

„Poszukiwanie nowych zastosowań dla fluorowych pochodnych izoselenotiocyanianów na modelu in vitro potrójnie negatywnego raka piersi”

mgr Milena Małecka

Praca magisterska wykonana we współpracy z Zakładem Biotechnologii Leków i Bioinformatyki
Narodowego Instytutu Leków

Promotor pracy: prof. dr hab. n. farm. Grażyna Nowicka
Opiekun naukowy pracy: dr Małgorzata Milczarek

Wstęp

Rak piersi to jedna z najczęstszych przyczyn zgonów u kobiet. Diagnostyka raka piersi obejmuje badania fizykalne, laboratoryjne i obrazowe (mammografię, USG piersi, MRI). Strategia leczenia zmian nowotworowych obejmuje: leczenie chirurgiczne, chemioterapię, radioterapię, hormonoterapię oraz terapię celowaną.

Potrójnie receptorowo negatywny nowotwór piersi (TNBC) charakteryzuje się wysoką inwazyjnością oraz opornością na leczenie. Na powierzchni komórek nie wykazano ekspresji receptorów: estrogenowego, progesteronowego oraz receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2).

TNBC często rozpoznawany jest u chorych:

- poniżej 50. roku życia,
- ze zdiagnozowaną mutacją BRCA1
- kobiet rasy afroamerykańskiej

Najczęściej w leczeniu chorych na potrójnie negatywnego raka piersi stosowane są następujące grupy leków:

- antracykliny
- inhibitory wrzeciona mitotycznego
- antymetabolity
- leki alkilujące

Coraz częściej poszukiwane są schematy politerapii, mające na celu eliminację komórek nowotworowych z organizmu pacjenta, które cechowałyby się ograniczonymi działaniami niepożądanymi oraz wykazywały działanie chemoprewencyjne w stosunku do komórek prawidłowych.

Cele pracy

1. Zbadanie interakcji farmakodynamicznych oraz opisanie właściwości przeciwnowotworowych chemioterapeutyków stosowanych w schematach politerapii: związku X, związku Y, związku Z i związku Q w połączeniu z pochodną sulforafanu - związkiem A.
2. Badanie zmian integralności błony komórkowej i asymetrii fosfolipidów błonowych z wykorzystaniem barwienia jodkiem propidyny oraz FITC-aneksyną V (badania apoptozy).

Materiały i metody

W badaniu wykorzystano następujące materiały:
Związki pochodzenia naturalnego i leki.

Związek A: pochodna sulforafanu – związek pochodzenia naturalnego

Związek X: przedstawiciel grupy inhibitorów proteasomu

Związek Y: antybiotyk przeciwnowotworowy należący do grupy antracyklin

Związek Z: lek należący do grupy taksanów wywołujący blokadę wrzeciona podziałowego

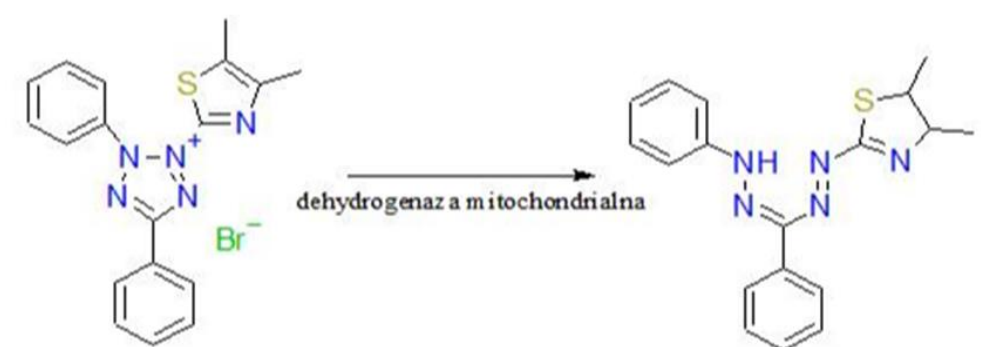
Związek Q: cytostatyk zaliczany do grupy antymetabolitów

Linia komórkowa potrójnie receptorowo negatywnego raka piersi MDA-MB-231.



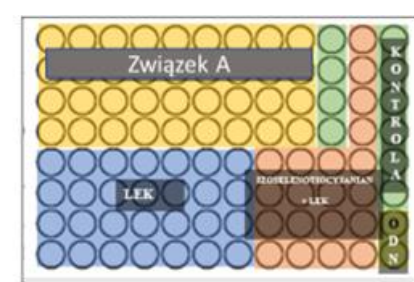
Metody

W celu oceny cytotoksyczności substancji badanych wykonano test MTT. Mierzy on żywotność komórek za pomocą testu redukcji soli tetrazolowej (MTT – substratu rozpuszczalnego w wodzie, o zabarwieniu białym lub żółtym) do nierozpuszczalnego formazanu (o zabarwieniu ciemnoniebieskim). Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji.

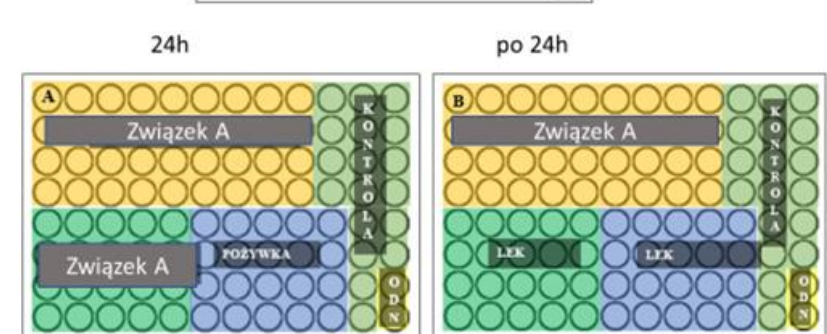


- W przeprowadzonym badaniu zastosowano dwa schematy podania substancji badanych: schemat konkurencyjny oraz sekwencyjny.

• Schemat konkurencyjny

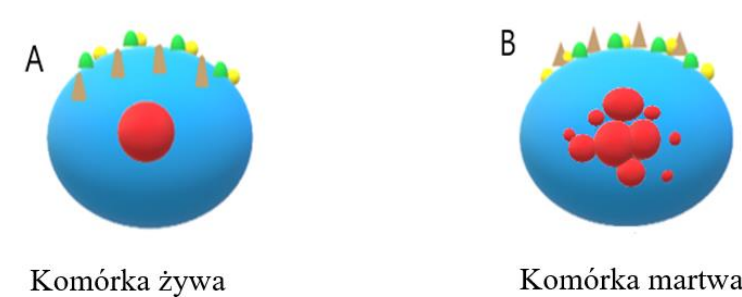


• Schemat sekwencyjny



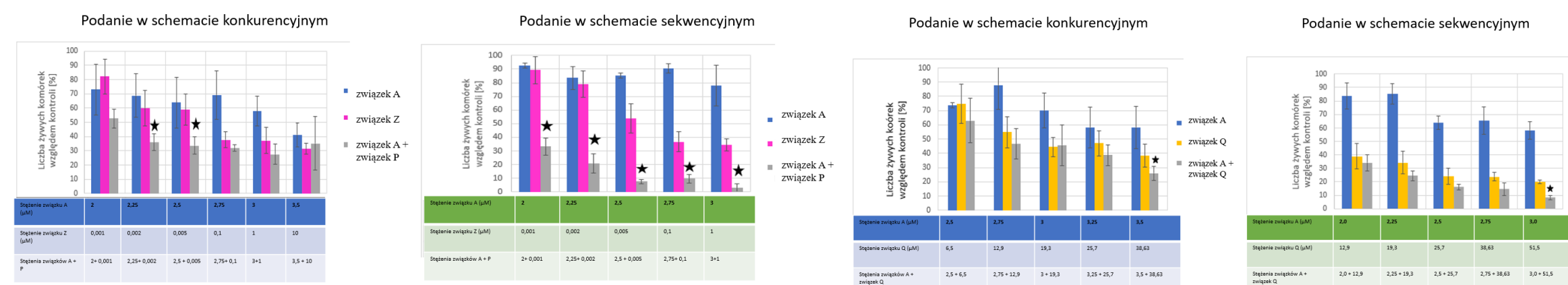
Wykonana została również analiza interakcji farmakodynamicznych (synergizmu, antagonizmu, addycji) związków w oparciu o metodę Chou i Talalay'a.

W dalszej części pracy zbadano zmiany integralności błony komórkowej i asymetrii fosfolipidów błonowych z wykorzystaniem barwienia jodkiem propidyny oraz FITC-aneksyną V (badania apoptozy) przy użyciu metody mikroskopii konfokalnej. Badanie apoptozy oceniano w 3 interwałach czasowych po 24h, 48h oraz 72h inkubacji z badanymi związkami lub ich połączeniami.



Wyniki

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów dla testu MTT oraz analiza interakcji farmakodynamicznych. Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programów: STATISTICA oraz GraphPad Prism 8.



Leś	Podanie konkurencyjne	Podanie sekwencyjne
Związek X	synergizm	synergizm
Związek Y	synergizm	synergizm
Związek Z	synergizm	synergizm
Związek Q	synergizm	synergizm

Efekty:
• niewielki (< 40%),
• pośredni (40-65%),
• silny (>65%).
CI=1 synergizm
CI=1 antagonizm
CI=1 addycja

Rycina 1. Zestawienie wyników graficznych i interakcji farmakodynamicznych badanych połączeń związku A i leków.

Tabela 1. Podsumowanie wyników testu MTT oraz analiza interakcji farmakodynamicznych badanych związków.

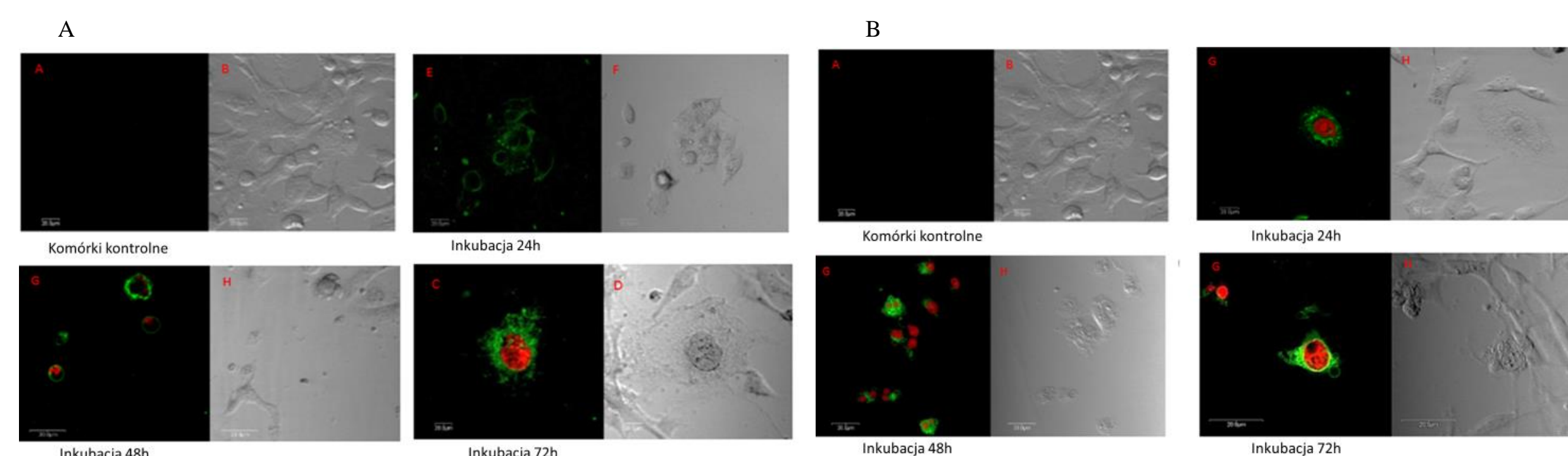
W przypadku podania konkurencyjnego związku A i związku X zaobserwowano działanie addytywne i antagonistyczne związków. Dla podania w tym schemacie wykazano silny efekt (około 90%) oraz niewielki efekt (do 40%) działania kombinacji. Podanie związku X i związku A w schemacie sekwencyjnym charakteryzują oddziaływania antagonistyczne osiągające efekty (do 30%) i synergistyczne o efektach klasyfikowanych do grupy efektów pośrednich (50-60%).	Dla kombinacji związku Y i związku A w przypadku obu schematów podania związków wykazano działanie antagonistyczne i addytywne. W zależności od schematu podania wymienione wcześniej działania różniły się rodzajem wywieranego efektu. W podaniu konkurencyjnym addycję cechował efekt pośredni (60%) natomiast antagonizm charakteryzował efekt silny (74%). Podanie w schemacie sekwencyjnym dla działania antagonistycznego obejmowało efekt pośredni (51%), a w stosunku do działania addytywnego zaobserwowany efekt zaliczany był do silnych (72-86%).	Zastosowanie schematu konkurencyjnego i sekwencyjnego dla podania związku A i związku Z odznacza synergizmem. Efekt dla tego działania klasyfikowany jest do grupy efektów silnych (66-92%).	Podanie konkurencyjne związku A i związku Q charakteryzowało działanie antagonistyczne, którego efekty zostały zaliczone do grupy: efektów pośrednich (53-61%) oraz silnych (74%). W przypadku podania sekwencyjnego zaobserwowano działanie addytywne i synergistyczne badanego połączenia związku A i związku Q, dla których efekty klasyfikowane do grupy efektów silnych (69-90%).
---	--	--	--

Badania mikroskopowe, wykonano dla kombinacji wykazujących istotne działanie cytotoksyczne w stosunku do badanej linii komórkowej. Obserwacje w mikroskopie konfokalnym z użyciem barwników fluorescencyjnych wykazały obecność komórek apoptotycznych w dwóch fazach wczesnej (dające zieloną fluorescencję) oraz późnej (wykazujące zieloną oraz czerwoną fluorescencję).

Tabela 2. Zestawienie wyników zmiany integralności błony komórkowej i asymetrii fosfolipidów błonowych z wykorzystaniem barwienia jodkiem propidyny oraz FITC-aneksyną V.

Wyniki wskazują, że typem śmierci komórek indukowanej przez analizowane kombinacje leków jest apoptoza. Komórki apoptotyczne charakteryzuje okrągły kształt oraz obkurczona cytoplazma.	Wystąpienie komórek o zwiększonych rozmiarach dla podania pojedynczego i kombinacji związku A i związku Z oraz związku A i związku Q mogą sugerować, że w badanych komórkach doszło do wystąpienia zjawiska katastrofy mitotycznej.	W kombinacji związku A i związku X oraz związku A i związku Y oraz podaniu pojedynczych substancji zaobserwowano największe zmniejszenie gęstości komórek po inkubacji związków w czasie 24h.
---	---	---

Na podstawie obserwacji mikroskopowych komórek wybarwionych FITC-aneksyną V oraz jodkiem propidyny, dla wszystkich czasów inkubacji po podaniach pojedynczych i kombinacji związków, wystąpiło zaburzenie integralności błony komórkowej oraz asymetria fosfolipidów błonowych, co jest charakterystyczne dla komórek znajdujących się w późnej fazie apoptozy. Wyniki oceny apoptozy komórek linii MDA-MB-231 po inkubacji A) związku A i związku Z B) związku A i związku Q.



Wnioski

- Najbardziej obiecujące wyniki obserwowano dla połączenia związku Z i związku A. Niezależnie od schematu podania zaobserwowano synergizm oddziaływania związków.
- Dla podań sekwencyjnych związku X ze związkiem A i związku Q ze związkiem A obserwowano synergizm, w przypadkach gdy, połączenie cechowało się silnym efektem obniżenia liczby komórek żywych.
- Antagonizm zaobserwowano dla podania konkurencyjnego związku Q, związku Y w połączeniu z badanym związkiem A.
- Dla schematu sekwencyjnego podania badanych leków i związku A, wykazano silniejsze działanie cytotoksyczne oraz korzystniejszy typ oddziaływania w porównaniu do schematu konkurencyjnego.
- Badania mikroskopowe dostarczyły dowodów, że apoptotyczna śmierć komórki była konsekwencją podania związku A w połączeniu z każdym z badanych leków.
- Zamieszczone w pracy wyniki badań dotyczące działania związku A w połączeniu ze związkiem Z, związkiem Q lub związkiem X stanowią podstawę do rozpatrywania użycia ich jako potencjalne elementy nowych schematów terapeutycznych w celu eliminacji wysoco inwazyjnego i opornego na leczenie trójnegatywnego raka piersi.
- Zaprezentowane w pracy wyniki stanowią podstawę do wykonania badań na modelu zwierzęcym i opracowania procedury patentowej wynalazku.