ogólnej odpowiedzi komórek na pojawiające się substancje toksyczne, np. cisplatinę czy gemcytabinę, które jednak nie są substratami białka ABCB1 [218-220]. Zjawiska takiego nie obserwowano w przypadku linii opornych na cisplatinę oraz gemcytabinę charakteryzowanych w niniejszej pracy (UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, RT-112<sup>CDDP</sup>, TCC-SUP<sup>CDDP</sup>, UM-UC-3<sup>GEM</sup>, RT-112<sup>GEM</sup> oraz TCC-SUP<sup>GEM</sup>). W komórkach linii TCC-SUP<sup>VBL</sup> poza podwyższonym poziomem białka ABCB1 zaobserwowano również obniżony poziom białka p21 (**Ryc. 17F**). p21 jest inhibitorem kinaz cyklozależnych, regulatorem cyklu komórkowego w fazie G1 oraz G2/M. Obniżenie ekspresji tego białka skutkuje rozwojem wielu nowotworów [221]. Nie znaleziono jednak potwierdzenia w piśmiennictwie naukowym wskazującego na powiązanie obniżenia poziomu białka p21 z opornością na winblastynę. Praca Koster *i wsp.* wskazuje, iż podwyższenie poziomu białka p21 w komórkach linii raka germinального jąder - EC jest związane z rozwojem oporności na cisplatinę [222], czego nie potwierdzają wyniki własne, gdyż komórki linii opornych na cisplatinę: UM-UC-3<sup>CDDP</sup> oraz RT-112<sup>CDDP</sup> nie wykazały istotnych zmian w poziomie p21. Natomiast komórki linii TCC-SUP<sup>CDDP</sup> charakteryzowały się obniżeniem poziomu tego białka. Ponadto w badaniu własnym w komórkach linii RT-112<sup>VBL</sup> zaobserwowano obniżenie poziomu  $\beta$ III tubuliny (**Ryc. 16E**).  $\beta$ III tubulina to białko, które jest uważane za „wskaźnik” mówiący o agresywności nowotworu. Najczęściej wzrost ekspresji tego białka świadczy o złym rokowaniu dla pacjenta. Jednakże w niektórych typach nowotworów obserwuje się obniżenie poziomu  $\beta$ III tubuliny, np. obniżenie poziomu tego białka obserwuje się w komórkach raka jajnika opornych na paklitaksel [223]. Paklitaksel oraz winblastyna są związkami oddziaływującymi na tubulinę wobec czego na podstawie danych literaturowych [223] oraz uzyskanych wyników własnych można przypuszczać, iż obniżenie poziomu  $\beta$ III tubuliny może być związane z rozwijaniem oporności komórek nowotworowych na związki oddziałujące na tubulinę.

Badania Evers'a *i wsp.* wskazują, iż oporność komórek na winblastynę może być także związana ze spadkiem ilości glutationu w komórkach [224]. Jednakże badania własne tego nie potwierdzają, ponieważ komórki żadnej z trzech linii, tzn., UM-UC-3<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>VBL</sup> oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup> nie wykazały spadku ilości glutationu całkowitego.

Dla komórek wszystkich trzech wyprowadzonych linii raka pęcherza moczowego opornych na winblastynę: UM-UC-3<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>VBL</sup> oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup> zaobserwowano

bardzo silną oporność krzyżową, która w wielu przypadkach przewyższała oporność na winblastynę, na związki o charakterze antymitotycznym: kolchicynę, paklitaksel, winfluninę oraz winorelbinę (**Tab. 22, 24**). Szczególnie cecha ta widoczna jest w przypadku linii TCC-SUP<sup>VBL</sup>. Dodatkowo komórki wszystkich linii opornych na winblastynę okazały się być również odporne na doksorubicynę. Dane literaturowe potwierdzają, iż komórki linii opornych na winblastynę cechują się również opornością krzyżową na kolchicynę oraz doksorubicynę [225]. Ponadto komórki linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> wykazały również oporność na gemcytabinę, co jest skutkiem zwiększonej ekspresji genu *ECHDC1* (**Ryc. 12M**).

Podsumowując wyniki badań własnych oraz dane literaturowe można stwierdzić, iż gen *ABCBI* oraz białko kodowane przez ten gen pełnią jedną z istotniejszych ról w rozwoju oporności na winblastynę. Komórki wszystkich trzech linii opornych na winblastynę: UM-UC-3<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>VBL</sup> oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup> wykazały wzrost ekspresji tego genu oraz białka. Ponadto komórki linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>VBL</sup> oraz TCC-SUP<sup>VBL</sup> wykazały oporność krzyżową na związki o charakterze antymitotycznym. Najsilniejsza oporność krzyżowa wystąpiła w komórkach linii TCC-SUP<sup>VBL</sup>. Na podstawie takich wyników można twierdzić, iż im większa nadekspresja *ABCBI* oraz białka ABCBI tym komórki są bardziej odporne na winblastynę oraz inne związki o charakterze antymitotycznym.

Gemcytabina to kolejny związek, na który komórki nowotworowe najczęściej nabierają oporności, w związku z tym, iż jest to często stosowany lek podczas chemioterapii. Komórki odporne na gemcytabinę poza podwyższoną ekspresją *ECHDC1* charakteryzują się także niską ekspresją *dCK*, genu niezbędnego do fosforylacji dezoksyrybonukleozydów oraz ich analogów nukleozydowych [174]. Ponadto komórki, które są odporne na gemcytabinę wykazują obniżoną ekspresję *hENTI* - ludzkiego równowagowego transportera nukleozydów 1, który jest głównym transporterem gemcytabiny w komórkach [226, 227].

Otrzymane wyniki badań własnych, w trakcie których badano ekspresję wyżej wymienionych genów wskazują, iż komórki linii RT-112<sup>GEM</sup> wykazały obniżoną ekspresję *dCK* oraz podwyższoną ekspresję *ECHDC1* (**Ryc. 12K, N**), a komórki linii TCC-SUP<sup>GEM</sup> wykazały wzrost ekspresji *ECHDC1* (**Ryc. 12O**), co jest zgodne z danymi literaturowymi. Dane te wskazują, iż w komórkach linii nowotworowych opornych na gemcytabinę, m.in. w komórkach linii raka trzustki (RPK-1, RPK-9, RPK-59) oraz niedrobnokomórkowego raka płuc (H23/GEM-R, pochodząca z linii NCI-H23) obserwowana jest obniżona ekspresja *dCK* [226, 228]. Ponadto zespół Assai i wsp. udowodnił, iż w komórkach linii raka pęcherza moczowego UM-UC-3 oraz HT-1376 opornych na gemcytabinę występuje wzrost ekspresji *ECHDC1* [229]. W badaniach własnych nie

zaobserwowano wzrostu ekspresji genu *hENTI* w komórkach żadnej z trzech linii, tzn. UM-UC-3<sup>GEM</sup>, RT-112<sup>GEM</sup> oraz TCC-SUP<sup>GEM</sup>, co może wskazywać, iż obniżenie ekspresji tego genu nie jest najistotniejsze w rozwoju oporności na gemcytabinę.

Uzyskane wyniki potwierdzają, iż geny *dCK* oraz *ECHDC1* są zaangażowane w rozwój oporności komórek nowotworowych raka pęcherza moczowego na gemcytabinę. Natomiast w komórkach linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> nie zaobserwowano spadku ekspresji *dCK* lub/oraz wzrostu ekspresji *ECHDC1*, a także *hENTI*. Może to świadczyć o tym, iż komórki linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> wykształciły oporność na gemcytabinę na drodze innego mechanizmu aniżeli zmiany w ekspresji omawianych wyżej wymienionych genów. Wykazano, iż komórki linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> posiadają podwyższony poziom białka Eg5 (**Ryc. 16G**). Jest to białko związane z cyklem komórkowym, uczestniczące w budowaniu wrzeciona kinezy, odgrywa jedną z kluczowych ról podczas tworzenia dwubiegunowych wrzecion oraz rozdzielania zduplikowanych chromosomów we wczesnej fazie mitozy [179]. Jednakże prawdopodobnie zmiana w poziomie Eg5 nie jest bezpośrednio związana z opornością na gemcytabinę gdyż piśmiennictwo naukowe nie wskazuje na związek Eg5 z opornością na ten lek.

Piśmiennictwo wskazuje, iż glutation również bierze udział w rozwoju oporności komórek nowotworowych na gemcytabinę, np. podwyższony poziom GSH zaobserwowano w komórkach opornych na gemcytabinę, linii raka trzustki MiPaCa-2/GR [230]. Natomiast komórki żadnej z trzech linii opornych na gemcytabinę charakteryzowanych w trakcie niniejszej pracy nie wykazały podwyższonej ilości glutationu. Może to znaczyć, iż w przypadku komórek tych linii raka pęcherza opornych na gemcytabinę glutation nie bierze udziału w rozwijaniu lekooporności.

Wyniki przeprowadzonych testów antyproliferacyjnych na komórkach linii opornych na gemcytabinę wykazały bardzo szeroką oporność krzyżową komórek linii TCC-SUP<sup>GEM</sup>. Komórki tej linii rozwinęły niewielką oporność na takie związki jak cisplatyna oraz doksorubicyna, ale silną oporność krzyżową na: kombretastatynę A4, paklitaksel, winblastynę oraz winorelbinę (**Tab. 23, 24**). Tak szeroka oporność krzyżowa nie została stwierdzona ani dla komórek RT-112<sup>GEM</sup> ani dla UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Wobec zaobserwowanej oporności krzyżowej komórek linii TCC-SUP<sup>GEM</sup> na związki oddziałujące na tubulinę komórki te powinny posiadać podwyższoną ekspresję genu *ABCB1* oraz białka ABCB1, jednakże nie zaobserwowano takiej zależności. W związku z tym komórki linii TCC-SUP<sup>GEM</sup> wykształciły oporność krzyżową na: doksorubicynę, kombretastatynę A4, paklitaksel, winblastynę oraz winorelbinę na drodze innego mechanizmu aniżeli wzrost ekspresji *ABCB1* oraz białka ABCB1. Praca Vallo i wsp. potwierdza, iż komórki niektórych linii raka pęcherza moczowego

oporne na gemcytabinę mogą posiadać szeroką oporność na inne związki. W pracy tej wykazano, iż komórki linii raka pęcherza moczowego: RT-112, T24, HT-1376 oraz TCC-SUP rozwinęły oporność krzyżową na 11 spośród 16 testowanych związków przeciwnowotworowych, m.in. winfluninę, metotreksat, mitomycynę C, 5-fluorouracyl oraz doksorubicynę [206]. Ponadto inne prace także wskazują na szeroką oporność krzyżową komórek linii opornych na gemcytabinę, np. komórki linii raka trzustki oporne na gemcytabinę - BxG30 są dodatkowo oporne na 5-fluorouracyl, cisplatynę, irynotekan oraz docetaksel. Natomiast komórki linii AG600 - komórki linii raka jajnika, które posiadają obniżoną ekspresję *dCK* wykazują oporność na 5-fluorouracyl, ZD1694 (raltitreksed) oraz AG337 [231, 232]. Uzyskane wyniki własne oraz dane literaturowe wskazują, iż komórki linii opornych na gemcytabinę potrafią rozwinąć szeroką oporność krzyżową na inne związki przeciwnowotworowe.

Na podstawie uzyskanych wyników badań własnych oraz danych pochodzących z piśmiennictwa można wnioskować, iż geny: *dCK* oraz *ECHDC1* odgrywają istotną rolę w oporności komórek nowotworowych. Należy jednak zaznaczyć, iż geny te nie są jedynymi genami zaangażowanymi w rozwój omawianej lekooporności. Komórki linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> nie wykazały obniżenia ekspresji *dCK* czy wzrostu ekspresji *ECHDC1* oraz *hENTI1*, w związku z czym można wnioskować, iż wykształciły one tą lekooporność na drodze innych mechanizmów. Należy również zaznaczyć, iż komórki linii TCC-SUP<sup>GEM</sup> poza opornością na gemcytabinę wykształciły szeroką oporność krzyżową na: kombretastatynę A4, paklitaksel, winblastynę oraz winorelbinę, jednakże przy tym nie wykazały wzrostu ekspresji *ABCB1*.

Ostatnia grupa komórek lekoopornych charakteryzowanych w trakcie niniejszej pracy to komórki oporne zarówno na cisplatynę jak i gemcytabinę: UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup>, RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> oraz TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup>. Komórki tych linii zgodnie z oczekiwaniami wykazały zmiany w ekspresji genów i/lub białek związanych z opornością na cisplatynę oraz gemcytabinę: (1) komórki linii UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup> wykazały podwyższony poziom *ATP7A* oraz *ECHDC1* (**Ryc. 12G, M**), (2) komórki linii RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> posiadały obniżoną ekspresję *dCK*, *SAT1* oraz *ASS1* (**Ryc. 12K, 13E, 12E**), a także podwyższony poziom cykliny B (**Ryc. 15H**), (3) natomiast komórki linii TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> wykazały wzrost ekspresji *ECHDC1* (**Ryc. 12O**), spadek ekspresji *SAT1* (**Ryc. 13F**) oraz wzrost poziomu cykliny B (**Ryc. 15I**) oraz *MCL1* (**Ryc. 17C**). Ponadto zaobserwowano również, iż komórki linii TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> są krzyżowo oporne na winfluninę, a komórki linii RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> na doksorubicynę. Natomiast nie stwierdzono, aby komórki tych linii wykazały podwyższoną



ekspresję *ABCB1* oraz białka ABCB1, co może wskazywać, iż komórki tych linii rozwinęły oporność na winfluninę oraz dokсорubicynę poprzez inny mechanizm.

Na podstawie uzyskanych wyników badań własnych dotyczących charakterystyki molekularnej komórek linii lekoopornych: UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, RT-112<sup>CDDP</sup>, TCC-SUP<sup>CDDP</sup>, UM-UC-3<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>VBL</sup>, TCC-SUP<sup>VBL</sup>, UM-UC-3<sup>GEM</sup>, RT-112<sup>GEM</sup>, TCC-SUP<sup>GEM</sup>, UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup>, RT-112<sup>CDDP/GEM</sup> oraz TCC-SUP<sup>CDDP/GEM</sup> oraz doniesień literaturowych można stwierdzić, iż komórki mimo tego, że są odporne na ten sam związek wykazują zupełnie odmienny profil lekooporności. Jest to spowodowane różnicami w ekspresji genów oraz różnicami w poziomie białek związanych z opornością na dany lek, a także zmianami w ilości glutationu.

Druga część niniejszej pracy obejmowała syntezę zestawu strukturalnie zróżnicowanych izotiocyanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów oraz zbadanie ich aktywności biologicznej.

Od końca lat 70-tych XX wieku, kiedy Wattenberg udowodnił, iż izotiocyaniany benzylu oraz fenyloetylu mogą hamować karcynogenezę, opublikowano wiele prac potwierdzających zdolności izotiocyanianów do hamowania proliferacji komórek nowotworowych oraz indukowania procesu apoptozy. Ostatnich 40 lat badań nad możliwością wykorzystywania izotiocyanianów w terapii przeciwnowotworowej znacząco poszerzyło nasze zrozumienie mechanizmów zaangażowanych w ich aktywność biologiczną [233-235]. Okazało się, że potencjał izotiocyanianów wynika z jednoczesnego oddziaływania na wiele różnych, często biochemicznie niepowiązanych ze sobą procesów biologicznych i szlaków sygnałowych w komórce. Szybko zaobserwowano jednak wspólny mianownik dla wszystkich tych procesów – kluczową rolę cysteiny, która w większości przypadków okazała się być głównym celem molekularnym izotiocyanianów. Cysteina jest aminokwasem, zawierającym w swojej strukturze siarkę. Odgrywa ona niezwykle istotną rolę w białkach, biorąc udział w tworzeniu mostków disiarczkowych pomiędzy dwoma resztami cysteinowymi. Mają one za zadanie chronić białka, poprzez stabilizowanie struktury trzeciorzędowej. Wpływają także na kowalencyjne wiązanie podjednostek białkowych, dzięki czemu gwarantują prawidłowe fałdowanie białek, czego konsekwencją jest ich prawidłowe funkcjonowanie [236].

Portal *clinicaltrials.gov* (na dzień 5.11.2022 r.) dla zapytania „isothiocyanate” wskazuje, iż aktualnie nie są prowadzone żadne badania kliniczne z udziałem izotiocyanianów. Natomiast do 10 badań są rekrutowani uczestnicy, 35 zostało zakończonych, 3 zostały przerwane, 1 wycofane, a 2 badania posiadają status „unknown”, tzn. że ich status nie był weryfikowany w ciągu ostatnich 2 lat. Daje to łącznie 52 badania kliniczne nad możliwością

zastosowania izotiocyjanianów. Warto zaznaczyć, iż tylko 12 spośród 52 badań klinicznych dotyczyło zastosowania izotiocyjanianów w terapiach onkologicznych.

W roślinach krzyżowych takich jak: kapusta, brukselka czy też jarmuż, będących naturalnym źródłem izotiocyjanianów występuje ponad 120 zróżnicowanych chemicznie glukozynolanów [118]. Jednakże większość badań poświęconych jest głównie czterem izotiocyjanianom: BITC, PEITC, AITC, oraz SFN. Prawdopodobną przyczyną takiego stanu rzeczy, tzn. zainteresowania czterema powyżej wymienionymi izotiocyjanianami jest ich wysoka zawartość w warzywach krzyżowych. Liczne badania nad tymi związkami wpłynęły na dogłębne poznanie mechanizmów działania, które są odpowiedzialne za ich aktywność biologiczną. Dzięki tak licznym badaniom dotyczącym głównie czterech, wymienionych powyżej przedstawicieli izotiocyjanianów wiemy, iż związki te działają w sposób złożony, m.in. posiadają zdolność do hamowania polimeryzacji tubuliny [131] oraz hamowania cyklu komórkowego [129]. Ponadto indukują apoptozę [133-136], autofagię [141-144], ale także hamują enzymy I fazy oraz indukują enzymy II fazy detoksyfikacji [121]. Ponadto posiadają wiele celów molekularnych, m.in. ponad 30 białek, na które mogą bezpośrednio oddziaływać, np.  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina, Cdc25C, cyklina B1 oraz Cdk1 [129]. Z drugiej strony skupienie się wyłącznie na BITC, PEITC, AITC oraz SFN znacznie ograniczyło wiedzę dotyczącą zależności pomiędzy strukturą chemiczną izotiocyjanianów, a ich aktywnością biologiczną. Konsekwencją takiego stanu rzeczy jest utrudniona praca nad syntetycznymi izotiocyjanianami, które posiadałyby większą aktywność biologiczną lub też działałyby w sposób bardziej selektywny i mogły oddziaływać na inne cele molekularne.

Izotiocyjaniany to związki, które akumulują się w moczu oraz tkance pęcherza moczowego. Ma to związek z ich metabolizmem poprzez szlak kwasów merkapturowych, w wyniku którego powstają kwasy merkapturowe izotiocyjanianów kumulujące się w bardzo wysokich stężeniach w moczu oraz tkance pęcherza moczowego co sprawia, iż pęcherz moczowy staje się najlepszym celem dla ich działania. Przeprowadzone badania na liniach komórkowych raka pęcherza moczowego *in vitro* oraz *in vivo* wskazują, iż to właśnie ten typ nowotworów jest najbardziej interesującym celem wszelkich prób leczenia z wykorzystaniem izotiocyjanianów [237]. Kilka opublikowanych badań potwierdza, iż stężenie izotiocyjanianów w tkance pęcherza moczowego kilkukrotnie przewyższa ich stężenie w innych narządach [238, 239]. W związku z tym do „selektywnego” dostarczenia izotiocyjanianów do pęcherza moczowego nie jest potrzebny żaden wyszukany system dostarczania, ponieważ wszystko odbywa się przy pomocy procesów fizjologicznych [237]. W związku z powyższym, w badaniach aktywności biologicznej nowych

izotiocyanianów w niniejszej pracy skupiono się na nowotworach pęcherza moczowego. Do badań wykorzystano komórki linii raka pęcherza moczowego, które były charakteryzowane w trakcie pierwszej części tej pracy.

Podstawowymi założeniami wyboru metody syntezy związków były: dostępność tanich substratów do syntez, efektywność reakcji oraz możliwość uzyskania produktu końcowego o jak najwyższej czystości, bez potrzeby stosowania wymagających czasu oraz kosztów metod ich oczyszczania. W związku z tym, iż celem niniejszej pracy nie było udoskonalanie metod syntezy związków, do syntezy izotiocyanianów zastosowano metodę z użyciem tiofosgeny. Pomimo wysokiej toksyczności, lotności oraz intensywnego zapachu tiofosgen został wybrany ze względu na swój niski koszt, a co najważniejsze ze względu na uniwersalność metody. W oparciu o dużą dostępność substratów do syntez oraz reagentów niezbędnych do jej przeprowadzenia, za najbardziej optymalny punkt wyjścia uznano estry aminokwasów, które następnie można wydajnie przekształcić w izotiocyaniany w jednoetapowym procesie z zastosowaniem tiofosgeny [240]. Co najważniejsze wybór aminokwasów pozwolił na jednoczesną ocenę dwóch ważnych aspektów, tj. wpływu podstawnika na atomie  $\alpha$  oraz wpływu obecności grupy estrowej oraz typu tej grupy na aktywność biologiczną ITC tzn. czy np. obecność dużych grup (jak w Phe) nie generuje zawady sterycznej, która utrudniałaby oddziaływanie ITC z ich celami molekularnymi.

W piśmiennictwie naukowym można znaleźć cztery prace dotyczące syntezy izotiocyanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów [241-244]. Jednakże tylko w jednej z nich zsyntetyzowano 2 izotiocyaniany spośród zestawu 29 będących przedmiotem badań niniejszej pracy, a mianowicie izotiocyaniany estru metylowego alaniny oraz glicyny [243]. Nie znaleziono prac, w których badano aktywność przeciwnowotworową tychże izotiocyanianów.

W ramach niniejszej pracy powstało 29 syntetycznych izotiocyanianów (**Tab. 27**) będących pochodnymi estrów aminokwasów. Związki powstały w ramach dwóch serii badawczych. Pierwsza seria obejmowała 18 związków: estry metylowe, butylowe, etylowe, benzylowe, izopropylowe oraz cykloheksylowe alaniny, fenyloalaniny lub fenyloglicyny. Na podstawie wyników aktywności antyproliferacyjnej *in vitro* tych związków stwierdzono, iż izotiocyaniany będące pochodnymi estrów metylowych są bardziej aktywne od pozostałych. W związku z tym w drugiej serii badawczej zsyntetyzowano 11 izotiocyanianów opartych wyłącznie o estry metylowe. Związki te również poddano testom antyproliferacyjnym *in vitro*, aby następnie wyłonić najbardziej aktywne związki i zbadać mechanizmy odpowiedzialne za

ich aktywność biologiczną oraz spróbować odpowiedzieć na pytanie jak struktura izotiocyanianów wpływa na ich aktywność antyproliferacyjną.

Wyniki jakie uzyskano po przeprowadzeniu testów antyproliferacyjnych *in vitro* mających na celu zbadanie wstępnej oceny aktywności biologicznej zsyntetyzowanych związków wobec komórek 18 linii raka pęcherza moczowego (**Tab. 29 – 32**), w tym również komórek linii lekoopornych pozwoliły wyróżnić grupę związków o największej aktywności. Związkami takimi, okazały się być izotiocyaniany estrów metylowych, czyli względnie najprostsze strukturalnie spośród wszystkich testowanych (**Tab. 33 – 36**). W związku z tym można przypuszczać, iż długość tej grupy znajdującej się w strukturze izotiocyanianów ma wpływ na ich aktywność biologiczną. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych przez *Xiao i wsp.*, w których analizowano wpływ długości łańcucha alkilowego oraz obecność dodatkowej grupy funkcyjnej na aktywność szeregu izotiocyanianów względem komórek raka prostaty linii PC-3. Wykazano w nich m.in., że izotiocyanian butylowy oraz propylowy są odpowiednio 5-krotnie oraz 10-krotnie mniej aktywne w porównaniu do izotiocyanianu benzylu. Uzyskane w tym badaniu wyniki wskazują, iż im krótszy łańcuch alkilowy tym izotiocyaniany są bardziej aktywne. Ponadto w badaniu tym PEITC okazał się być najbardziej aktywnym związkiem, co wskazuje, że obecność drugiej grupy funkcyjnej (w tym przypadku pierścienia fenyłowego) w cząsteczce jest niezbędna dla jej wysokiej aktywności. Nasuwa to jednoznaczny wniosek, że obecność grupy izotiocyanianowej, mimo jej wysokiej reaktywności chemicznej nie gwarantuje znacznej aktywności biologicznej związku [245]. Z drugiej strony istnieją prace, w których wskazuje się, iż różne struktury badanych ITC nie przyczyniły się do powstania różnic w aktywności biologicznej związków. Jednym z takich badań jest analiza aktywności cytotoksycznej szeregu syntetycznych izotiocyanianów o zróżnicowanej strukturze (m.in. izotiocyanian 3-metoksypropylowy, furfuryłowy, 2-(4-morfolino)etyłowy oraz 4-cyjanofenyłowy) przeprowadzonych na linii komórkowej HepG2-C8 przez *Prawan'a i wsp.*. Badanie to bowiem nie wykazało znaczących różnic w aktywności cytotoksycznej wyżej wymienionych związków w porównaniu do sulforafanu, który stanowił kontrolę [246]. Ponadto w innych pracach sugeruje się, iż to grupa izotiocyanianowa odgrywa zasadniczą rolę w aktywności biologicznej izotiocyanianów lecz, tak jak zaznaczono wcześniej, jej obecność nie warunkuje wysokiej aktywności danego izotiocyanianu [247].

Na podstawie powyższych testów antyproliferacyjnych wyselekcjonowano najbardziej aktywne izotiocyaniany (posiadające najniższe  $IC_{50}$  – **Tab. 37**). Okazały się nimi być ITC-Ala-OMe ( $IC_{50} = 4,4 \mu M$  wobec komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>), ITC-GABA-OMe

(IC<sub>50</sub> = 2 μM wobec komórek linii UM-UC-3), ITC-β-Ala-OMe (IC<sub>50</sub> = 3,2 μM wobec komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>) oraz ITC-Gly-OMe (IC<sub>50</sub> = 2,4 μM wobec komórek linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>). W tym miejscu warto zaznaczyć, iż związki wymienione powyżej posiadały niższe IC<sub>50</sub>, aniżeli izotiocyaniany występujące naturalnie tzn. BITC oraz PEITC (**Tab. 29** oraz **37**) wobec komórek linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Najbardziej wrażliwymi na działanie związków: ITC-Ala-OMe, ITC-GABA-OMe, ITC-β-Ala-OMe, ITC-Gly-OMe okazały się być komórki linii: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (**Tab. 37**). Dlatego też wymienione powyżej związki oraz linie komórkowe zostały wybrane do dalszych badań mających na celu zbadanie mechanizmów działania zsyntetyzowanych izotiocyanianów.

Wiele badań wskazuje, iż izotiocyaniany hamują cykl komórkowy w fazie G0/G1 [248, 249], ale również w fazie G2/M [250-252]. Wyniki uzyskane w trakcie badań wskazują, iż cztery spośród pięciu wyselekcjonowanych izotiocyanianów: ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe, ITC-β-Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe hamują cykl komórkowy w fazie G2/M (**Ryc. 26**). ITC-Aib-OMe nie spowodował hamowania cyklu komórkowego w żadnej jego fazie. Ponadto do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M doszło zarówno w komórkach wrażliwej linii komórkowej raka pęcherza moczowego (UM-UC-3) jak i w komórkach linii opornych na winblastynę oraz gemcytabinę (UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>). Związkiem, który doprowadzał do największego zahamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M okazał się być ITC-GABA-OMe w stężeniu 5 μM, czyli względnie najprostszy pod względem struktury spośród testowanych związków.

Naturalnie występujące związki o różnych strukturach chemicznych posiadają zdolność do hamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M m.in. na skutek oddziaływań na tubulinę. Oddziaływania te prowadzą głównie do hamowania szybkości polimeryzacji tubuliny, ale również do obniżenia poziomu spolimeryzowania tubuliny, czego konsekwencją jest zaburzenie funkcjonalności wrzeciona podziałowego, błędy podczas mitozy, a ostatecznie śmierć komórki na skutek katastrofy mitotycznej – typu apoptozy, zachodzącej jako skutek zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2. Związki o powyższych właściwościach są określane mianem modulatorów polimeryzacji tubuliny. Najpopularniejszymi związkami o charakterze modulatorów polimeryzacji tubuliny są alkaloidy *vinca*, kolchicyny oraz taksany [253].

Uzyskane wyniki własne potwierdzają, że wyselekcjonowana grupa pięciu izotiocyanianów hamuje zarówno szybkość polimeryzacji tubuliny jak i obniża poziom spolimeryzowania tubuliny (**Ryc. 30, 31, Tab. 38**). Szybkość oraz poziom spolimeryzowania

tubuliny są silnie uzależnione od stężenia związków. Związkami, które najsilniej hamowały polimeryzację tubuliny były: ITC-Gly-OMe oraz ITC-Ala-OMe czyli związki o najprostszych i najkrótszych strukturach. Związki te hamowały polimeryzację oczyszczonej tubuliny w systemie *in vitro* odpowiednio o 75,4% oraz 52,7%. Ponadto szybkość polimeryzacji tubuliny spadła do 117,2 RFU/min po zastosowaniu 25  $\mu$ M ITC-Gly-OMe oraz 221,8 RFU/min po zastosowaniu 25  $\mu$ M ITC-Ala-OMe podczas gdy szybkość polimeryzacji tubuliny dla 25  $\mu$ M BITC, wyniosła 468,4 RFU/min. Podobnie jak w przypadku analizy aktywności antyproliferacyjnej zsyntetyzowanych izotiocyanianów, gdzie najbardziej aktywnymi związkami okazały się być izotiocyaniany o najprostszej strukturze będące pochodnymi estrów metylowych, najlepszymi inhibitorami polimeryzacji tubuliny również okazały się być izotiocyaniany będące pochodnymi estrów metylowych. Badania *Mi i wsp.* potwierdzają, iż izotiocyaniany są zdolne do hamowania polimeryzacji tubuliny. Wykazano, że zarówno BITC, PEITC jak i SFN hamują polimeryzację tubuliny, a najlepszym inhibitorem polimeryzacji tubuliny okazał się BITC, następnie PEITC. Najslabiej polimeryzację tubuliny hamował SFN. Stopień hamowania polimeryzacji tubuliny był uzależniony od stężenia zastosowanych izotiocyanianów [254], co potwierdziły również badania wykonane w ramach niniejszej pracy. Badania *Jackson i wsp.*, również potwierdzają zdolność izotiocyanianów do hamowania polimeryzacji tubuliny. Stwierdzono, iż *D,L*-, *D-L*-sulforafan, a także sulforafen oraz erucyna, hamują szybkość polimeryzacji tubuliny oraz jej całkowitą polimeryzację. Z drugiej jednak strony zastosowanie nitrylu sulforafanu, który nie zawiera ugrupowania izotiocyanianowego, nie powodowało hamowania polimeryzacji tubuliny tak jak w przypadku sulforafanu. Oznacza to, iż to grupa izotiocyanianowa jest odpowiedzialna za zdolność izotiocyanianów do hamowania polimeryzacji tubuliny [253]. Oddziaływanie badanych izotiocyanianów na tubulinę w komórkach linii wrażliwej - UM-UC-3, oraz w komórkach linii opornych na winblastynę UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz opornych na gemcytabinę UM-UC-3<sup>GEM</sup> potwierdzono również zdjęciami obrazującymi  $\beta$ -tubulinę przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego (**Ryc. 36 – 38**). Na uzyskanych zdjęciach wyraźnie widać, iż wraz ze wzrostem stężenia izotiocyanianów dochodzi do coraz większych zmian w strukturze – degradacji  $\beta$ -tubuliny. Zdjęcia mikroskopowe wykonane przez *Mi i wsp.* wykazują, iż izotiocyaniany takie jak: BITC, PEITC czy SFN również prowadzą do degradacji tubuliny w komórkach linii A549 oraz HeLa [254, 255].

Niektóre z prac, w których badano wpływ izotiocyanianów na procesy komórkowe wskazują, iż hamowanie cyklu komórkowego może być związane z oddziaływaniem izotiocyanianów na omawianą powyżej polimeryzację tubuliny [253, 256, 257]. Wyniki

uzyskane w trakcie badań do niniejszej pracy wskazują, iż zsyntetyzowane izotiocyaniany hamują cykl komórkowy w fazie G2/M zarówno w komórkach linii wrażliwej raka pęcherza moczowego – UM-UC-3 jak i w komórkach linii opornych na winblastynę – UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz gemcytabinę – UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Wśród związków, które doprowadzały do największego zahamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M znalazły się: ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe oraz ITC-Ala-OMe, czyli względnie najprostsze pod względem struktury spośród testowanych związków. Zarówno ITC-Gly-OMe jak i ITC-Ala-OMe w stężeniu 25  $\mu$ M doprowadzały do największego hamowania polimeryzacji tubuliny oraz największego spadku szybkości jej polimeryzacji. Może to dowodzić, iż hamowanie polimeryzacji tubuliny jest istotnym mechanizmem hamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Na podobną zależność wskazują również wyniki *Azarenko i wsp.* W badaniach tych wykorzystano erucynę (tj. izotiocyanian 4-metylotiobutyłu) jako przedstawiciela izotiocyanianów. Wykazano, iż erucyna spowalnia polimeryzację tubuliny, jak również jej całkowitą polimeryzację, w skutek czego dochodzi do hamowania cyklu komórkowego komórek linii raka piersi MCF-7 w fazie G2/M. [256]. Badania *Jackson i wsp.* również potwierdzają, iż izotiocyaniany mogą hamować polimeryzację tubuliny w systemie *in vitro* (jednakże w stężeniach 100-300  $\mu$ M), czego konsekwencją jest hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M komórek linii F3II (mysi rak sutka) [257]. Zarówno w przypadku badań przeprowadzonych przez *Azarenko i wsp.* jak i *Jackson i wsp.* do przeprowadzenia testów sprawdzających hamowanie polimeryzacji tubuliny pod wpływem izotiocyanianów stosowano stężenia izotiocyanianów w zakresie 100-300  $\mu$ M, podczas gdy w badaniach własnych najwyższym zastosowanym stężeniem ITC było 25  $\mu$ M. Może to wskazywać, iż izotiocyaniany badane w niniejszej pracy są lepszymi inhibitorami polimeryzacji tubuliny, aniżeli izotiocyaniany pochodzenia naturalnego, np. BITC stanowiący kontrolę w badaniu własnym, a co za tym idzie mogą one mieć większy potencjał do zastosowania w terapii przeciwnowotworowej. Warto również zaznaczyć, że istnieje wiele prac potwierdzających, iż izotiocyaniany mogą hamować cykl komórkowy linii komórkowych raka pęcherza moczowego w fazie G2/M. Jednakże prace te opierają się o głównie o naturalne izotiocyaniany takie jak: BITC, PEITC, AITC czy SFN oraz nie wskazują, iż do hamowania cyklu komórkowego może przyczyniać się wpływ ITC na hamowanie polimeryzacji tubuliny [258-260]. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania są więc pierwszymi, które jednoznacznie wiążą zdolność izotiocyanianów do hamowania polimeryzacji tubuliny z hamowaniem cyklu komórkowego w komórkach linii nowotworów pęcherza moczowego.

Uzyskane wyniki własne dotyczące hamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz polimeryzacji tubuliny pod wpływem badanych izotiocyanianów były motywacją do dalszych badań, mających na celu sprawdzenie czy związki te przyczyniają się również do zmian w ekspresji  $\alpha$ -tubuliny i  $\beta$ -tubuliny, a także białka p21 w komórkach linii raka pęcherza moczowego wrażliwych – UM-UC-3 oraz lekoopornych: UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (**Ryc. 33**). Białko p21 jest regulatorem cyklu komórkowego, a wzrost jego poziomu w komórce prowadzi do hamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M [261]. Uzyskane wyniki wskazują, iż ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe oraz ITC-Ala-OMe to związki, które najsilniej wpływają na zmiany w ekspresji wymienionych powyżej białek. Zarówno w komórkach linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> jak i UM-UC-3<sup>GEM</sup> obserwowany jest wzrost poziomu białka p21 wraz ze zwiększającym się stężeniem zastosowanego izotiocyanianu, co bezpośrednio koreluje ze zdolnością tych związków do hamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Ponadto, związki te w stężeniu 15  $\mu$ M obniżają poziom  $\alpha$ -tubuliny oraz  $\beta$ -tubuliny. Mniejsza ilość  $\beta$ -tubuliny w komórkach obserwowana była również na zdjęciach mikroskopowych (**Ryc. 35 – 38**). Wyniki te potwierdzają badania *Yin i wsp.*, w których dowiedziono, iż PEITC prowadzi do obniżenia poziomu  $\alpha$ -tubuliny i  $\beta$ -tubuliny, czego konsekwencją jest hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M komórek linii raka prostaty [262]. Ponadto na zdolność izotiocyanianów do obniżania poziomu zarówno  $\alpha$ -tubuliny jak i  $\beta$ -tubuliny wskazują badania, w których wykazano, iż BITC, PEITC oraz SFN obniżają poziom tych białek w komórkach linii A549 oraz HeLa [255].

Po przeanalizowaniu poziomu  $\alpha$ -tubuliny oraz  $\beta$ -tubuliny w komórkach linii raka pęcherza moczowego po traktowaniu ich badanymi izotiocyanianami podjęto się zbadania ekspresji genów kodujących powyższe białka – *TUBA8* oraz *TUBB6* w tychże komórkach po ich uprzednim traktowaniu izotiocyanianami (**Ryc. 32**). Ekspresja *TUBA8* oraz *TUBB6* wzrastała wraz ze wzrostem stężenia zastosowanego izotiocyanianu. Zależność tę obserwowano dla wszystkich badanych izotiocyanianów, w komórkach wszystkich trzech linii raka pęcherza moczowego. Podobnie jak w pozostałych testach tutaj również wyróżniały się: ITC-GABA-OMe oraz ITC-Gly-OMe, które prowadziły do największego wzrostu ekspresji badanych genów. Niestety wyniku tego nie można skonfrontować z danymi literaturowymi. Jak dotąd nie zbadano wpływu izotiocyanianów (ani naturalnych, ani syntetycznych) na zmiany w ekspresji genów kodujących  $\alpha$ -tubulinę i  $\beta$ -tubulinę. Wyniki badań, które do tej pory opublikowano ograniczały się jedynie do przeanalizowania zmian w ekspresji  $\alpha$ -tubuliny i  $\beta$ -tubuliny na poziomie białka [255, 262]. W literaturze jedyne badania dotyczące zmiany ekspresji tubuliny w komórkach są związane z „teorią autoregulacji”,



tzn. gdy dochodzi do zapadania się mikrotubul, obecność bardzo dużej ilości monomerów tubuliny selektywnie destabilizuje mRNA tubuliny, a następnie zostaje zmniejszona synteza białka tubuliny [263-265]. Podczas badań własnych zauważono jednak, iż izotiocyaniany powodują wytrącanie tubuliny. Komórki reagują wówczas nadekspresją mRNA tubuliny, jednak jest to nieskuteczne, ponieważ monomery tubulin prawdopodobnie kierują mRNA do degradacji w wyniku czego obniżany jest poziom tubulin (białek) w komórkach.

Dalsze badania mechanizmów działania zsyntetyzowanych izotiocyanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów poddano ocenie pod względem możliwości indukowania apoptozy. Przeanalizowano wpływ badanych izotiocyanianów na aktywność kaspazy 3/7 w komórkach linii raka pęcherza moczowego: wrażliwych – UM-UC-3 oraz opornych na winblastynę UM-UC-3<sup>VBL</sup>, a także gemcytabinę UM-UC-3<sup>GEM</sup>. ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe, ITC-β-Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe spowodowały wzrost aktywności kaspazy 3 w komórkach wszystkich trzech linii (**Ryc. 23**). Związkiem powodującym największy wzrost aktywności kaspazy 3/7 był ITC-Gly-OMe wobec komórek linii UM-UC-3 oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Natomiast ITC-β-Ala-OMe spowodował największy wzrost aktywności kaspazy 3/7 spowodował w komórkach linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>. Wiele badań potwierdza, że izotiocyaniany takie jak SFN czy PEITC są zdolne do zwiększania aktywności enzymatycznej kaspazy 3 w komórkach różnych linii, m.in. raka szyjki macicy HeLa oraz wątroby HepG2 [246, 266]. Lecz co najważniejsze, badania *Abbaoui i wsp.* potwierdzają, iż izotiocyaniany są zdolne do zwiększania aktywności kaspazy 3 w komórkach raka pęcherza moczowego. W pracy tej wykazano, że sulforafan oraz erucyna powodują wzrost aktywności kaspazy 3 w komórkach linii raka pęcherza moczowego RT4 [267].

Fakt zachodzenia apoptozy pod wpływem działania zsyntetyzowanych izotiocyanianów w komórkach linii UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> potwierdzono również za pomocą testu z użyciem aneksyny V. Wyniki tego testu pokazały, iż badane izotiocyaniany doprowadziły do zmniejszenia odsetka komórek żywych oraz zwiększania odsetka komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych wszystkich trzech linii komórkowych: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (**Ryc. 24**). Związkami, które doprowadzały do największego wzrostu odsetka komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych były: ITC-Gly-OMe, ITC-β-Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe. Uzyskane wyniki, tzn. zwiększanie odsetka komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych pod wpływem działania izotiocyanianów potwierdza również badania *Hwang i wsp.*, w których wykazano wzrost odsetka komórek apoptotycznych pod wpływem działania PEITC [268].

Izotiocyanianami, które okazały się być najsilniejszymi induktorami aktywności kaspazy 3 oraz doprowadzały do największego wzrostu odsetka komórek apoptotycznych były: ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe oraz ITC- $\beta$ -Ala-OMe. Związki te doprowadzały także do najsilniejszego hamowania polimeryzacji tubuliny oraz cyklu komórkowego w fazie G2/M, a także obniżania poziomu  $\alpha$ -tubuliny i  $\beta$ -tubuliny.

Podsumowując wyniki własne oraz dane literaturowe można więc przypuszczać, iż badane izotiocyaniany hamują szybkość polimeryzacji tubuliny oraz obniżają poziom spolimeryzowania tubuliny, czego konsekwencją jest zaburzenie działania wrzeciona podziałowego, błędy podczas podziału mitotycznego, a ostatecznie śmierć komórki na skutek katastrofy mitotycznej – apoptozy, która zachodzi jako skutek zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2 cyklu komórkowego [253]. Ponadto wpływ na hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M ma również zaobserwowany podwyższony poziom białka p21 oraz obniżenie poziomu  $\alpha$ -tubuliny i  $\beta$ -tubuliny w komórkach pod wpływem działania badanych izotiocyanianów.

Ważnym aspektem aktywności biologicznej izotiocyanianów jest również ich zdolność do obniżania potencjału klonogenego komórek nowotworowych, co jest bezpośrednio związane ze zdolnością komórek do przerzutowania do odległych narządów. Dane literaturowe wskazują na zdolność izotiocyanianów do obniżania potencjału klonogenego komórek nowotworowych różnych linii. Izotiocyaniany pochodzenia naturalnego takie jak: SFN, BITC oraz AITC hamują potencjał klonogeny komórek linii raka gruczołu sutkowego: SKBR-3, MDA-MB-231, trzustki: PANC-1, MIAPaCa-2, oraz pęcherza moczowego: RT-4 oraz T24 [269-271]. Wyniki uzyskane w badaniach własnych również potwierdzają zdolność izotiocyanianów do obniżania potencjału klonogenego komórek raka pęcherza moczowego wrażliwych – UM-UC-3 oraz lekoopornych: UM-UC-3<sup>VBL</sup> oraz UM-UC-3<sup>GEM</sup> (**Ryc. 28**). Izotiocyaniany, które doprowadziły do drastycznego spadku potencjału klonogenego to: ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe, ITC- $\beta$ -Ala-OMe oraz ITC-Ala-OMe. Ponownie związki o najprostszej strukturze okazały się być najbardziej aktywne. Związki te posiadały również najniższe IC<sub>50</sub> w teście antyproliferacyjnym (**Tab. 37**).

Model opisany przez Thornalley'a [272] wskazuje, że izotiocyaniany przedostają się do komórek na drodze dyfuzji pasywnej, a następnie, w sposób nieenzymatyczny lub też przy udziale S-transferazy glutationowej (GST), koniugują z glutationem – ich pierwszym wewnątrzkomórkowym celem [273]. Wskazuje się, iż koniugacja izotiocyanianów z glutationem jest odpowiedzialna za ich szybką akumulację. Już po 0,5-3h ekspozycji, stężenie wewnątrzkomórkowe izotiocyanianów może być od 100 do 200× wyższe

aniżeli ich stężenie zewnątrzkomórkowe. Jednocześnie towarzyszy temu bardzo duży spadek wewnątrzkomórkowej puli glutationu [274]. Metabolity izotiocyjanianów z glutationem są usuwane na zewnątrz komórki gdzie dochodzi do ich hydrolizy, a uwolnione dzięki temu izotiocyjaniany z powrotem mogą wrócić do komórki [275, 276]. Zjawisko takie można nazwać pompą izotiocyjanianową.

Związkami, które powodowały największy spadek stosunku GSH/GSSG były ITC- GABA-OMe oraz ITC-Gly-OMe zarówno w komórkach linii wrażliwej UM-UC-3, jak i lekoopornych UM-UC-3<sup>VBL</sup> jak i UM-UC-3<sup>GEM</sup> (**Ryc. 29**). Oznacza to, że pula glutationu zredukowanego zanikała szybciej aniżeli pula glutationu utlenionego w komórkach. Wyniki takie znajdują potwierdzenie w doniesieniach literaturowych, które wskazują na zdolność izotiocyjanianów do obniżania puli glutationu w komórkach nowotworowych [275, 276]. Spadek ilości glutationu w komórkach, uzyskany w trakcie badań własnych może świadczyć o znaczącej akumulacji izotiocyjanianów w komórkach raka pęcherza moczowego, również tych opornych na leki przeciwnowotworowe. Wymienione powyżej izotiocyjaniany powodowały również największy spadek polimeryzacji tubuliny, hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, wzrost aktywności kaspazy 3 oraz obniżenie potencjału klonogenności komórek nowotworowych pęcherza moczowego wrażliwych oraz lekoopornych.

Obecnie badania nad aktywnością przeciwnowotworową izotiocyjanianów są mocno rozwijane. Dzięki wynikom otrzymanym w ramach niniejszej pracy doktorskiej otrzymaliśmy informacje na temat aktywności syntetycznych izotiocyjanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów. Wykazano, iż zsyntetyzowane w trakcie niniejszej pracy izotiocyjaniany hamują szybkość polimeryzacji tubuliny oraz obniżają poziom spolimeryzowania tubuliny, czego konsekwencją jest zaburzenie działania wrzeciona podziałowego, następnie błędy podczas podziału mitotycznego, a ostatecznie śmierć komórki na skutek katastrofy mitotycznej - apoptozy, która jest skutkiem zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2 cyklu komórkowego. Ponadto uzyskane wyniki wskazują, iż wpływ na hamowanie cyklu komórkowego fazy G2/M ma również zaobserwowany podwyższony poziom białka p21 oraz obniżenie poziomu  $\alpha$ -tubuliny i  $\beta$ -tubuliny w komórkach pod wpływem działania badanych izotiocyjanianów. Badane izotiocyjaniany obniżają także potencjał klonogenności komórek raka pęcherza moczowego oraz pulę dostępnego w komórkach glutationu. Ponadto wykazano, że badane izotiocyjaniany posiadają większą aktywność biologiczną im prostszą posiadają strukturę.



---

## 6. WNIOSKI

---

1. Na podstawie dokonanej charakterystyki molekularnej komórek linii lekoopornych raka pęcherza moczowego wykazano, iż komórki raka pęcherza moczowego mimo tego, że są odporne na ten sam związek ale wywodzą się z innych linii wyjściowych rozwinęły lekooporność na drodze innych mechanizmów związanych ze zmianami w ekspresji genów oraz białek charakterystycznych dla oporności na dany związek, a także zmianami w ilości glutationu. Ponadto zmiany w ekspresji genów oraz białek skutkowały zupełnie odmiennymi profilami oporności krzyżowej charakteryzowanych komórek raka pęcherza moczowego.
2. Zsyntetyzowane izotiocyjaniany będące pochodnymi estrów metylowych okazały się być najbardziej aktywne. Natomiast w miarę wydłużania łańcucha alifatycznego grupy estrowej izotiocyjanianów ich aktywność coraz bardziej malała. Można więc stwierdzić, iż długość tegoż łańcucha ma wpływ na ich aktywność biologiczną.
3. Badane podczas niniejszej pracy doktorskiej izotiocyjaniany hamują szybkość polimeryzacji tubuliny oraz obniżają poziom spolimeryzowania tubuliny, czego konsekwencją jest zaburzenie działania wrzeciona podziałowego, następnie błędy podczas podziału mitotycznego, a ostatecznie śmierć komórki na skutek katastrofy mitotycznej - apoptozy, która jest skutkiem zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2 cyklu komórkowego.
4. Ponadto uzyskane wyniki wskazują, iż wpływ na hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M ma również zaobserwowany podwyższony poziom białka p21 oraz obniżenie poziomu  $\alpha$ -tubuliny i  $\beta$ -tubuliny w komórkach pod wpływem działania badanych izotiocyjanianów. Badane izotiocyjaniany obniżają także potencjał klonogeny komórek raka pęcherza moczowego oraz pulę dostępnego w komórkach glutationu.



---

## 7. PIŚMIENICTWO

---

- [1] A. Richters, K. K. H. Aben, i L. A. L. M. Kiemeny, „The global burden of urinary bladder cancer: an update”, *World J. Urol.*, t. 38, nr 8, s. 1895–1904, sie. 2020, doi: 10.1007/s00345-019-02984-4.
- [2] N. Mahdaviifar, M. Ghoncheh, R. Pakzad, Z. Momenimovahed, i H. Salehiniya, „Epidemiology, Incidence and Mortality of Bladder Cancer and their Relationship with the Development Index in the World”, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, t. 17, nr 1, s. 381–386, luty 2016, doi: 10.7314/APJCP.2016.17.1.381.
- [3] H. Sung *i in.*, „Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA. Cancer J. Clin.*, t. 71, nr 3, s. 209–249, maj 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [4] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, i A. Jemal, „Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”, *CA. Cancer J. Clin.*, t. 68, nr 6, s. 394–424, lis. 2018, doi: 10.3322/caac.21492
- [5] A. K. Greiman, J. S. Rosoff, i S. M. Prasad, „Association of Human Development Index with global bladder, kidney, prostate and testis cancer incidence and mortality”, *BJU Int.*, t. 120, nr 6, s. 799–807, grudz. 2017, doi: 10.1111/bju.13875.
- [6] M. G. K. Cumberbatch, i A. P. Noon, on behalf of the EAU Young Academic Urologists—Urothelial Cancer Working party, „Epidemiology, aetiology and screening of bladder cancer”, *Transl. Androl. Urol.*, t. 8, nr 1, s. 5–11, mar. 2019, doi: 10.21037/tau.2018.09.11.
- [7] K. Saginala, A. Barsouk, J. S. Aluru, P. Rawla, S. A. Padala, i A. Barsouk, „Epidemiology of Bladder Cancer”, *Med. Sci.*, t. 8, nr 1, s. 15, mar. 2020, doi: 10.3390/medsci8010015.
- [8] J. Y.-C. Teoh *i in.*, „Global Trends of Bladder Cancer Incidence and Mortality, and Their Associations with Tobacco Use and Gross Domestic Product Per Capita”, *Eur. Urol.*, t. 78, nr 6, s. 893–906, grudz. 2020, doi: 10.1016/j.eururo.2020.09.006.
- [9] S. Antoni, J. Ferlay, I. Soerjomataram, A. Znaor, A. Jemal, i F. Bray, „Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends”, *Eur. Urol.*, t. 71, nr 1, s. 96–108, sty. 2017, doi: 10.1016/j.eururo.2016.06.010.
- [10] M. G. K. Cumberbatch *i in.*, „Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018”, *Eur. Urol.*, t. 74, nr 6, s. 784–795, grudz. 2018, doi: 10.1016/j.eururo.2018.09.001.
- [11] U. Religion, „Cancer incidence and mortality in Poland”, *Clin. Epidemiol. Glob. Health*, t. 8, nr 2, s. 329–334, cze. 2020, doi: 10.1016/j.cegh.2019.12.014.
- [12] <https://gco.iarc.fr/> [data dostępu: 17.03.2022]
- [13] S. Poletajew *i in.*, „Stage of bladder cancer in Central Europe – Polish perspective”, *Neoplasma*, t. 63, nr 04, s. 642–647, 2016, doi: 10.4149/neo\_2016\_420.
- [14] S. Janković i V. Radosavljević, „Risk Factors for Bladder Cancer”, *Tumori J.*, t. 93, nr 1, s. 4–12, sty. 2007, doi: 10.1177/030089160709300102.
- [15] D. T. Silverman, S. Koutros, J. D. Figueroa, L. Prokunina-Olsson, i N. Rothman, *Bladder Cancer*, t. 1. Oxford University Press, 2017. doi: 10.1093/oso/9780190238667.003.0052
- [16] S. M. Olfert, S. A. Felknor, i G. L. Delclos, „An Updated Review of the Literature: Risk Factors for Bladder Cancer with Focus on Occupational Exposures”, *South. Med. J.*, t. 99, nr 11, s. 1256–1263, lis. 2006, doi: 10.1097/01.smj.0000247266.10393.72.

- [17] K. B. Farling, „Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management”, *Nurse Pract.*, t. 42, nr 3, s. 26–33, mar. 2017, doi: 10.1097/01.NPR.0000512251.61454.5c.
- [18] S. Letašiová *i in.*, „Bladder cancer, a review of the environmental risk factors”, *Environ. Health*, t. 11, nr Suppl 1, s. S11, 2012, doi: 10.1186/1476-069X-11-S1-S11.
- [19] M. Burger *i in.*, „Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer”, *Eur. Urol.*, t. 63, nr 2, s. 234–241, luty 2013, doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.033.
- [20] A. H. Al-Zalabani, K. F. J. Stewart, A. Wesselius, A. M. W. J. Schols, i M. P. Zeegers, „Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses”, *Eur. J. Epidemiol.*, t. 31, nr 9, s. 811–851, wrz. 2016, doi: 10.1007/s10654-016-0138-6.
- [21] R. A. M. Case, M. E. Hosker, D. B. McDonald, i J. T. Pearson, „Tumours Of The Urinary Bladder in Workmen Engaged in the Manufacture and Use Of Certain Dye-stuff Intermediates In The British Chemical Industry. Part I. The Role Of Aniline, Benzidine, Alpha-Naphthylamine, And Beta-Naphthylamine”, *Occup. Environ. Med.*, t. 11, nr 2, s. 75–104, kwi. 1954, doi: 10.1136/oem.11.2.75
- [22] M. I. Fernández *i in.*, „Epidemiology, prevention, screening, diagnosis, and evaluation: update of the ICUD–SIU joint consultation on bladder cancer”, *World J. Urol.*, t. 37, nr 1, s. 3–13, sty. 2019, doi: 10.1007/s00345-018-2436-y.
- [23] J. Ferrís, J. Garcia, O. Berbel, i J. A. Ortega, „Constitutional and occupational risk factors associated with bladder cancer”, *Actas Urol. Esp.*, t. 37, nr 8, s. 513–522, wrz. 2013, doi: 10.1016/j.acuro.2013.01.001.
- [24] J. Miyazaki i H. Nishiyama, „Epidemiology of urothelial carcinoma”, *Int. J. Urol.*, t. 24, nr 10, s. 730–734, paź. 2017, doi: 10.1111/iju.13376.
- [25] C. D. Fankhauser i H. Mostafid, „Prevention of bladder cancer incidence and recurrence: nutrition and lifestyle”, *Curr. Opin. Urol.*, t. 28, nr 1, s. 88–92, sty. 2018, doi: 10.1097/MOU.0000000000000452.
- [26] C. Mettlin i S. Graham, „DIETARY RISK FACTORS IN HUMAN BLADDER CANCER”, *Am. J. Epidemiol.*, t. 110, nr 3, s. 255–263, wrz. 1979, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112810.
- [27] „Bladder Cancer Causes, Risk Factors, and Prevention”.
- [28] M. I. Fernández *i in.*, „Epidemiology, prevention, screening, diagnosis, and evaluation: update of the ICUD–SIU joint consultation on bladder cancer”, *World J. Urol.*, t. 37, nr 1, s. 3–13, sty. 2019, doi: 10.1007/s00345-018-2436-y.
- [29] S. Sharma, P. Ksheersagar, i P. Sharma, „Diagnosis and treatment of bladder cancer”, *Am. Fam. Physician*, t. 80, nr 7, s. 717–723, paź. 2009.
- [30] K. C. DeGeorge, H. R. Holt, i S. C. Hodges, „Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment”, *Am. Fam. Physician*, t. 96, nr 8, s. 507–514, paź. 2017.
- [31] G. Cheung, A. Sahai, M. Billia, P. Dasgupta, i M. S. Khan, „Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer”, *BMC Med.*, t. 11, nr 1, s. 13, grudz. 2013, doi: 10.1186/1741-7015-11-13.
- [32] O. Sanli *i in.*, „Bladder cancer”, *Nat. Rev. Dis. Primer*, t. 3, nr 1, s. 17022, grudz. 2017, doi: 10.1038/nrdp.2017.22.
- [34] A. M. Kamat *i in.*, „Bladder cancer”, *The Lancet*, t. 388, nr 10061, s. 2796–2810, grudz. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30512-8.
- [35] [https://www.onkonet.pl/dp\\_num\\_pnpecherza.php#menu5](https://www.onkonet.pl/dp_num_pnpecherza.php#menu5) [data dostępu: 21.03.2022]
- [36] Sławomir Poletajew, „Patologia raka pęcherza moczowego”, t. 2013/4, nr 80.
- [37] C. Alifrangis, U. McGovern, A. Freeman, T. Powles, i M. Linch, „Molecular and histopathology directed therapy for advanced bladder cancer”, *Nat. Rev. Urol.*, t. 16, nr 8, s. 465–483, sie. 2019, doi: 10.1038/s41585-019-0208-0.



- [38] A. Lopez-Beltran, V. Henriques, R. Montironi, A. Cimadamore, M. R. Raspollini, i L. Cheng, „Variants and new entities of bladder cancer”, *Histopathology*, t. 74, nr 1, s. 77–96, sty. 2019, doi: 10.1111/his.13752.
- [39] G. P. Paner *i in.*, „Immunohistochemical evaluation of novel and traditional markers associated with urothelial differentiation in a spectrum of variants of urothelial carcinoma of the urinary bladder”, *Hum. Pathol.*, t. 45, nr 7, s. 1473–1482, lip. 2014, doi: 10.1016/j.humpath.2014.02.024.
- [40] [https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fimg.medscapestatic.com%2Fpi%2Fmeds%2Ffckb%2F83%2F9383tn.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fmedicine.medscape.com%2Farticle%2F1611983overview&tbnid=bXDo1XRAUOygCM&vet=12ahUKEwjOu8uWoYH7AhVpiYsKHWIBBdMQMygAegUIARC\\_AQ..i&docid=4LE4mbEqN65frM&w=380&h=286&q=squamous%20cell%20carcinoma%20bladder%20cancer&ved=2ahUKEwjOu8uWoYH7AhVpiYsKHWIBBdMQMygAegUIARC\\_AQ](https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fimg.medscapestatic.com%2Fpi%2Fmeds%2Ffckb%2F83%2F9383tn.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fmedicine.medscape.com%2Farticle%2F1611983overview&tbnid=bXDo1XRAUOygCM&vet=12ahUKEwjOu8uWoYH7AhVpiYsKHWIBBdMQMygAegUIARC_AQ..i&docid=4LE4mbEqN65frM&w=380&h=286&q=squamous%20cell%20carcinoma%20bladder%20cancer&ved=2ahUKEwjOu8uWoYH7AhVpiYsKHWIBBdMQMygAegUIARC_AQ) [data dostępu: 12.11.2022 r.]
- [41] [https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fimg.medscapestatic.com%2Fpi%2Fmeds%2Ffckb%2F83%2F9383tn.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fmedicine.medscape.com%2Farticle%2F1611983overview&tbnid=bXDo1XRAUOygCM&vet=12ahUKEwjOu8uWoYH7AhVpiYsKHWIBBdMQMygAegUIARC\\_AQ..i&docid=4LE4mbEqN65frM&w=380&h=286&q=squamous%20cell%20carcinoma%20bladder%20cancer&ved=2ahUKEwjOu8uWoYH7AhVpiYsKHWIBBdMQMygAegUIARC\\_AQ](https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fimg.medscapestatic.com%2Fpi%2Fmeds%2Ffckb%2F83%2F9383tn.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fmedicine.medscape.com%2Farticle%2F1611983overview&tbnid=bXDo1XRAUOygCM&vet=12ahUKEwjOu8uWoYH7AhVpiYsKHWIBBdMQMygAegUIARC_AQ..i&docid=4LE4mbEqN65frM&w=380&h=286&q=squamous%20cell%20carcinoma%20bladder%20cancer&ved=2ahUKEwjOu8uWoYH7AhVpiYsKHWIBBdMQMygAegUIARC_AQ) [data dostępu: 12.11.2022 r.]
- [42] <https://www.google.com/search?q=small+cell+carcinomas+bladder+cancer&tbm=isch&ved=2ahUKEwid1pzHoYH7AhXii8MKHUW-BmgQ2> [data dostępu: 12.11.2022 r.]
- [43] <https://www.webpathology.com/image.asp?case=61&n=20> [data dostępu: 12.11.2022 r.]
- [44] [https://www.google.com/search?q=neuroendocrine+carcinomas+bladder+cancer&tbm=isch&ved=2ahUKEwjOxPWRooH7AhWKw4sKHVNMAUoQ2-cCegQIABAA&oq=neuroendocrine+carcinomas+bladder+cancer&gs\\_lcp=CgNpbWcQA1CGFVi8NWKkN2gAcAB4AIAbtQGIAf8NkgEDOS44mAEAoAEBqgELZ3dzLXdpei1pbWfAAQE&scient=img&ei=bxaxY47RMoqHrwTTmIXQBA&bih=722&biw=1536&rlz=1C1GCEA\\_enPL912PL912#imgrc=qUuWDaueCKodeM](https://www.google.com/search?q=neuroendocrine+carcinomas+bladder+cancer&tbm=isch&ved=2ahUKEwjOxPWRooH7AhWKw4sKHVNMAUoQ2-cCegQIABAA&oq=neuroendocrine+carcinomas+bladder+cancer&gs_lcp=CgNpbWcQA1CGFVi8NWKkN2gAcAB4AIAbtQGIAf8NkgEDOS44mAEAoAEBqgELZ3dzLXdpei1pbWfAAQE&scient=img&ei=bxaxY47RMoqHrwTTmIXQBA&bih=722&biw=1536&rlz=1C1GCEA_enPL912PL912#imgrc=qUuWDaueCKodeM) [data dostępu: 12.11.2022 r.]
- [45] <https://twitter.com/webpathology/status/504363526433947649> [data dostępu: 12.11.2022 r.]
- [46] T. Chandrasekar, A. Erlich, i A. R. Zlotta, „Molecular Characterization of Bladder Cancer”, *Curr. Urol. Rep.*, t. 19, nr 12, s. 107, grudz. 2018, doi: 10.1007/s11934-018-0853-5.
- [47] M. H. Y. Fong, M. Feng, D. J. McConkey, i W. Choi, „Update on bladder cancer molecular subtypes”, *Transl. Androl. Urol.*, t. 9, nr 6, s. 2881–2889, grudz. 2020, doi: 10.21037/tau-2019-mibc-12.
- [48] D. Goutas, A. Tzortzis, H. Gakiopoulou, D. Vlachodimitropoulos, I. Giannopoulou, i A. C. Lazaris, „Contemporary Molecular Classification of Urinary Bladder Cancer”, *In Vivo*, t. 35, nr 1, s. 75–80, 2021, doi: 10.21873/invivo.12234.
- [49] M. Minoli, M. Kiener, G. N. Thalmann, M. Kruthof-de Julio, i R. Seiler, „Evolution of Urothelial Bladder Cancer in the Context of Molecular Classifications”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 21, nr 16, s. 5670, sie. 2020, doi: 10.3390/ijms21165670.
- [50] S. Zhu, W. Yu, X. Yang, C. Wu, i F. Cheng, „Traditional Classification and Novel Subtyping Systems for Bladder Cancer”, *Front. Oncol.*, t. 10, s. 102, luty 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00102.
- [51] L. Tran, J.-F. Xiao, N. Agarwal, J. E. Duex, i D. Theodorescu, „Advances in bladder cancer biology and therapy”, *Nat. Rev. Cancer*, t. 21, nr 2, s. 104–121, luty 2021, doi: 10.1038/s41568-020-00313-1.
- [52] Sławomir Poletajew, „Ocena stopnia zaawansowania raka pęcherza moczowego”, t. 2012/3, nr 73, s. 22–26.

- [54] S. P. Lerner *i in.*, „Bladder Cancer Molecular Taxonomy: Summary from a Consensus Meeting”, *Bladder Cancer*, t. 2, nr 1, s. 37–47, sty. 2016, doi: 10.3233/BLC-150037.
- [55] G. Sjö Dahl, P. Eriksson, F. Liedberg, i M. Höglund, „Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification: Urothelial carcinoma classification”, *J. Pathol.*, t. 242, nr 1, s. 113–125, maj 2017, doi: 10.1002/path.4886.
- [56] F. Soria *i in.*, „Molecular markers in bladder cancer”, *World J. Urol.*, t. 37, nr 1, s. 31–40, sty. 2019, doi: 10.1007/s00345-018-2503-4.
- [57] W. Martin-Doyle i D. J. Kwiatkowski, „Molecular Biology of Bladder Cancer”, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, t. 29, nr 2, s. 191–203, kwi. 2015, doi: 10.1016/j.hoc.2014.10.002.
- [58] Margaret A. Knowles, „Molecular Biology of Bladder Cancer”, s. 115–130.
- [59] S. F. Shariat, J. A. Karam, i S. P. Lerner, „Molecular markers in bladder cancer”:, *Curr. Opin. Urol.*, t. 18, nr 1, s. 1–8, sty. 2008, doi: 10.1097/MOU.0b013e3282f1c5c1.
- [60] A. P. Mitra, H. Lin, R. H. Datar, i R. J. Cote, „Molecular Biology of Bladder Cancer: Prognostic and Clinical Implications”, *Clin. Genitourin. Cancer*, t. 5, nr 1, s. 67–77, cze. 2006, doi: 10.3816/CGC.2006.n.020.
- [61] N. M. Luis, E. López-Knowles, i F. X. Real, „Molecular biology of bladder cancer”, *Clin. Transl. Oncol.*, t. 9, nr 1, s. 5–12, sty. 2007, doi: 10.1007/s12094-007-0003-x.
- [62] M. A. Knowles i C. D. Hurst, „Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity”, *Nat. Rev. Cancer*, t. 15, nr 1, s. 25–41, sty. 2015, doi: 10.1038/nrc3817.
- [63] R. N. Borland, C. B. Brendler, i W. B. Isaacs, „Molecular Biology of Bladder Cancer”, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, t. 6, nr 1, s. 31–39, luty 1992, doi: 10.1016/S0889-8588(18)30361-7.
- [64] D. S. Kaufman, W. U. Shipley, i A. S. Feldman, „Bladder cancer”, *The Lancet*, t. 374, nr 9685, s. 239–249, lip. 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)60491-8.
- [65] R. T. Bryan, M. P. Zeegers, N. D. James, D. M. A. Wallace, i K. K. Cheng, „Biomarkers in bladder cancer”, *BJU Int.*, t. 105, nr 5, s. 608–613, mar. 2010, doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.08880.x
- [66] V. G. Patel, W. K. Oh, i M. D. Galsky, „Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020”, *CA. Cancer J. Clin.*, t. 70, nr 5, s. 404–423, wrz. 2020, doi: 10.3322/caac.21631.
- [67] A. T. Lenis, P. M. Lec, K. Chamie, i M. Mshs, „Bladder Cancer: A Review”, *JAMA*, t. 324, nr 19, s. 1980, lis. 2020, doi: 10.1001/jama.2020.17598.
- [68] A. Anastasiadis i T. M. de Reijke, „Best practice in the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer”, *Ther. Adv. Urol.*, t. 4, nr 1, s. 13–32, luty 2012, doi: 10.1177/1756287211431976.
- [69] C. L. Amling, „Diagnosis and management of superficial bladder cancer”, *Curr. Probl. Cancer*, t. 25, nr 4, s. 224–278, sie. 2001, doi: 10.1067/mcn.2001.117539.
- [70] M. Babjuk *i in.*, „European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update”, *Eur. Urol.*, t. 76, nr 5, s. 639–657, lis. 2019, doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.016.
- [71] L. Tran, J.-F. Xiao, N. Agarwal, J. E. Duex, i D. Theodorescu, „Advances in bladder cancer biology and therapy”, *Nat. Rev. Cancer*, t. 21, nr 2, s. 104–121, luty 2021, doi: 10.1038/s41568-020-00313-1.
- [72] K. Hendricksen i J. A. Witjes, „Current strategies for first and second line intravesical therapy for nonmuscle invasive bladder cancer”:, *Curr. Opin. Urol.*, t. 17, nr 5, s. 352–357, wrz. 2007, doi: 10.1097/MOU.0b013e3281c55f2b.
- [73] M. C. Metts, J. C. Metts, S. J. Milito, i C. R. Thomas, „Bladder cancer: a review of diagnosis and management”, *J. Natl. Med. Assoc.*, t. 92, nr 6, s. 285–294, cze. 2000.

- [74] R. L. Steinberg, L. J. Thomas, i M. A. O'Donnell, „Combination Intravesical Chemotherapy for Non-muscle-invasive Bladder Cancer”, *Eur. Urol. Focus*, t. 4, nr 4, s. 503–505, lip. 2018, doi: 10.1016/j.euf.2018.07.005.
- [75] J. Han, X. Gu, Y. Li, i Q. Wu, „Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect”, *Biomed. Pharmacother.*, t. 129, s. 110393, wrz. 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110393.
- [76] S. J. Crabb i J. Douglas, „The latest treatment options for bladder cancer”, *Br. Med. Bull.*, t. 128, nr 1, s. 85–95, grudz. 2018, doi: 10.1093/bmb/ldy034.
- [77] N. Lobo, C. Mount, K. Omar, R. Nair, R. Thurairaja, i M. S. Khan, „Landmarks in the treatment of muscle-invasive bladder cancer”, *Nat. Rev. Urol.*, t. 14, nr 9, s. 565–574, wrz. 2017, doi: 10.1038/nrurol.2017.82
- [78] C. N. Sternberg *i in.*, „Chemotherapy for Bladder Cancer: Treatment Guidelines for Neoadjuvant Chemotherapy, Bladder Preservation, Adjuvant Chemotherapy, and Metastatic Cancer”, *Urology*, t. 69, nr 1, s. 62–79, sty. 2007, doi: 10.1016/j.urology.2006.10.041.
- [79] P. C. Black, G. A. Brown, H. B. Grossman, i C. P. Dinney, „Neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer”, *World J. Urol.*, t. 24, nr 5, s. 531–542, lis. 2006, doi: 10.1007/s00345-006-0113-z.
- [80] C. Buttiglierio, M. Tucci, F. Vignani, G. V. Scagliotti, i M. Di Maio, „Molecular biomarkers to predict response to neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer”, *Cancer Treat. Rev.*, t. 54, s. 1–9, mar. 2017, doi: 10.1016/j.ctrv.2017.01.002.
- [81] D. Pectasides, M. Pectasides, i M. Nikolaou, „Adjuvant and Neoadjuvant Chemotherapy in Muscle Invasive Bladder Cancer: Literature Review”, *Eur. Urol.*, t. 48, nr 1, s. 60–68, lip. 2005, doi: 10.1016/j.eururo.2005.03.025.
- [82] C. N. Sternberg *i in.*, „Chemotherapy for Bladder Cancer: Treatment Guidelines for Neoadjuvant Chemotherapy, Bladder Preservation, Adjuvant Chemotherapy, and Metastatic Cancer”, *Urology*, t. 69, nr 1, s. 62–79, sty. 2007, doi: 10.1016/j.urology.2006.10.041.
- [83] S. S. Chang *i in.*, „Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline”, *J. Urol.*, t. 198, nr 3, s. 552–559, wrz. 2017, doi: 10.1016/j.juro.2017.04.086.
- [84] R. Ghandour, N. Singla, i Y. Lotan, „Treatment Options and Outcomes in Nonmetastatic Muscle Invasive Bladder Cancer”, *Trends Cancer*, t. 5, nr 7, s. 426–439, lip. 2019, doi: 10.1016/j.trecan.2019.05.011.
- [85] H. B. Grossman *i in.*, „Neoadjuvant Chemotherapy plus Cystectomy Compared with Cystectomy Alone for Locally Advanced Bladder Cancer”, *N. Engl. J. Med.*, t. 349, nr 9, s. 859–866, sie. 2003, doi: 10.1056/NEJMoa022148.
- [86] H. Zargar *i in.*, „Multicenter Assessment of Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-invasive Bladder Cancer”, *Eur. Urol.*, t. 67, nr 2, s. 241–249, luty 2015, doi: 10.1016/j.eururo.2014.09.007.
- [87] C. Vale, „Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis”, *The Lancet*, t. 361, nr 9373, s. 1927–1934, cze. 2003, doi: 10.1016/S0140-6736(03)13580-5.
- [88] M. Yin *i in.*, „Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis”, *The Oncologist*, t. 21, nr 6, s. 708–715, cze. 2016, doi: 10.1634/theoncologist.2015-0440.
- [89] G. Motterle, J. R. Andrews, A. Morlacco, i R. J. Karnes, „Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Bladder Cancer”, *Eur. Urol. Focus*, t. 6, nr 4, s. 642–649, lip. 2020, doi: 10.1016/j.euf.2019.10.016.
- [90] A. Stenzl *i in.*, „Treatment of Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Update of the EAU Guidelines”, *Eur. Urol.*, t. 59, nr 6, s. 1009–1018, cze. 2011, doi: 10.1016/j.eururo.2011.03.023.

- [91] J. E. Rosenberg, P. R. Carroll, i E. J. Small, „UPDATE ON CHEMOTHERAPY FOR ADVANCED BLADDER CANCER”, *J. Urol.*, t. 174, nr 1, s. 14–20, lip. 2005, doi: 10.1097/01.ju.0000162039.38023.5f.
- [92] R. Nadal i J. Bellmunt, „Management of metastatic bladder cancer”, *Cancer Treat. Rev.*, t. 76, s. 10–21, cze. 2019, doi: 10.1016/j.ctrv.2019.04.002.
- [93] F. A. Yafi, S. North, i W. Kassouf, „First- and Second-Line Therapy for Metastatic Urothelial Carcinoma of the Bladder”, *Curr. Oncol.*, t. 18, nr 1, s. 695, luty 2011, doi: 10.3747/co.v18i1.695.
- [94] J. Bellmunt i D. P. Petrylak, „New Therapeutic Challenges in Advanced Bladder Cancer”, *Semin. Oncol.*, t. 39, nr 5, s. 598–607, paź. 2012, doi: 10.1053/j.seminoncol.2012.08.007.
- [95] J. L. Godwin, J. Hoffman-Censits, i E. Plimack, „Recent developments in the treatment of advanced bladder cancer”, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, t. 36, nr 3, s. 109–114, mar. 2018, doi: 10.1016/j.urolonc.2017.12.018.
- [96] W. Abida, D. F. Bajorin, i J. E. Rosenberg, „First-Line Treatment and Prognostic Factors of Metastatic Bladder Cancer for Platinum-Eligible Patients”, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, t. 29, nr 2, s. 319–328, kwi. 2015, doi: 10.1016/j.hoc.2014.10.005.
- [97] H.-C. Zheng, „The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers”, *Oncotarget*, t. 8, nr 35, s. 59950–59964, sie. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.19048.
- [98] S. Ghosh, „Cisplatin: The first metal based anticancer drug”, *Bioorganic Chem.*, t. 88, s. 102925, lip. 2019, doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.
- [99] S. Dasari i P. Bernard Tchounwou, „Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action”, *Eur. J. Pharmacol.*, t. 740, s. 364–378, paź. 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- [100] F. Massari *i in.*, „Emerging concepts on drug resistance in bladder cancer: Implications for future strategies”, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, t. 96, nr 1, s. 81–90, paź. 2015, doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.05.005.
- [101] R. M. Drayton i J. W. Catto, „Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer”, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, t. 12, nr 2, s. 271–281, luty 2012, doi: 10.1586/era.11.201.
- [102] L. Amable, „Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine”, *Pharmacol. Res.*, t. 106, s. 27–36, kwi. 2016, doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.001.
- [103] D. J. Stewart, „Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin”, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, t. 63, nr 1, s. 12–31, lip. 2007, doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.02.001.
- [104] A. Mari, D. D’Andrea, M. Abufaraj, B. Foerster, S. Kimura, i S. F. Shariat, „Genetic determinants for chemo- and radiotherapy resistance in bladder cancer”, *Transl. Androl. Urol.*, t. 6, nr 6, s. 1081–1089, grudz. 2017, doi: 10.21037/tau.2017.08.19.
- [105] E. Mini, S. Nobili, B. Caciagli, I. Landini, i T. Mazzei, „Cellular pharmacology of gemcitabine”, *Ann. Oncol.*, t. 17, s. v7–v12, maj 2006, doi: 10.1093/annonc/mdj941.
- [106] F. E. Karak i A. Flechon, „Gemcitabine in bladder cancer”, *Expert Opin. Pharmacother.*, t. 8, nr 18, s. 3251–3256, grudz. 2007, doi: 10.1517/14656566.8.18.3251.
- [107] Y. Jia i J. Xie, „Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer”, *Genes Dis.*, t. 2, nr 4, s. 299–306, grudz. 2015, doi: 10.1016/j.gendis.2015.07.003.
- [108] L. de Sousa Cavalcante i G. Monteiro, „Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer”, *Eur. J. Pharmacol.*, t. 741, s. 8–16, paź. 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.041.
- [109] J. H. Cutts, C. T. Beer, i R. L. Noble, „Biological properties of Vincalokoblastine, an alkaloid in *Vinca rosea* Linn, with reference to its antitumor action”, *Cancer Res.*, t. 20, s. 1023–1031, sie. 1960.

- [110] M. Moudi, R. Go, C. Y. S. Yien, i M. Nazre, „Vinca alkaloids”, *Int. J. Prev. Med.*, t. 4, nr 11, s. 1231–1235, lis. 2013.
- [111] R. D. Arora i R. G. Menezes, „Vinca Alkaloid Toxicity”, w *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Dostęp: 8 listopad 2022. [Online]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557842/>
- [112] Y. Zhang, S.-H. Yang, i X.-L. Guo, „New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer”, *Biomed. Pharmacother.*, t. 96, s. 659–666, grudz. 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.041.
- [113] Q. Chen, T. Chong, J. Yin, P. Luo, i A. Deng, „Molecular events are associated with resistance to vinblastine in bladder cancer”, *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.*, t. 61, nr 2, s. 33–38, maj 2015.
- [114] H. S. Al-malky, S. E. Al Harthi, i A.-M. M. Osman, „Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance”, *J. Oncol. Pharm. Pract.*, t. 26, nr 2, s. 434–444, mar. 2020, doi: 10.1177/1078155219877931.
- [115] S. Naito, „p300 mediates cellular resistance to doxorubicin in bladder cancer”, *Mol. Med. Rep.*, wrz. 2011, doi: 10.3892/mmr.2011.593.
- [116] J.R Bertino, E. Göker, R. Gorlick, null Li, i W.W Banerjee, „Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors”, *The Oncologist*, t. 1, nr 4, s. 223–226, 1996.
- [117] C. Zhang *i in.*, „The Molecular Mechanism of Resistance to Methotrexate in Mouse Methotrexate-Resistant Cells by Cancer Drug Resistance and Metabolism SuperArray”, *Basic Htmlemt Glyphamp Asciiamp Clin. Pharmacol. Htmlemt Glyphamp Asciiamp Toxicol.*, t. 99, nr 2, s. 141–145, sie. 2006, doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto\_470.x.
- [118] Mitsiogianni *i in.*, „The Role of Isothiocyanates as Cancer Chemo-Preventive, Chemo-Therapeutic and Anti-Melanoma Agents”, *Antioxidants*, t. 8, nr 4, s. 106, kwi. 2019, doi: 10.3390/antiox8040106.
- [119] P. Gupta, B. Kim, S.-H. Kim, i S. K. Srivastava, „Molecular targets of isothiocyanates in cancer: Recent advances”, *Mol. Nutr. Food Res.*, t. 58, nr 8, s. 1685–1707, sie. 2014, doi: 10.1002/mnfr.201300684.
- [120] <https://www.breastcancer.org/managing-life/diet-nutrition/breast-cancer-risk-reduction/foods/phytochemicals>
- [121] B. Abbaoui, C. R. Lucas, K. M. Riedl, S. K. Clinton, i A. Mortazavi, „Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates, and Bladder Cancer Prevention”, *Mol. Nutr. Food Res.*, t. 62, nr 18, s. 1800079, wrz. 2018, doi: 10.1002/mnfr.201800079.
- [122] L. Tang *i in.*, „Consumption of Raw Cruciferous Vegetables is Inversely Associated with Bladder Cancer Risk”, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, t. 17, nr 4, s. 938–944, kwi. 2008, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2502.
- [123] F. Bianchini i H. Vainio, „Isothiocyanates in Cancer Prevention”, *Drug Metab. Rev.*, t. 36, nr 3–4, s. 655–667, sty. 2004, doi: 10.1081/DMR-200033468.
- [124] P. Gupta, B. Kim, S.-H. Kim, i S. K. Srivastava, „Molecular targets of isothiocyanates in cancer: Recent advances”, *Mol. Nutr. Food Res.*, t. 58, nr 8, s. 1685–1707, sie. 2014, doi: 10.1002/mnfr.201300684.
- [125] T. Mastuo *i in.*, „Molecular Mechanisms of the Anti-Cancer Effects of Isothiocyanates from Cruciferous Vegetables in Bladder Cancer”, *Molecules*, t. 25, nr 3, s. 575, sty. 2020, doi: 10.3390/molecules25030575.
- [126] S. L. Navarro, F. Li, i J. W. Lampe, „Mechanisms of action of isothiocyanates in cancer chemoprevention: an update”, *Food Funct.*, t. 2, nr 10, s. 579, 2011, doi: 10.1039/c1fo10114e.
- [127] D. Nandini, R. Rao, B. Deepak, i P. Reddy, „Sulforaphane in broccoli: The green chemoprevention!! Role in cancer prevention and therapy”, *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, t. 24, nr 2, s. 405, 2020, doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_126\_19.

- [128] D. L. Palliyaguru, J.-M. Yuan, T. W. Kensler, i J. W. Fahey, „Isothiocyanates: Translating the Power of Plants to People”, *Mol. Nutr. Food Res.*, t. 62, nr 18, s. 1700965, wrz. 2018, doi: 10.1002/mnfr.201700965.
- [129] Y. Zhang, L. Tang, i V. Gonzalez, „Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells”, *Mol. Cancer Ther.*, t. 2, nr 10, s. 1045–1052, paź. 2003.
- [130] X. Wu, Q. Zhou, i K. Xu, „Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs?”, *Acta Pharmacol. Sin.*, t. 30, nr 5, s. 501–512, maj 2009, doi: 10.1038/aps.2009.50.
- [131] O. L. Veeranki, A. Bhattacharya, L. Tang, J. R. Marshall, i Y. Zhang, „Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates, and Prevention of Bladder Cancer”, *Curr. Pharmacol. Rep.*, t. 1, nr 4, s. 272–282, sie. 2015, doi: 10.1007/s40495-015-0024-z.
- [132] Y.-S. Keum, W.-S. Jeong, i A. N. Tony Kong, „Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms”, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, t. 555, nr 1–2, s. 191–202, lis. 2004, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.05.024.
- [133] C. Fimognari, M. Lenzi, i P. Hrelia, „Chemoprevention of Cancer by Isothiocyanates and Anthocyanins: Mechanisms of Action and Structure-Activity Relationship”, *Curr. Med. Chem.*, t. 15, nr 5, s. 440–447, luty 2008, doi: 10.2174/092986708783503168.
- [134] R. Hu, B. R. Kim, C. Chen, V. Hebbar, i A.-N. T. Kong, „The roles of JNK and apoptotic signaling pathways in PEITC-mediated responses in human HT-29 colon adenocarcinoma cells”, *Carcinogenesis*, t. 24, nr 8, s. 1361–1367, sie. 2003, doi: 10.1093/carcin/bgg092.
- [135] K. L. Cheung, J. H. Lee, L. Shu, J.-H. Kim, D. B. Sacks, i A.-N. T. Kong, „The Ras GTPase-activating-like Protein IQGAP1 Mediates Nrf2 Protein Activation via the Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Kinase (MEK)-ERK Pathway”, *J. Biol. Chem.*, t. 288, nr 31, s. 22378–22386, sie. 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.444182.
- [136] Stanisław Szala, „Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych”, t. 50, nr 2, s. 111–124.
- [137] X. Wu *i in.*, „Isothiocyanates induce oxidative stress and suppress the metastasis potential of human non-small cell lung cancer cells”, *BMC Cancer*, t. 10, nr 1, s. 269, grudz. 2010, doi: 10.1186/1471-2407-10-269.
- [138] S. Safe i R. Kasiappan, „Natural Products as Mechanism-based Anticancer Agents: Sp Transcription Factors as Targets: Sp Proteins as Phytochemical Anticancer Drug Targets”, *Phytother. Res.*, t. 30, nr 11, s. 1723–1732, lis. 2016, doi: 10.1002/ptr.5669.
- [139] K. Beishline i J. Azizkhan-Clifford, „Sp1 and the ‘hallmarks of cancer’”, *FEBS J.*, t. 282, nr 2, s. 224–258, sty. 2015, doi: 10.1111/febs.13148.
- [140] C. Vizcaíno, S. Mansilla, i J. Portugal, „Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy”, *Pharmacol. Ther.*, t. 152, s. 111–124, sie. 2015, doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.008.
- [141] J.-F. Lin *i in.*, „Benzyl isothiocyanate induces reactive oxygen species-initiated autophagy and apoptosis in human prostate cancer cells”, *Oncotarget*, t. 8, nr 12, s. 20220–20234, mar. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15643.
- [142] Q. Zhang *i in.*, „Benzyl isothiocyanate induces protective autophagy in human lung cancer cells through an endoplasmic reticulum stress-mediated mechanism”, *Acta Pharmacol. Sin.*, t. 38, nr 4, s. 539–550, kwi. 2017, doi: 10.1038/aps.2016.146.
- [143] A. Bommarreddy *i in.*, „Atg5 Regulates Phenethyl Isothiocyanate-Induced Autophagic and Apoptotic Cell Death in Human Prostate Cancer Cells”, *Cancer Res.*, t. 69, nr 8, s. 3704–3712, kwi. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4344.
- [144] H.-J. Liu, L. Wang, L. Kang, J. Du, S. Li, i H.-X. Cui, „Sulforaphane-N-Acetyl-Cysteine Induces Autophagy Through Activation of ERK1/2 in U87MG and U373MG Cells”, *Cell. Physiol. Biochem.*, t. 51, nr 2, s. 528–542, 2018, doi: 10.1159/000495274.

- [145] L. Moserle i O. Casanovas, „Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance”, *J. Intern. Med.*, t. 273, nr 2, s. 128–137, luty 2013, doi: 10.1111/joim.12018.
- [146] Wysocka A., Gizinski S., i Lechowski R., „Metaloproteinazy macierzy - ich struktura oraz znaczenie”, t. 89.
- [147] M. A. Rudek, J. Venitz, i W. D. Figg, „Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Do They Have a Place in Anticancer Therapy?”, *Pharmacotherapy*, t. 22, nr 6, s. 705–720, cze. 2002, doi: 10.1592/phco.22.9.705.34062.
- [148] Z. Wang *i in.*, „Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy”, *Semin. Cancer Biol.*, t. 35, s. S224–S243, grudz. 2015, doi: 10.1016/j.semcancer.2015.01.001.
- [149] Y. Sato, „Molecular mechanism of angiogenesis Transcription factors and their therapeutic relevance”, *Pharmacol. Ther.*, t. 87, nr 1, s. 51–60, lip. 2000, doi: 10.1016/S0163-7258(00)00067-X.
- [150] P. Thejass i G. Kuttan, „Inhibition of Endothelial Cell Differentiation and Proinflammatory Cytokine Production During Angiogenesis by Allyl Isothiocyanate and Phenyl Isothiocyanate”, *Integr. Cancer Ther.*, t. 6, nr 4, s. 389–399, grudz. 2007, doi: 10.1177/1534735407309084.
- [151] K.-C. Lai *i in.*, „Allyl isothiocyanate inhibits cell metastasis through suppression of the MAPK pathways in epidermal growth factor-stimulated HT29 human colorectal adenocarcinoma cells”, *Oncol. Rep.*, t. 31, nr 1, s. 189–196, sty. 2014, doi: 10.3892/or.2013.2865.
- [152] D. Xiao i S. V. Singh, „Phenethyl Isothiocyanate Inhibits Angiogenesis *In vitro* and *Ex vivo*”, *Cancer Res.*, t. 67, nr 5, s. 2239–2246, mar. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3645.
- [153] L. Wang *i in.*, „Sulforaphane inhibits thyroid cancer cell growth and invasiveness through the reactive oxygen species-dependent pathway”, *Oncotarget*, t. 6, nr 28, s. 25917–25931, wrz. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.4542.
- [154] M. Psurski *i in.*, „Novel phosphonate analogs of sulforaphane: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* anticancer activity”, *Eur. J. Med. Chem.*, t. 132, s. 63–80, maj 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.028.
- [155] Ł. Janczewski *i in.*, „Design, Synthesis, and Evaluation of  $\omega$ -(Isothiocyanato)alkylphosphinates and Phosphine Oxides as Antiproliferative Agents”, *ChemMedChem*, t. 13, nr 1, s. 105–115, sty. 2018, doi: 10.1002/cmde.201700619.
- [156] M. Psurski, K. Błażewska, A. Gajda, T. Gajda, J. Wietrzyk, i J. Oleksyszyn, „Synthesis and antiproliferative activity of novel  $\alpha$ - and  $\beta$ -dialkoxymethylphosphoryl isothiocyanates”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, t. 21, nr 15, s. 4572–4576, sie. 2011, doi: 10.1016/j.bmcl.2011.05.113.
- [157] R. Grzywa *i in.*, „Synthesis and biological activity of diisothiocyanate-derived mercapturic acids”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, t. 26, nr 2, s. 667–671, sty. 2016, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.11.045.
- [158] K. T. Papazisis, G. D. Geromichalos, K. A. Dimitriadis, i A. H. Kortsaris, „Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay”, *Journal of Immunological Methods*, t. 208, nr 2, ss. 151–158, 1997.
- [159] <https://www.mp.pl/> [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [160] <https://go.drugbank.com/drugs/DB04690> [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [161] <https://pl.wikipedia.org/wiki/Kombretastatyny> [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [162] [https://pl.wikipedia.org/wiki/Trichostatyna\\_A](https://pl.wikipedia.org/wiki/Trichostatyna_A) [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [163] <https://pl.wikipedia.org/wiki/Winblastyna> [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [164] <https://www.doz.pl/leki/w1268-Winflunina> [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [165] [https://bioinfo.imdik.pan.pl/wiki/Real-time\\_PCR](https://bioinfo.imdik.pan.pl/wiki/Real-time_PCR) [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [166] [https://bioinfo.imdik.pan.pl/wiki/Western\\_blot](https://bioinfo.imdik.pan.pl/wiki/Western_blot) [data dostępu: 14.04.2022 r.]

- [167] <http://www.izibb.binoz.uj.edu.pl/documents/4416519/c4d1f0ef-35f4-4f3c-928a-3a0b2b026d7b> [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [168] [https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234382/morfologia\\_komorki\\_apoptotycznej.pdf](https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234382/morfologia_komorki_apoptotycznej.pdf) [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [169] <http://www.biotechnolog.pl/bromodeoksyurydyna> [data dostępu: 14.04.2022 r.]
- [170] [https://farmacja.umw.edu.pl/sites/default/files/zbmik/files/Cwiczenie\\_nr\\_3\\_.pdf](https://farmacja.umw.edu.pl/sites/default/files/zbmik/files/Cwiczenie_nr_3_.pdf) [data dostępu: 20.04.2022]
- [171] B. Stordal *i in.*, „Resistance to Paclitaxel in a Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cell Line Is Mediated by P-Glycoprotein”, *PLoS ONE*, t. 7, nr 7, s. e40717, lip. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0040717.
- [172] R. J. Haines, L. C. Pendleton, i D. C. Eichler, „Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism”, *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, t. 2, nr 1, s. 8–23, 2011.
- [173] Y.-Q. Li, J.-Y. Yin, Z.-Q. Liu, i X.-P. Li, „Copper efflux transporters ATP7A and ATP7B: Novel biomarkers for platinum drug resistance and targets for therapy: ATP7A/7B AND PLATINUM DRUG RESISTANCE”, *IUBMB Life*, t. 70, nr 3, s. 183–191, mar. 2018, doi: 10.1002/iub.1722.
- [174] <https://www.genecards.org/> [175] R. Mezencev, L. V. Matyunina, G. T. Wagner, i J. F. McDonald, „Acquired resistance of pancreatic cancer cells to cisplatin is multifactorial with cell context-dependent involvement of resistance genes”, *Cancer Gene Ther.*, t. 23, nr 12, s. 446–453, grudz. 2016, doi: 10.1038/cgt.2016.71.
- [176] A. Yeon *i in.*, „Rewiring of cisplatin-resistant bladder cancer cells through epigenetic regulation of genes involved in amino acid metabolism”, *Theranostics*, t. 8, nr 16, s. 4520–4534, 2018, doi: 10.7150/thno.25130.
- [177] S. Horibe *i in.*, „Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins”, *Life Sci.*, t. 124, s. 31–40, mar. 2015, doi: 10.1016/j.lfs.2015.01.011.
- [178] S. Mozzetti *i in.*, „Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients”, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, t. 11, nr 1, s. 298–305, sty. 2005.
- [179] M. D. Wissing *i in.*, „Nuclear Eg5 (kinesin spindle protein) expression predicts docetaxel response and prostate cancer aggressiveness”, *Oncotarget*, t. 5, nr 17, s. 7357–7367, wrz. 2014, doi: 10.18632/oncotarget.1985.
- [180] Jolanta Bednarek, Józefa Węsierska-Gądek, i Zofia M. Kiliańska, „Nowe oblicze białek antyapoptotycznych. I. Białko Mcl-1”, t. 53, nr 3, s. 228–238.
- [181] H. Wang *i in.*, „MALAT1/miR-101-3p/MCL1 axis mediates cisplatin resistance in lung cancer”, *Oncotarget*, t. 9, nr 7, s. 7501–7512, sty. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.23483.
- [182] A. M. Abukhdeir i B. H. Park, „p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance”, *Expert Rev. Mol. Med.*, t. 10, s. e19, lip. 2008, doi: 10.1017/S1462399408000744.
- [183] T. V. T. Le, Y. Seo, C. J. Ryu, H. R. Lee, i H.-J. Park, „Increased expression of p27 is associated with the cisplatin resistance in gastric cancer cell line YCC-3”, *Arch. Pharm. Res.*, t. 33, nr 7, s. 1127–1132, lip. 2010, doi: 10.1007/s12272-010-0720-5.
- [184] Y. Liu i D. J. Kwiatkowski, „Combined CDKN1A/TP53 Mutation in Bladder Cancer Is a Therapeutic Target”, *Mol. Cancer Ther.*, t. 14, nr 1, s. 174–182, sty. 2015, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0622-T.
- [185] Ewa Karwicka, „Rola glutationu w oporności wielolekowej”, t. 37, nr 2.
- [186] N. Traverso *i in.*, „Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance”, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, t. 2013, s. 1–10, 2013, doi: 10.1155/2013/972913.



- [187] J. W. Fahey *i in.*, „Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[ *a* ]pyrene-induced stomach tumors”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 99, nr 11, s. 7610–7615, maj 2002, doi: 10.1073/pnas.112203099.
- [188] J. W. Fahey, K. K. Stephenson, K. L. Wade, i P. Talalay, „Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 435, nr 1, s. 1–7, maj 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.126.
- [189] E. Freitas, A. Aires, E. A. de S. Rosa, i M. J. Saavedra, „Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of *Escherichia coli* from clinical and animal source”, *Lett. Appl. Microbiol.*, t. 57, nr 4, s. 266–273, paź. 2013, doi: 10.1111/lam.12105.
- [190] F. A. Hashem i M. M. Saleh, „Antimicrobial components of some cruciferae plants (*Diplotaxis harra* Forsk. and *Erucaria microcarpa* Boiss.)”, *Phytother. Res.*, t. 13, nr 4, s. 329–332, cze. 1999, doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199906)13:4<329::AID-PTR458>3.0.CO;2-U.
- [191] P. Gupta, B. Kim, S.-H. Kim, i S. K. Srivastava, „Molecular targets of isothiocyanates in cancer: Recent advances”, *Mol. Nutr. Food Res.*, t. 58, nr 8, s. 1685–1707, sie. 2014, doi: 10.1002/mnfr.201300684.
- [192] Y. Nakamura i N. Miyoshi, „Electrophiles in Foods: The Current Status of Isothiocyanates and Their Chemical Biology”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, t. 74, nr 2, s. 242–255, luty 2010, doi: 10.1271/bbb.90731.
- [193] M. S. Gibson i R. W. Bradshaw, „The Gabriel Synthesis of Primary Amines”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, t. 7, nr 12, s. 919–930, grudz. 1968, doi: 10.1002/anie.196809191.
- [194] E. D. Crawford i J. A. Wells, „Caspase Substrates and Cellular Remodeling”, *Annu. Rev. Biochem.*, t. 80, nr 1, s. 1055–1087, lip. 2011, doi: 10.1146/annurev-biochem-061809-121639.
- [195] A. Krishan, „Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining.”, *J. Cell Biol.*, t. 66, nr 1, s. 188–193, lip. 1975, doi: 10.1083/jcb.66.1.188.
- [196] G. J. Finlay i B. C. Baguley, „The use of human cancer cell lines as a primary screening system for antineoplastic compounds”, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, t. 20, nr 7, s. 947–954, lip. 1984, doi: 10.1016/0277-5379(84)90169-X.
- [197] L. Mi *i in.*, „Covalent Binding to Tubulin by Isothiocyanates”, *J. Biol. Chem.*, t. 283, nr 32, s. 22136–22146, sie. 2008, doi: 10.1074/jbc.M802330200.
- [198] L. Mi *i in.*, „Identification of Potential Protein Targets of Isothiocyanates by Proteomics”, *Chem. Res. Toxicol.*, t. 24, nr 10, s. 1735–1743, paź. 2011, doi: 10.1021/tx2002806.
- [199] L. Mi *i in.*, „Covalent Binding to Tubulin by Isothiocyanates”, *J. Biol. Chem.*, t. 283, nr 32, s. 22136–22146, sie. 2008, doi: 10.1074/jbc.M802330200.
- [200] Z. Xiao, L. Mi, F.-L. Chung, i T. D. Veenstra, „Proteomic Analysis of Covalent Modifications of Tubulins by Isothiocyanates”, *J. Nutr.*, t. 142, nr 7, s. 1377S-1381S, lip. 2012, doi: 10.3945/jn.111.152041.
- [201] L. Mi *i in.*, „Cancer Preventive Isothiocyanates Induce Selective Degradation of Cellular  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tubulins by Proteasomes”, *J. Biol. Chem.*, t. 284, nr 25, s. 17039–17051, cze. 2009, doi: 10.1074/jbc.M901789200.
- [202] A. Karimian, Y. Ahmadi, i B. Yousefi, „Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage”, *DNA Repair*, t. 42, s. 63–71, cze. 2016, doi: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008
- [203] R. M. Drayton i J. W. Catto, „Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer”, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, t. 12, nr 2, s. 271–281, luty 2012, doi: 10.1586/era.11.201.
- [204] R. Visconti i D. Grieco, „Fighting tubulin-targeting anticancer drug toxicity and resistance”, *Endocr. Relat. Cancer*, t. 24, nr 9, s. T107–T117, wrz. 2017, doi: 10.1530/ERC-17-0120.

- [205] Y. Jia i J. Xie, „Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer”, *Genes Dis.*, t. 2, nr 4, s. 299–306, grudz. 2015, doi: 10.1016/j.gendis.2015.07.003.
- [206] S. Vallo *i in.*, „Drug-Resistant Urothelial Cancer Cell Lines Display Diverse Sensitivity Profiles to Potential Second-Line Therapeutics”, *Transl. Oncol.*, t. 8, nr 3, s. 210–216, cze. 2015, doi: 10.1016/j.tranon.2015.04.002.
- [207] Y.-Q. Li, J.-Y. Yin, Z.-Q. Liu, i X.-P. Li, „Copper efflux transporters ATP7A and ATP7B: Novel biomarkers for platinum drug resistance and targets for therapy: ATP7A/7B AND PLATINUM DRUG RESISTANCE”, *IUBMB Life*, t. 70, nr 3, s. 183–191, mar. 2018, doi: 10.1002/iub.1722.
- [208] Z. Li, R. Zheng, J. Chen, J. Jia, i M. Qiu, „The role of copper transporter ATP7A in platinum-resistance of esophageal squamous cell cancer (ESCC)”, *J. Cancer*, t. 7, nr 14, s. 2085–2092, 2016, doi: 10.7150/jca.16117.
- [209] D. Lukanović, M. Herzog, B. Kobal, i K. Černe, „The contribution of copper efflux transporters ATP7A and ATP7B to chemoresistance and personalized medicine in ovarian cancer”, *Biomed. Pharmacother.*, t. 129, s. 110401, wrz. 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110401.
- [210] S. Schoch *i in.*, „Activity profile of the cisplatin analogue PN149 in different tumor cell lines”, *Biochem. Pharmacol.*, t. 156, s. 109–119, paź. 2018, doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.025.
- [211] H. Wang *i in.*, „MALAT1/miR-101-3p/MCL1 axis mediates cisplatin resistance in lung cancer”, *Oncotarget*, t. 9, nr 7, s. 7501–7512, sty. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.23483.
- [212] Q. Li *i in.*, „Phenylethyl isothiocyanate reverses cisplatin resistance in biliary tract cancer cells via glutathionylation-dependent degradation of Mcl-1”, *Oncotarget*, t. 7, nr 9, s. 10271–10282, mar. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7171.
- [213] S. Horibe *i in.*, „Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins”, *Life Sci.*, t. 124, s. 31–40, mar. 2015, doi: 10.1016/j.lfs.2015.01.011.
- [214] T. V. T. Le, Y. Seo, C. J. Ryu, H. R. Lee, i H.-J. Park, „Increased expression of p27 is associated with the cisplatin resistance in gastric cancer cell line YCC-3”, *Arch. Pharm. Res.*, t. 33, nr 7, s. 1127–1132, lip. 2010, doi: 10.1007/s12272-010-0720-5.
- [215] N. Traverso *i in.*, „Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance”, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, t. 2013, s. 1–10, 2013, doi: 10.1155/2013/972913.
- [216] C. Meijer, N. Mulder, G. Hospers, D. Uges, i E. de Vries, „The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung cancer cell line”, *Br. J. Cancer*, t. 62, nr 1, s. 72–77, lip. 1990, doi: 10.1038/bjc.1990.232.
- [217] Y. Yang *i in.*, „Targeting ABCB1-mediated tumor multidrug resistance by CRISPR/Cas9-based genome editing”, *Am. J. Transl. Res.*, t. 8, nr 9, s. 3986–3994, 2016.
- [218] B. Stordal *i in.*, „Resistance to Paclitaxel in a Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cell Line Is Mediated by P-Glycoprotein”, *PLoS ONE*, t. 7, nr 7, s. e40717, lip. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0040717.
- [219] A. Breier, L. Gíbalova, M. Seres, M. Barancik, i Z. Sulova, „New insight into p-glycoprotein as a drug target”, *Anticancer Agents Med. Chem.*, t. 13, nr 1, s. 159–170, sty. 2013.
- [220] C. Dumontet i M. A. Jordan, „Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics”, *Nat. Rev. Drug Discov.*, t. 9, nr 10, s. 790–803, paź. 2010, doi: 10.1038/nrd3253.
- [221] A. M. Abukhdeir i B. H. Park, „p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance”, *Expert Rev. Mol. Med.*, t. 10, s. e19, lip. 2008, doi: 10.1017/S1462399408000744.
- [222] R. Koster *i in.*, „Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer”, *J. Clin. Invest.*, t. 120, nr 10, s. 3594–3605, paź. 2010, doi: 10.1172/JCI41939.

- [223] S. Mozzetti *i in.*, „Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients”, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, t. 11, nr 1, s. 298–305, sty. 2005.
- [224] R. Evers *i in.*, „Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export”, *Br. J. Cancer*, t. 83, nr 3, s. 375–383, sie. 2000, doi: 10.1054/bjoc.2000.1262.
- [225] D. W. Shen *i in.*, „Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins”, *J. Biol. Chem.*, t. 261, nr 17, s. 7762–7770, cze. 1986.
- [226] H. Achiwa, T. Oguri, S. Sato, H. Maeda, T. Niimi, i R. Ueda, „Determinants of sensitivity and resistance to gemcitabine: The roles of human equilibrative nucleoside transporter 1 and deoxycytidine kinase in non-small cell lung cancer”, *Cancer Sci.*, t. 95, nr 9, s. 753–757, wrz. 2004, doi: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03257.x.
- [227] H. Fujita *i in.*, „Gene Expression Levels as Predictive Markers of Outcome in Pancreatic Cancer after Gemcitabine-Based Adjuvant Chemotherapy”, *Neoplasia*, t. 12, nr 10, s. 807-IN8, paź. 2010, doi: 10.1593/neo.10458.
- [228] Y. Saiki *i in.*, „DCK is frequently inactivated in acquired gemcitabine-resistant human cancer cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 421, nr 1, s. 98–104, kwi. 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.122.
- [229] S. Asai *i in.*, „Silencing of ECHDC1 inhibits growth of gemcitabine-resistant bladder cancer cells”, *Oncol. Lett.*, paź. 2017, doi: 10.3892/ol.2017.7269.
- [230] H.-Q. Ju *i in.*, „Mechanisms of Overcoming Intrinsic Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma through the Redox Modulation”, *Mol. Cancer Ther.*, t. 14, nr 3, s. 788–798, mar. 2015, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0420.
- [231] A. M. Bergman, H. M. Pinedo, V. W. T. R. van Haperen, G. Veerman, C. M. Kuiper, i G. J. Peters, „Cross-Resistance of the Gemcitabine Resistant Human Ovarian Cancer Cell Line AG6000 to Standard and Investigational Drugs”, w *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man IX*, t. 431, A. Griesmacher, M. M. Müller, i P. Chiba, Red. Boston, MA: Springer US, 1998, s. 587–590. doi: 10.1007/978-1-4615-5381-6\_113.
- [232] H. Yoneyama *i in.*, „Acquired resistance to gemcitabine and cross-resistance in human pancreatic cancer clones”, *Anticancer. Drugs*, t. 26, nr 1, s. 90–100, sty. 2015, doi: 10.1097/CAD.000000000000165.
- [233] L. W. Wattenberg, „Inhibition of Carcinogenic Effects of Polycyclic Hydrocarbons by Benzyl Isothiocyanate and Related Compounds<sup>2</sup>”, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, t. 58, nr 2, s. 395–398, luty 1977, doi: 10.1093/jnci/58.2.395.
- [234] L. W. Wattenberg, „Inhibition of carcinogen-induced neoplasia by sodium cyanate, tert-butyl isocyanate, and benzyl isothiocyanate administered subsequent to carcinogen exposure”, *Cancer Res.*, t. 41, nr 8, s. 2991–2994, sie. 1981.
- [235] L. W. Wattenberg, „Inhibitory effects of benzyl isothiocyanate administered shortly before diethylnitrosamine or benzo[ *a* ]pyrene on pulmonary and forestomach neoplasia in A/J mice”, *Carcinogenesis*, t. 8, nr 12, s. 1971–1973, 1987, doi: 10.1093/carcin/8.12.1971
- [236] E. Oshimura i K. Sakamoto, „Amino Acids, Peptides, and Proteins”, w *Cosmetic Science and Technology*, Elsevier, 2017, s. 285–303. doi: 10.1016/B978-0-12-802005-0.00019-7.
- [237] O. L. Veeranki, A. Bhattacharya, L. Tang, J. R. Marshall, i Y. Zhang, „Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates, and Prevention of Bladder Cancer”, *Curr. Pharmacol. Rep.*, t. 1, nr 4, s. 272–282, sie. 2015, doi: 10.1007/s40495-015-0024-z.

- [238] E. Lamy, C. Scholtes, C. Herz, i V. Mersch-Sundermann, „Pharmacokinetics and pharmacodynamics of isothiocyanates”, *Drug Metab. Rev.*, t. 43, nr 3, s. 387–407, sie. 2011, doi: 10.3109/03602532.2011.569551.
- [239] O. L. Veeranki, A. Bhattacharya, J. R. Marshall, i Y. Zhang, „Organ-specific exposure and response to sulforaphane, a key chemopreventive ingredient in broccoli: implications for cancer prevention”, *Br. J. Nutr.*, t. 109, nr 1, s. 25–32, sty. 2013, doi: 10.1017/S0007114512000657.
- [240] S. Sharma, „Thiophosgene in Organic Synthesis”, *Synthesis*, t. 1978, nr 11, s. 803–820, 1978, doi: 10.1055/s-1978-24896.
- [241] D. L. Garmaise, R. Schwartz, i A. F. McKay, „Amino Acids. VI. Preparation and Chemistry of  $\alpha$ -Carbalkoxyalkyl Isothiocyanates”, *J. Am. Chem. Soc.*, t. 80, nr 13, s. 3332–3334, lip. 1958, doi: 10.1021/ja01546a035.
- [242] B. Halpern, W. Patton, i P. Crabbé, „Cotton effects of some isothiocyanate derivatives of amino-acids and amino-alcohols”, *J Chem Soc B*, t. 0, nr 0, s. 1143–1145, 1969, doi: 10.1039/J29690001143.
- [243] G. Błotny, J. Szafranek, i J. Kuśmierz, „The Usefulness of Amino Acid Ester Isothiocyanate Derivatives in GLC Analysis, Pyrolysis Products of Carboalkoxydithiocarbamates”, *Anal. Lett.*, t. 11, nr 12, s. 1063–1074, sty. 1978, doi: 10.1080/00032717808067900.
- [244] Ł. Janczewski, D. Kręgiel, i B. Kolesińska, „Synthesis of Isothiocyanates Using DMT/NMM/TsO<sup>-</sup> as a New Desulfurization Reagent”, *Molecules*, t. 26, nr 9, s. 2740, maj 2021, doi: 10.3390/molecules26092740.
- [245] D. Xiao *i in.*, „Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by reactive oxygen species-dependent disruption of the mitochondrial membrane potential”, *Carcinogenesis*, t. 27, nr 11, s. 2223–2234, maj 2006, doi: 10.1093/carcin/bgl087.
- [246] S. Y. Park, G. Y. Kim, S.-J. Bae, Y. H. Yoo, i Y. H. Choi, „Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3”, *Oncol. Rep.*, t. 18, nr 1, s. 181–187, lip. 2007.
- [247] A. K. Sharma *i in.*, „Synthesis and Anticancer Activity Comparison of Phenylalkyl Isoselenocyanates with Corresponding Naturally Occurring and Synthetic Isothiocyanates”, *J. Med. Chem.*, t. 51, nr 24, s. 7820–7826, grudz. 2008, doi: 10.1021/jm800993r.
- [248] Y.-C. Chou *i in.*, „PEITC induces apoptosis of Human Brain Glioblastoma GBM8401 Cells through the extrinsic- and intrinsic -signaling pathways”, *Neurochem. Int.*, t. 81, s. 32–40, luty 2015, doi: 10.1016/j.neuint.2015.01.001.
- [249] P.-Y. Chen *i in.*, „Phenethyl Isothiocyanate (PEITC) Inhibits the Growth of Human Oral Squamous Carcinoma HSC-3 Cells through G 0 / G 1 Phase Arrest and Mitochondria-Mediated Apoptotic Cell Death”, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, t. 2012, s. 1–12, 2012, doi: 10.1155/2012/718320.
- [250] D. Xiao, „Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis”, *Carcinogenesis*, t. 24, nr 5, s. 891–897, maj 2003, doi: 10.1093/carcin/bgg023.
- [251] A. Pawlik, M. A. Szczepanski, A. Klimaszewska, L. Gackowska, A. Zuryn, i A. Grzanka, „Phenethyl isothiocyanate-induced cytoskeletal changes and cell death in lung cancer cells”, *Food Chem. Toxicol.*, t. 50, nr 10, s. 3577–3594, paź. 2012, doi: 10.1016/j.fct.2012.07.043.
- [252] N.-Y. Tang *i in.*, „Phenethyl isothiocyanate (PEITC) promotes G2/M phase arrest via p53 expression and induces apoptosis through caspase- and mitochondria-dependent signaling pathways in human prostate cancer DU 145 cells”, *Anticancer Res.*, t. 31, nr 5, s. 1691–1702, maj 2011.
- [253] S. J. T. Jackson i K. W. Singletary, „Sulforaphane Inhibits Human MCF-7 Mammary Cancer Cell Mitotic Progression and Tubulin Polymerization”, *J. Nutr.*, t. 134, nr 9, s. 2229–2236, wrz. 2004, doi: 10.1093/jn/134.9.2229.

- [254] L. Mi *i in.*, „Covalent Binding to Tubulin by Isothiocyanates”, *J. Biol. Chem.*, t. 283, nr 32, s. 22136–22146, sie. 2008, doi: 10.1074/jbc.M802330200.
- [255] L. Mi *i in.*, „Cancer Preventive Isothiocyanates Induce Selective Degradation of Cellular  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tubulins by Proteasomes”, *J. Biol. Chem.*, t. 284, nr 25, s. 17039–17051, cze. 2009, doi: 10.1074/jbc.M901789200.
- [256] O. Azarenko, M. A. Jordan, i L. Wilson, „Erucin, the Major Isothiocyanate in Arugula (*Eruca sativa*), Inhibits Proliferation of MCF7 Tumor Cells by Suppressing Microtubule Dynamics”, *PLoS ONE*, t. 9, nr 6, s. e100599, cze. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0100599.
- [257] S. J. T. Jackson, „Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization”, *Carcinogenesis*, t. 25, nr 2, s. 219–227, paź. 2003, doi: 10.1093/carcin/bgg192.
- [258] A. L. V. Savio, G. N. da Silva, E. A. de Camargo, i D. M. F. Salvadori, „Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil)”, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, t. 762, s. 40–46, kwi. 2014, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.02.006.
- [259] A. Bhattacharya *i in.*, „Inhibition of bladder cancer development by allyl isothiocyanate”, *Carcinogenesis*, t. 31, nr 2, s. 281–286, luty 2010, doi: 10.1093/carcin/bgp303.
- [260] L. Tang i Y. Zhang, „Dietary Isothiocyanates Inhibit the Growth of Human Bladder Carcinoma Cells”, *J. Nutr.*, t. 134, nr 8, s. 2004–2010, sie. 2004, doi: 10.1093/jn/134.8.2004.
- [261] A. Karimian, Y. Ahmadi, i B. Yousefi, „Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage”, *DNA Repair*, t. 42, s. 63–71, cze. 2016, doi: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008.
- [262] P. Yin, T. Kawamura, M. He, D. Vanaja, i C. Young, „Phenethyl isothiocyanate induces cell cycle arrest and reduction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isotypes in human prostate cancer cells”, *Cell Biol. Int.*, t. 33, nr 1, s. 57–64, sty. 2009, doi: 10.1016/j.cellbi.2008.09.013.
- [263] A. Ben-Ze’ev, S. R. Farmer, i S. Penman, „Mechanisms of regulating tubulin synthesis in cultured mammalian cells”, *Cell*, t. 17, nr 2, s. 319–325, cze. 1979, doi: 10.1016/0092-8674(79)90157-0.
- [264] D. W. Cleveland, M. A. Lopata, P. Sherline, i M. W. Kirschner, „Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs”, *Cell*, t. 25, nr 2, s. 537–546, sie. 1981, doi: 10.1016/0092-8674(81)90072-6.
- [265] D. W. Cleveland, M. F. Pittenger, i J. R. Feramisco, „Elevation of tubulin levels by microinjection suppresses new tubulin synthesis”, *Nature*, t. 305, nr 5936, s. 738–740, paź. 1983, doi: 10.1038/305738a0.
- [266] R. Yu, S. Mandlekar, K. J. Harvey, D. S. Ucker, i A. N. Kong, „Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity”, *Cancer Res.*, t. 58, nr 3, s. 402–408, luty 1998.
- [267] B. Abbaoui *i in.*, „Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: Characterization, metabolism, and interconversion”, *Mol. Nutr. Food Res.*, t. 56, nr 11, s. 1675–1687, lis. 2012, doi: 10.1002/mnfr.201200276.
- [268] E.-S. Hwang i H. J. Lee, „Effects of phenylethyl isothiocyanate and its metabolite on cell-cycle arrest and apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells”, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, t. 61, nr 3, s. 324–336, maj 2010, doi: 10.3109/09637481003639092.
- [269] A. Pawlik, M. Wała, A. Hać, A. Felczykowska, i A. Herman-Antosiewicz, „Sulforaphane, an isothiocyanate present in radish plants, inhibits proliferation of human breast cancer cells”, *Phytomedicine*, t. 29, s. 1–10, cze. 2017, doi: 10.1016/j.phymed.2017.03.007.
- [270] N. Kubota, „Benzyl isothiocyanate sensitizes human pancreatic cancer cells to radiation by inducing apoptosis”, *Int. J. Mol. Med.*, sie. 2011, doi: 10.3892/ijmm.2011.770.
- [271] A. L. V. Savio, G. N. da Silva, E. A. de Camargo, i D. M. F. Salvadori, „Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate

- (mustard essential oil)", *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, t. 762, s. 40–46, kwi. 2014, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.02.006.
- [272] D. Xiao *i in.*, „Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by reactive oxygen species-dependent disruption of the mitochondrial membrane potential", *Carcinogenesis*, t. 27, nr 11, s. 2223–2234, maj 2006, doi: 10.1093/carcin/bgl087.
- [273] Y. Zhang, „Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells", *Carcinogenesis*, t. 21, nr 6, s. 1175–1182, cze. 2000.
- [274] Y. Zhang, „Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates", *Carcinogenesis*, t. 22, nr 3, s. 425–431, mar. 2001, doi: 10.1093/carcin/22.3.425.
- [275] K. Xu i P. J. Thornalley, „Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro *Biochem. Pharmacol.*, t. 61, nr 2, s. 165–177, sty. 2001, doi: 10.1016/S0006-2952(00)00526-8.
- [276] L. Huang, C. Cai, W. Dang, J. Lu, G. Hu, i J. Gu, „Propyl isothiocyanate induces apoptosis in gastric cancer cells by oxidative stress via glutathione depletion", *Oncol. Lett.*, wrz. 2019, doi: 10.3892/ol.2019.10875.

---

## 8. SPIS RYCIN I TABEL

---

- Ryc. 1** *Czynniki zwiększające ryzyko zachorowalności na nowotwory pęcherza moczowego.*
- Ryc. 2** *Diagnostyka nowotworów pęcherza moczowego.*
- Ryc. 3** *Schemat leczenia stosowany u pacjentów z nienaciekającym (NMIBC) rakiem pęcherza moczowego.*
- Ryc. 4** *Schemat leczenia stosowany u pacjentów z naciekającym (MIBC) rakiem pęcherza moczowego.*
- Ryc. 5** *Schemat leczenia stosowany u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego z przerzutami.*
- Ryc. 6** *(A) Wzór strukturalny izotiocyjanianu; R – grupa alkilowa lub aryłowa, (B) Hydroliza glukozynolanów [124].*
- Ryc. 7** *Szlak kwasów merkapturowych [124].*
- Ryc. 8** *Struktura izotiocyjanianu  $\alpha$ -naftyłu.*
- Ryc. 9** *Procesy, na które wpływają izotiocyjaniany [125].*
- Ryc. 10** *Schemat wyprowadzenia linii lekoopornych raka pęcherza moczowego.*
- Ryc. 11** *Schemat przygotowania rozcieńczeń BSA do krzywej standardowej.*
- Ryc. 12** *Porównanie ekspresji wybranych genów w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego.*
- Ryc. 13** *Porównanie ekspresji wybranych genów w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego.*
- Ryc. 14** *Porównanie ekspresji wybranych genów w komórkach linii wyjściowych raka pęcherza moczowego.*
- Ryc. 15** *Porównanie poziomu wybranych białek w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego.*

- Ryc. 16** *Porównanie poziomu wybranych białek w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego.*
- Ryc. 17** *Porównanie poziomu wybranych białek w komórkach panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego.*
- Ryc. 18** *Porównanie poziomu wybranych białek w komórkach linii wyjściowych raka pęcherza moczowego.*
- Ryc. 19** *Stosunek glutationu zredukowanego (GSH) do utlenionego (GSSG) w komórkach linii raka pęcherza moczowego wyjściowych oraz lekoopornych nie traktowanych BSO.*
- Ryc. 20** *Stosunek glutationu zredukowanego (GSH) do utlenionego (GSSG) w komórkach linii raka pęcherza moczowego wyjściowych oraz lekoopornych traktowanych BSO.*
- Ryc. 21** *Ilość glutationu całkowitego w komórkach linii raka pęcherza moczowego wyjściowych oraz lekoopornych nie traktowanych BSO.*
- Ryc. 22** *Ilość glutationu całkowitego w komórkach linii raka pęcherza moczowego wyjściowych oraz lekoopornych traktowanych BSO.*
- Ryc. 23** *Aktywność kaspazy 3 w komórkach linii raka pęcherza moczowego po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC.*
- Ryc. 24** *Porównanie odsetka komórek żywych, apoptotycznych oraz nekrotycznych za pomocą testu wykorzystującego barwienie aneksyną V w komórkach linii raka pęcherza moczowego po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC.*
- Ryc. 25** *Reprezentatywne dot-ploty przedstawiające wyniki testu z wykorzystaniem aneksyny V dla każdego badanego związku w 15  $\mu$ M stężeniu w komórkach linii raka pęcherza moczowego.*
- Ryc. 26** *Analiza cyklu komórkowego w komórkach linii raka pęcherza moczowego po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC z wykorzystaniem BrdU.*
- Ryc. 27** *Reprezentatywne dot-ploty przedstawiające rozkład komórek w poszczególnych w fazach cyklu komórkowego w 15  $\mu$ M stężeniu każdego badanego związku*



w komórkach linii raka pęcherza moczowego oraz wzorcowy dot-plot obrazujący rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

**Ryc. 28** Zdolność do tworzenia kolonii przez komórki linii raka pęcherza moczowego po 72h traktowania ITC.

**Ryc. 29** Stosunek glutationu zredukowanego do utlenionego w komórkach linii raka pęcherza moczowego po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC.

**Ryc. 30** Kinetyka polimeryzacji tubuliny w obecności badanych ITC (pierwszy eksperyment).

**Ryc. 31** Kinetyka polimeryzacji tubuliny w obecności ITC będących pochodnymi alaniny, tj. ester butylowy, etylowy, benzylowy, iso-propylowy oraz heksylowy (drugi eksperyment wzorcowy wykres przedstawiający trzy fazy polimeryzacji tubuliny).

**Ryc. 32** Porównanie ekspresji TUBA8 oraz TUBB6 w komórkach linii raka pęcherza moczowego po 24h traktowania ITC.

**Ryc. 33** Porównanie poziomu wybranych białek:  $\alpha$ -tubuliny,  $\beta$ -tubuliny oraz p21 w komórkach linii raka pęcherza moczowego po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC.

**Ryc. 34** Reprezentatywne zdjęcia western blot – analiza poziomu  $\alpha$ -tubuliny,  $\beta$ -tubuliny oraz p21 w lizatach linii komórkowych raka pęcherza moczowego po 24h traktowania wyselekcjonowanymi ITC.

**Ryc. 35** Reprezentatywne obrazy komórek raka pęcherza moczowego linii komórkowych wykonane przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.

**Ryc. 36** Reprezentatywne obrazy komórek raka pęcherza moczowego linii komórkowej UM-UC-3 traktowanej badanymi ITC w trzech stężeniach wykonane przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.

**Ryc. 37** Reprezentatywne obrazy komórek raka pęcherza moczowego linii komórkowej UM-UC-3<sup>VBL</sup> traktowanej badanymi ITC w trzech stężeniach wykonane przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.

- Ryc. 38** *Reprezentatywne obrazy komórek raka pęcherza moczowego linii komórkowej UM-UC-3<sup>GEM</sup> traktowanej badanymi ITC w trzech stężeniach wykonane przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.*
- Tab. 1** *Testy stosowane w diagnostyce raka pęcherza moczowego oparte o detekcję obecnych w moczu biomarkerów [33].*
- Tab. 2** *Klasyfikacja histopatologiczna nowotworów pęcherza moczowego [35-45].*
- Tab. 3** *Podtypy (klasy) molekularne guzów NMIBC [49].*
- Tab. 4** *Podtypy molekularne guzów MIBC [49].*
- Tab. 5** *Klasyfikacja ISUP oraz WHO oceny stopnia zróżnicowania raka pęcherza moczowego [52].*
- Tab. 6** *Klasyfikacja TNM [52].*
- Tab. 7** *Markery molekularne raka pęcherza moczowego.*
- Tab. 8** *Cząsteczki oraz procesy zaangażowane w rozwój lekooporności na cisplatynę.*
- Tab. 9** *Szlaki sygnałowe, czynniki transkrypcyjne oraz białka zaangażowane w rozwój lekooporności na gemcytabinę.*
- Tab. 10** *Białka zaangażowane w rozwój lekooporności na alkaloidy vinca.*
- Tab. 11** *Białka zaangażowane w rozwój lekooporności na doksorubicynę.*
- Tab. 12** *Białka zaangażowane w rozwój lekooporności na doksorubicynę.*
- Tab. 13** *Białka, na które wpływają izotiocyjaniiny [125].*
- Tab. 14** *Stosowane stężenia cytostatyków w trakcie wyprowadzania lekoopornych linii komórkowych raka pęcherza moczowego.*
- Tab. 15** *Związki, ich postać oraz mechanizm działania, które były testowane podczas sprawdzania oporności krzyżowej panelu linii lekoopornych raka pęcherza moczowego oraz trzech linii wrażliwych.*
- Tab. 16** *Geny badane w lizatach komórkowych panelu linii lekoopornych raka pęcherza moczowego oraz linii wrażliwych za pomocą techniki Real-Time PCR.*
- Tab. 17** *Białka badane w lizatach komórkowych w panelu linii lekoopornych raka pęcherza moczowego oraz linii wrażliwych za pomocą techniki western blot.*

- Tab. 18** *Składy buforów wykorzystywanych w teście GSH/GSSG-Glo™ assay.*
- Tab. 19** *Geny badane w lizatach komórkowych po traktowaniu ITC w wybranych liniach komórkowych raka pęcherza moczowego za pomocą techniki Real-Time PCR.*
- Tab. 20** *Białka badane w lizatach komórkowych po traktowaniu ITC w wybranych liniach komórkowych raka pęcherza moczowego za pomocą techniki western blot.*
- Tab. 21** *RI uzyskane dla wyprowadzonych lekoopornych linii komórkowych raka pęcherza moczowego.*
- Tab. 22** *RI uzyskane dla komórek linii raka pęcherza moczowego opornych na cisplatynę oraz winblastynę.*
- Tab. 23** *RI uzyskane dla komórek linii raka pęcherza moczowego opornych na gemcytabinę oraz zarówno na cisplatynę jak i gemcytabinę.*
- Tab. 24** *Profil lekooporności komórek panelu linii wyjściowych oraz lekoopornych raka pęcherza moczowego po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach. Wyniki przedstawiono jako IC<sub>50</sub> (95% CI).*
- Tab. 25** *Badane geny oraz ich funkcje.*
- Tab. 26** *Badane białka oraz ich funkcje.*
- Tab. 27** *Zsyntezowane ITC: ich nazwy, symbole, struktury oraz masy molowe.*
- Tab. 28** *<sup>1</sup>H NMR sześciu izotiocyanianów zsyntezowanych w ramach współpracy z dr inż. Łukaszem Winiarskim.*
- Tab. 29** *Ocena wstępnej aktywności biologicznej ITC wobec komórek rodziny linii raka pęcherza moczowego UM-UC-3 (linii wyjściowej oraz lekoopornych) po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach.*
- Tab. 30** *Ocena wstępnej aktywności biologicznej ITC wobec komórek rodziny linii raka pęcherza moczowego RT-112 (linii wyjściowej oraz lekoopornych) po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach.*
- Tab. 31** *Ocena wstępnej aktywności biologicznej ITC wobec komórek rodziny linii raka pęcherza moczowego TCC-SUP (linii wyjściowej oraz lekoopornych) po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach.*

- Tab. 32** *Ocena wstępnej aktywności biologicznej ITC wobec komórek raka pęcherza moczowego linii KU-19-19, HT-1376 oraz 5637 po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach.*
- Tab. 33** *Uśrednione IC<sub>50</sub> związków zawierających w swojej strukturze ten sam ester wobec komórek rodziny linii UM-UC-3.*
- Tab. 34** *Uśrednione IC<sub>50</sub> związków zawierających w swojej strukturze ten sam ester wobec komórek rodziny linii RT-112.*
- Tab. 35** *Uśrednione IC<sub>50</sub> związków zawierających w swojej strukturze ten sam ester wobec komórek rodziny linii TCC-SUP.*
- Tab. 36** *Uśrednione IC<sub>50</sub> związków zawierających w swojej strukturze ten sam ester wobec komórek linii: KU-19-19, HT-1376, 5637.*
- Tab. 37** *Ocena aktywności antyproliferacyjnej ITC zawierających estry metylowe wobec komórek rodziny linii UM-UC-3 po 72h ekspozycji na związki w różnych stężeniach.*
- Tab. 38** *Szybkość polimeryzacji tubuliny oraz procent jej zahamowania względem kontroli nietraktowanej pod wpływem działania badanych ITC.*
- Reakcja 1** *Ogólny schemat estryfikacji aminokwasów.*
- Reakcja 2** *Ogólny schemat syntezy izotiocyjanianów.*

---

## 9. DOROBEK NAUKOWY

---

### *Publikacje naukowe*

Mateusz Psurski, Beata Filip-Psurska, **Monika Cuprych**, Joanna Wietrzyk, Józef Oleksyszyn, *3,4-dimethoxybenzyl isothiocyanate enhances doxorubicin efficacy in LoVoDX doxorubicin-resistant colon cancer and attenuates its toxicity in vivo*. **Life Sciences** 2019, 231, doi.org/10.1016/j.lfs.2019.06.005

Diana Papiernik, Anna Urbaniak, Dagmara Kłopotowska, Anna Nasulewicz-Goldeman, Marcin Ekiert, Marcin Nowak, Joanna Jarosz, **Monika Cuprych**, Aleksandra Strzykalska, Maciej Ugorski, Rafał Matkowski and Joanna Wietrzyk *Retinol-Binding Protein 4 Accelerates Metastatic Spread and Increases Impairment of Blood Flow in Mouse Mammary Gland Tumors*. **Cancers**, 2020,12(3), <https://doi.org/10.3390/cancers12030623>

Agnieszka Łupicka-Słowik, Mateusz Psurski, Renata Grzywa, **Monika Cuprych**, Jarosław Ciekot, Waldemar Goldman, Elżbieta Wojaczyńska, Jacek Wojaczyński, Józef Oleksyszyn, Marcin Sieńczyk *Structure-based design, synthesis, and evaluation of the biological activity of novel phosphoroorganic small molecule IAP antagonists*. **Investigational New Drugs**, 2020, 38 <https://doi.org/10.1007/s10637-020-00923-4>

Paweł Lenartowicz, Mateusz Psurski, Aleksandra Kotynia, Aleksandra Pieniężna, **Monika Cuprych**, Klaudia Poniatowska, Justyna Brasuń, Paweł Kafarski *Dipeptides of S-Substituted Dehydrocysteine as Artzyme Building Blocks: Synthesis, Complexing Abilities and Antiproliferative Properties*. **Int. J. Mol. Sci.** 2021, 22(4) [10.3390/ijms22042168](https://doi.org/10.3390/ijms22042168)

### ***Komunikaty konferencyjne***

Agnieszka Łupicka-Słowik, Mateusz Psurski, **Monika Cuprych**, Marta Hermanowska, Renata Grzywa, Józef Oleksyszyn, Marcin Sieńczyk, *“Diagnostic and inhibitory potential of the polyclonal anti-ADA<sub>1</sub> IgY antibodies”*, 25th Polish Peptide Symposium, 8-12.09.2019, Wojanów

Jakub Cebula, Krzysztof Fink, Anna Nasulewicz-Goldeman, Mateusz Psurski, **Monika Cuprych**, Waldemar Goldeman, Anna Kędziora, Bartłomiej Dudek, Gabriela Bugła-Płoskońska, Tomasz M. Goszczyński, *”Pochodne metalokarboranów – synteza i ocena aktywności biologicznej”*, VII Ogólnopolskie Seminarium - Postępy w Chemii Boru, 3-5.06.2022 r, Radziejowice

Krzysztof Fink, Anna Kędziora, Bartłomiej Dudek, Gabriela Bugła-Płoskońska, Mateusz Psurski, **Monika Cuprych**, Waldemar Goldeman, Jakub Cebula, Mariusz Uchman, Tomasz M. Goszczyński, *”Metallacarborane-ultrashort cationic peptide conjugates with antimicrobial activity”*, Euroboron 9, 3-7.06.2022, Barcelona